

ANÁLISE DE INTERFERENTES NA DETECÇÃO DE PSA PARA APLICAÇÃO FORENSE

ANALYSIS OF INTERFERING ON DETECTION OF PSA FOR FORENSIC APPLICATION

Artigo original.

Merice Possamai Bueno¹
Thiago Yuiti Castilho Massuda²

RESUMO

Na investigação de casos de violência sexual, a vítima é atendida e amparada recebendo ajuda e tratamento para minimizar o trauma físico. A identificação do sêmen nas vestes é extremamente importante para que seja confirmado o crime de violência sexual. É atribuição do IML/PR (Instituto Médico Legal – Paraná) a coleta de amostras das regiões vaginal e anal e também de peças do vestuário da vítima. Esses materiais devem ser submetidos a técnicas que comprovem a existência de sêmen, sendo essas a microscopia para pesquisa citológica de espermatozoides e o teste imunológico baseado na reação antígeno/anticorpo para pesquisa de PSA (Antígeno Prostático Específico). O PSA é uma glicoproteína produzida pelo tecido da próstata e é secretado no plasma seminal. Ele é utilizado na investigação do líquido seminal em perícias criminais, sendo um marcador na determinação dos vestígios de sêmen coletados das vítimas. O objetivo principal deste estudo foi testar a ação de interferentes sobre a quantificação do PSA. Para tal, foram utilizados interferentes com diferentes temperaturas, agentes ambientais, como terra úmida e seca, e também sabonete íntimo, sendo este agente químico, no período de 24 horas, utilizando como suporte tecido de algodão contendo um padrão comercial de PSA. Os resultados obtidos demonstraram que na variação de temperatura não houve diferença, o agente ambiental apresentou uma recuperação satisfatória, sendo submetido à terra seca e, na aplicação do sabonete íntimo diluído, a recuperação foi positiva. Através dos resultados, verificou-se que alguns destes fatores interferem na extração do PSA, utilizados para investigação de crimes sexuais, auxiliando na prática forense. Este trabalho foi realizado sem a necessidade de utilizar amostras biológicas.

DESCRITORES: violência sexual, PSA, interferentes.

¹Acadêmica do curso de Biomedicina das Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL.

²Graduação em Biomedicina, Mestre em Patologia, Perito Químico Legal do Instituto Médico Legal, IML-PR, docente dos cursos da Escola de Saúde das Faculdades Integradas do Brasil – UNIBRASIL. Contato: tmassuda@iml.pr.gov.br

ABSTRACT

In the investigation of cases of sexual violence the victim is attended and supported receiving help and treatment to minimize the physical trauma. The identification of semen on the clothes is extremely important to confirmed the crime of sexual violence. It is duty of IML/PR (Instituto Médico Legal – Paraná) to collect samples of the vaginal area, anal and also clothes of the victim. These materials must be subjected to techniques that prove the existence of semen, and microscopy for cytological evaluation of sperm and immunoassay based on antigen / antibody reaction searching for PSA (Prostate Specific Antigen). The PSA is a glycoprotein produced by the prostate tissue and is secreted into the seminal plasma. It is used to investigate seminal fluid in criminal investigations, besides as a marker in the determination of traces of semen collected from the victim. The main objective of this study was to test the action of interfering on the quantification of the PSA. Then, it was used interfering factor like different temperatures, environmental agents, such as wet and dry land, and also the intimate soap with a chemical agent, in 24 hours, using as support cotton fabric containing a commercial standard PSA. The results obtained showed that there aren't difference in temperature variation, and environmental agent showed a satisfactory recovery, and was submitted to dry land, and the application of intimate wash diluted recovery was positive. From the results, it was found that some of these factors affect the extraction of PSA, used for investigation of sexual crimes, helping in forensic practice. This work was performed without the need to use biological samples.

KEYWORDS: sexual violence, PSA, interfering.

INTRODUÇÃO

A violência é um fenômeno de conceituação complexa, que atinge indistintamente todas as classes sociais, etnias, religiões e culturas, ocorrendo em populações de todos os níveis de desenvolvimento econômico e social ⁽¹⁾. Também definida pela ação realizada por pessoas que ocasionam danos físicos, emocionais ou morais, a si mesmos ou a outros. A violência pode ser classificada em quatro tipos: física, psicológica, sexual e por negligência. A forma que mais acomete as vítimas é a violência sexual. Como exemplos de violência

sexual há o abuso sexual, estupro, sexo forçado no casamento, ato libidinoso, assédio sexual, atentado violento ao pudor e abuso incestuoso, ou qualquer conduta que constranja a presenciar, manter ou a participar de relação sexual não desejada, mediante intimidação, carícias não consentidas e ameaça, coação ou uso da força. Devido ao elevado número de crimes desta natureza, eles têm se tornado um problema de saúde pública^(2,3,4,5). Na questão de gênero, a violência sexual pode ser sofrida por homens e mulheres, mas as mulheres são as principais vítimas neste tipo de violência, afetando também crianças e adolescentes⁽⁶⁾.

A maioria das vítimas recebe atendimento adequado para o tratamento de traumas físicos, genitais ou extragenitais. Entre todas as consequências da violência sexual, a gravidez se destaca pela complexidade das reações psicológicas e sociais, pois é encarada como uma segunda violência, intolerável para a maioria das mulheres. Ocorre também o enfrentamento das DSTs (Doenças Sexualmente Transmissíveis), HPV (Papilomavírus Humano), herpes genital e hepatite B, e por essa razão existe a necessidade de investigação das DSTs, por período de até seis meses a partir da data do crime sexual. Essas medidas de apoio e aconselhamento devem ser acompanhadas rigorosa e periodicamente, mas a maior preocupação das vítimas de violência sexual é a infecção pelo HIV^(7,8,9,10).

Após o atendimento médico, são realizados os exames para a pesquisa de sêmen no Laboratório de Química Legal e Sexologia Forense no IML/PR. Na coleta, realizada por um médico, são processados swabs das regiões anal, vaginal e outros locais para identificação microscópica do material em manchas⁽¹¹⁾. São empregadas técnicas para comprovar se a amostra é realmente sêmen, sendo examinada por microscopia para pesquisa de espermatozoides e também realiza-se o teste imunológico para pesquisa de PSA^(12,13). Para que não ocorram resultados falso-negativos, são utilizadas ambas as técnicas, pois a microscopia pode ser falha em casos de azoospermia (ausência de espermatozoides) ou oligospermia (presença de poucos espermatozoides)⁽¹⁴⁾. Considerado um marcador de sensibilidade e especificidade limitado à FAP (Fosfatase Ácida Prostática), a microscopia foi bastante utilizada na investigação e caracterização do líquido seminal, mas foi substituída pelo PSA^(15,16). O PSA é uma glicoproteína de cadeia simples com peso molecular entre 33-34 kDa e expresso em altos níveis no epitélio prostático humano⁽¹⁷⁾. Caracterizado como uma proteína do plasma seminal, denominada p30 (peso molecular: 30 kDa). No sêmen a concentração do PSA varia de 0,2 a 5,5 x 10⁶ ng/mL e no soro é de até 4ng/ml^(18,19).

O PSA é utilizado como marcador na identificação de doenças relacionadas à próstata, auxiliando na detecção e acompanhamento em casos de tumores, quando em níveis aumentados ^(20,21). Também pode ser encontrado em fluidos extraprostáticos, em níveis reduzidos, não interferindo no valor da pesquisa de PSA na investigação do líquido seminal em perícias criminais ^(22,23).

Devido à carência de estudos como este, o trabalho aqui realizado tem o intuito de testar a ação de interferentes sobre a quantificação do PSA, utilizando tecido como suporte e padrão de PSA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa não utilizou amostra biológica, por isso não teve necessidade de ser submetida ao Comitê de Ética e Pesquisa.

O projeto foi realizado no laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Controle de Qualidade da UNIBRASIL, e no setor de Laboratório de Química Legal e Sexologia Forense do IML — Curitiba-PR (Instituto Médico Legal).

No preparo da amostra padrão foi utilizado um “pool”, ressuspendido de 20 concentrações diferentes de PSA comercial (BioMérieux), com 1ml de água destilada em cada padrão, realizada a leitura da concentração de PSA, e as alíquotas armazenadas em 1ml em microtubo de 1,5 ml. Foram aplicados 300µl do padrão de PSA em tecidos de algodão medindo 3cm². O tecido foi secado à temperatura ambiente por um período de 24 horas para completa adesão do PSA sobre o material. Para cada interferente analisado foi realizado amostras em triplicata, visando maior confiabilidade do experimento.

A primeira análise foi submeter os tecidos impregnados com PSA, durante 24 horas, à três diferentes temperaturas, 2 à 8°C; 23°C e 56°C. A segunda análise foi o interferente ambiental onde os tecidos de algodão contendo o padrão de PSA foram enterrados em terra úmida e terra seca por 24 horas. A terceira análise foi inserir no tecido, contendo o padrão de PSA, uma solução pura com 30µl de sabonete íntimo e outra com uma diluição de 1:10, com a mesma quantidade.

Após as amostras serem submetidas aos interferentes descritos, foi realizada a extração do PSA. O tecido foi fragmentado várias vezes com o auxílio de uma tesoura, sendo então

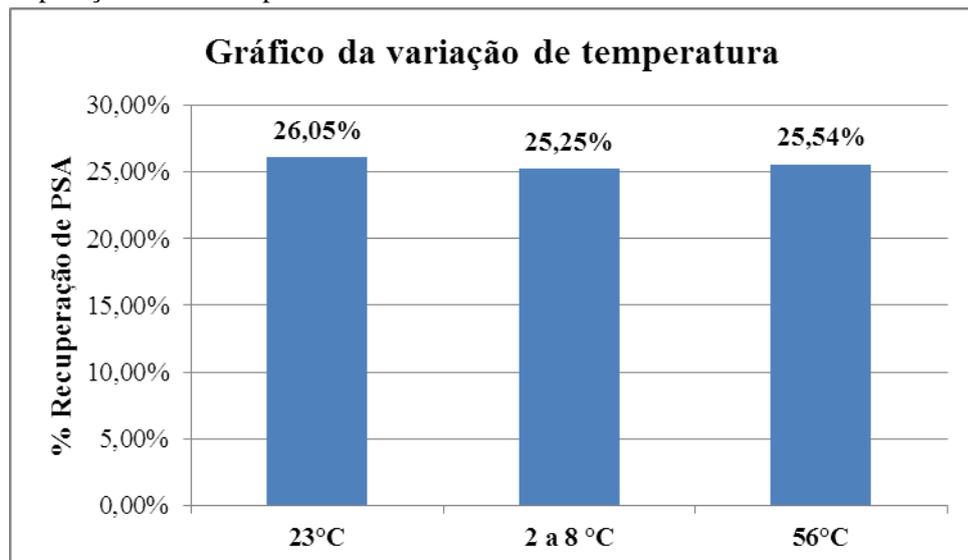
colocado em um tubo de ensaio com o auxílio de pinça, juntamente com 1ml de PBS e submetido à agitação no vórtex por 3 minutos, e armazenado por 24 horas entre 2 e 8° C. Após o período de incubação, os tubos contendo o tecido e PBS foram agitados no vórtex e foi removida a fração líquida, seguindo para centrifugação por 5 minutos a 2.000 rpm. A quantificação do PSA foi realizada com o Kit de detecção no Aparelho Mini-Vidas, pela metodologia ELFA, sendo pipetados 200uL do sobrenadante em um barrete conforme recomendação do fabricante ⁽²⁴⁾.

Para determinar a quantidade de PSA recuperado após a ação dos interferentes foi realizado o seguinte cálculo: $\frac{\text{média (3 amostras)}}{\text{concent.padrão de PSA}} \times 100$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na exposição do tecido com o padrão de PSA, a diferentes temperaturas, durante 24 horas, mostram que a variação na quantificação de PSA foi mínima, apesar do PSA ser uma proteína e, assim, podendo ocorrer desnaturação devido à temperatura, como mostra o gráfico 1. O tecido, exposto à temperatura ambiente (23°C), teve a recuperação da extração de (26,05%). Já entre a temperatura variante de 2 a 8° C (25,25 %) e exposto a 56°C (25,54 %), teve-se que a variação de temperatura não interferiu na quantificação de PSA, durante este período de exposição.

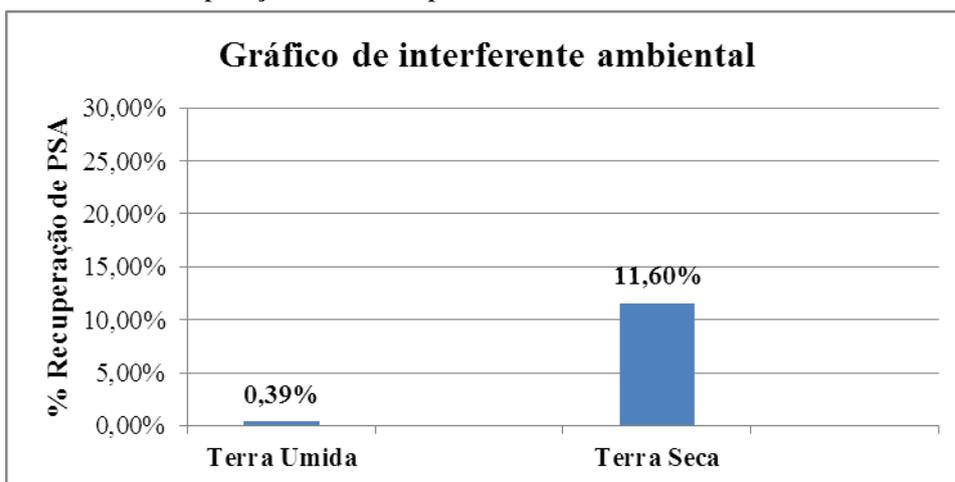
Gráfico 1- Recuperação de PSA exposto à diferentes



temperaturas.
 Fonte: a autora

Por meio da análise dos resultados obtidos na exposição do tecido, contendo PSA, ao agente ambiental em duas diferentes condições, terra seca e úmida, durante 24 horas, teve-se que a quantidade de PSA extraído do tecido exposto à terra seca resultou em uma recuperação mínima, mostrando que o solo úmido prejudica a quantificação de PSA em tecido. O gráfico 2 mostra que a recuperação do PSA submetido à terra úmida, durante o período de extração de 24 horas, foi de 0,39 %, e no mesmo tempo em terra seca a positividade foi de 11,60 %.

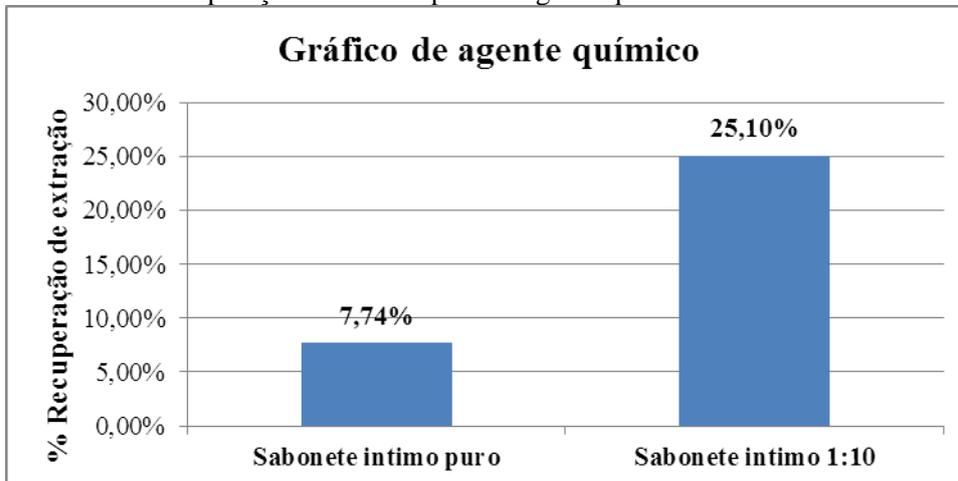
Gráfico 2 – Recuperação de PSA exposto ao interferente ambiental em diferentes condições



Fonte: a autora

Para os dados contidos no gráfico 3, utilizou-se sabonete íntimo puro, com uma recuperação de extração de 7,74% e diluído em água 1:10 (25,10%). Mediante estes resultados, justifica-se que o sabonete íntimo puro desnaturou o PSA, visto que é uma proteína.

Gráfico 3 – Recuperação de PSA exposto a agente químico em diferentes concentrações



Fonte: a autora

CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, conclui-se que as diferentes temperaturas não influenciaram a extração do PSA, o interferente ambiental mostrou uma diferença acentuada, entre a condição úmida e seca, mostrando que a umidade do solo prejudica a extração, e devido ao PSA ser uma proteína, quando exposto ao sabonete íntimo puro foi intensificada a ação desnaturante.

Através deste estudo foi possível constatar as variáveis de cada interferente, com a intenção de verificar sua ação. Dessa forma, este trabalho contribuiu para quantificar a extração de PSA e devido à carência de estudos sobre o assunto, é necessário que sejam abarcados também outros ou os mesmos interferentes, mas em diferentes tempos, condições e concentrações, permitindo assim estudos futuros para otimizar a extração do PSA e identificar outros fatores que podem mascarar um laudo pericial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Saffioti HIB, Almeida SS. Violência de gênero: poder e impotência. Rio de Janeiro (RJ): Revinter; 1995. p.218.
2. Radis Comunicação em Saúde -Fundação Oswaldo Cruz (BR). Reunião, Análise e Difusão de Informação sobre Saúde; 2010. Disponível em: URL: <www.ensp.fiocruz.br/radis>. Acessado em 05 jun 2013.
3. Guedes AC. Abuso sexual: aspectos psicossociais. In: Magalhães MLC, Andrade HHSM. Ginecologia infanto- juvenil. Rio de Janeiro (RJ): Medsi, 1998. p.573-581.
4. Secretaria Municipal da Saúde (BR). Atenção à mulher em situação de violência - programa mulher de verdade. Curitiba (BR): Secretaria Municipal da Saúde; 2008.
5. Lacerda E. Promoção da saúde no combate à violência. Rev PromSaú 2002 Out; 3 (6): 71 – 3.
6. Pedersen W, Skrondal A. Alcohol and sexual victimization: a longitudinal study of Norwegian girls. *Addiction*, 91:565-81, 1996.
7. Conselho Regional de Medicina de São Paulo (CREMESP). Violência sexual e aspectos éticos da assistência. In: Cadernos de ética em ginecologia e obstetrícia. 2 ed. São Paulo (SP): Conselho Regional de Medicina de São Paulo; 2002. p.141.
8. Faúndes A, Oliveira G, Andalaft NJA, Lopez JRC. Assistência à mulher vítima de violência sexual. *Femina* 1998; (26): 134-8.
9. Ministério da Saúde (BR). Área Técnica de Saúde da Mulher. Prevenção e tratamento dos agravos resultantes da violência sexual contra mulheres e adolescentes. Brasília (DF): Ministério da Saúde: Norma Técnica; 2005.

10. Gostin OL, Lazzarini Z, Alexander D, Brandt AM, Mayer KH, Silverman DC. HIV testing, counseling, and prophylaxis after sexual assault. *JAMA* 1994; 271:1436-4.
11. Sawaya MCT, Rolim MRS. Manual prático de Medicina Legal no Laboratório. Curitiba (PR): Juruá; 2 ed.2009.
12. Instituto Médico Legal do Paraná. Pesquisa de sêmen em swabs. POPLQLSF-006. Última revisão: Fev 2011.
13. Instituto Médico Legal do Paraná. Pesquisa de sêmen em manchas. POPLQLSF-007. Última revisão: Fev 2011.
14. Alves FCR, Cândido IM, Borba KM, Souza LF. Correlação entre pesquisa de espermatozoides e análise qualitativa do antígeno prostático específico (PSA) como ferramenta na prática forense. Disponível em: URL: <<http://www.aspecco.com.br/artigos.php>>. Acessado em:25 set 2012.
15. Oesterling JE, Brendler CB, Epstein JI, Kimball AWJR, Walsh PC. Correlation of clinical stage, serum prostatic acid phosphatase and preoperative Gleason grade with final pathological stage in 275 patients with clinically localized adenocarcinoma of the prostate. *Jour Urol* 1987; 138: 92-8.
16. Khaldi N, Miras A, Botti K, Benali L, GrombS. Evaluation of three rapid detection methods for the forensic identification of seminal fluid in rape cases. *JourForenScie* 2004; 49(4): 749-53.
17. Wang MC, et. al. Purification of a human prostate specific antigen. *InvUrol* 1979; 17: 159-163.
18. Sensabaugh GF. Isolation and Characterization of a Semen-Specific Protein from Human Seminal Plasma: A Potential New Marker for Semen Identification. *JourForenScie* 1978; 23: 106-115.
19. Sawaya MCT, Rolim MRS. Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório. Curitiba (PR): Juruá; 2003; (2): 55-63.
20. Shariat SF, et. al. Beyond Prostate-Specific Antigen: New Serologic Biomarkers for Improved Diagnosis and Management of Prostate Cancer. *Journal Urology*, 2004; 6 (2): 58-72.
21. Thompson IM, Ankerst DP. Prostate-specific antigen in the early detection of prostate cancer. *CMAJ*, 2007; 176: 13.
22. Laux DL, Custis,S. Forensic Detection of Semen III. Detection of PSA using membrane based tests: sensivity issues with regards to the presence of PSA in other body fluids.[periódico na Internet]. 2003 [citado 2013 jun 06]. Disponível em: http://www.semenonpanties.com/Reference/PSA_in_other_fluids.pdf
23. Sawaya MCT, Rolim MRS. Antígeno específico da próstata em fluidos biológicos: Aplicação forense. *Visão Acadêmica*, Curitiba, 2004; 5: 109-116.
24. BioMérieux SA. Bula VIDAS® TPSA. Marcy-I'Etoile, France; 2013.