

TESTE DE MEMBRANA DO ANTÍGENO ESPECÍFICO DA PRÓSTATA PARA IDENTIFICAÇÃO DO SÊMEN

PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN MEMBRANE TEST FOR SEMEN IDENTIFICATION

RESUMO

Com técnicas inovadoras de biologia molecular tornando-se cada vez mais frequentes na área forense laboratorial, é plausível que os métodos tradicionais de sorologia sejam substituídos por técnicas mais avançadas. O Antígeno Específico da Próstata (PSA) é uma glicoproteína produzida pela glândula prostática e secretada no plasma seminal. Objetivou-se avaliar os testes rápidos de membrana do PSA na identificação do líquido seminal de indivíduos vasectomizados. Realizou-se uma revisão integrativa de literatura, com busca de artigos publicados nos últimos quatro anos, em português e inglês, nas bases de dados: SciELO, BVS, PubMed, LILACS e CAPES, a partir dos DeCS: Sêmen “*Semen*”, Medicina legal “*Forensic medicine*”, Vasectomia “*Vasectomy*”, Antígeno Prostático Específico “*Prostate-Specific Antigen*”, Sorologia “*Serology*”, combinados pelo operador booleano "AND". Em comparação com as demoradas medições baseadas em ELISA de PSA, os testes rápidos de membrana oferecem a mesma sensibilidade (4 ng PSA / ml) dentro de 10 minutos usando 200 µl de sobrenadante da extração de DNA. Esses testes rápidos de membrana específicos de PSA oferecem à comunidade forense uma ferramenta extremamente sensível para a identificação de fluido seminal de indivíduos vasectomizados, tornando esses testes possíveis de serem facilmente implementados em todas as áreas forenses laboratoriais de assistência social.

PALAVRAS-CHAVE: vasectomia; antígeno prostático específico; sorologia

ABSTRACT

With innovative molecular biology techniques becoming more and more frequent in the forensic laboratory area, it is plausible that the traditional serology methods are replaced by more advanced techniques. Prostate Specific Antigen (PSA) is a glycoprotein produced by the prostate gland and secreted into the seminal plasma. The objective was to evaluate the rapid tests of membrane of the PSA in the identification of the seminal fluid of vasectomized individuals. An integrative literature review was carried out, searching for articles published in the last four years, in Portuguese and English, in the databases: SciELO, BVS, PubMed,

LILACS and CAPES, based on the DeCS: Sêmen “Semen”, Medicina legal “Forensic medicine”, Vasectomia “Vasectomy”, Antígeno Prostático Específico “Prostate-Specific Antigen”, Sorologia “Sorology”, combined by the Boolean operator "AND". In comparison to lengthy measurements based on PSA ELISA, rapid membrane tests offer the same sensitivity (4 ng PSA / ml) within 10 minutes using 200 µl of supernatant from DNA extraction. These rapid PSA-specific membrane tests offer the forensic community an extremely sensitive tool for the identification of seminal fluid in vasectomized individuals, making these tests possible to be easily implemented in all forensic laboratory areas of social assistance.

KEY WORDS: Vasectomy; Prostate Específico Antigen; Sorology

INTRODUÇÃO

Os ensaios de teste rápido de membrana oferecem a mesma sensibilidade dos testes baseados em ELISA e representam uma abordagem rápida para a identificação forense do fluido seminal de indivíduos vasectomizados. O Antígeno Específico da Próstata (PSA, também conhecido como P30), é uma glicoproteína produzida pela glândula prostática e secretada no plasma seminal (KOUKOUVINOS et al., 2017).

A PSA está integrada na família das calicreínas, que são proteases do soro que apresentam diversas funções fisiológicas. Elas são representadas por uma família de genes, que contém quinze membros, localizados amplamente ao longo do cromossomo 19q13.4. Onde o gene KLK-3 codifica a protease PSA, também conhecida como hK3 - calicreína glandular humana 3 (GONÇALVES et al., 2017).

O nome PSA reflete a ideia de que a mesma é exclusiva da próstata, porém através de pesquisas e metodologias, de maior sensibilidade além da realização de estudos imunohistoquímicos, é evidente que essa proteína está presente em diversos tipos de tumores, tecidos saudáveis e fluidos biológicos femininos e masculinos, evidenciando que ela também pode apresentar funções fora da próstata (KRANIOTI et al., 2017).

Com técnicas inovadoras de biologia molecular tornando-se cada vez mais frequentes na área forense laboratorial, é plausível que os métodos tradicionais de teste sorológico utilizados para identificar as manchas serão substituídos por técnicas de biologia molecular mais avançadas (ZHAO et al., 2017). O Sorológico tradicional para abordagens de identificação de manchas muitas vezes envolve um teste de cor presuntivo, seguido por um teste de confirmação que normalmente usa um anticorpo específico que tem sua complexificação com

uma proteína conhecida, como hemoglobina para sangue humano e P30 ou antígeno prostático para fluido seminal (SATO et al., 2020).

Embora esses métodos de teste tenham melhorado em simplicidade e seletividade ao longo dos anos, vários problemas ainda persistem, como exemplo a possibilidade de reatividade cruzada com outras espécies e a falta de especificidade para determinados fluidos (KARADAYI et al., 2020). Atualmente o PSA é aceito como um marcador para a detecção de sêmen em casos criminais envolvendo vasectomia ou machos azoospermicos, nos quais a produção de espermatozoides é inexistente. A frequência relatada de azoospermia é de 1-9% em manchas seminais ou esfregaços examinados em casos de violência sexual estes podem aumentar, uma vez que a frequência de vasectomia anticoncepcional tem sido estimada em 750.000 a 1.000.000 por ano nos Estados Unidos (TOSELLI, 2020).

O isolamento e purificação bem-sucedidos de PSA de sêmen humano conseguiu tornar possível o desenvolvimento de métodos imunológicos para sua detecção. Os métodos para a detecção de PSA incluem *Ouchterlony double* difusão, eletroforese cruzada, imunoeletroforese de foguete, imunodifusão radial e ELISA (RUIZ et al., 2017). A técnica ELISA é extremamente sensível e pode detectar PSA em fluidos corporais em concentrações tão baixas quanto $\sim 4 \mu\text{g}$ por mililitro. Uma desvantagem de todas as outras técnicas é que não são sensíveis o suficiente ou são complicadas e demoradas apresentando desvantagens para atuar em laboratórios forenses (SCALON, 2017).

Vários testes de membrana específicos do antígeno são utilizados atualmente em ambientes clínicos no intuito de rastrear o soro de um paciente para a presença de PSA em níveis $> 4 \mu\text{g} / \text{ml}$ indicando hiperplasia prostática benigna ou câncer prostático. Todos os testes são baseados na reação entre um antígeno e um anticorpo monoclonal marcado com ouro, o complexo formado migra através de uma membrana por forças capilares e reage com um segundo anticorpo monoclonal (GOUVEIA, 2016).

Nesse contexto o objetivo deste estudo foi avaliar os testes rápidos de membrana do antígeno prostático específico (PSA) na identificação do líquido seminal de indivíduos vasectomizados.

METODOLOGIA

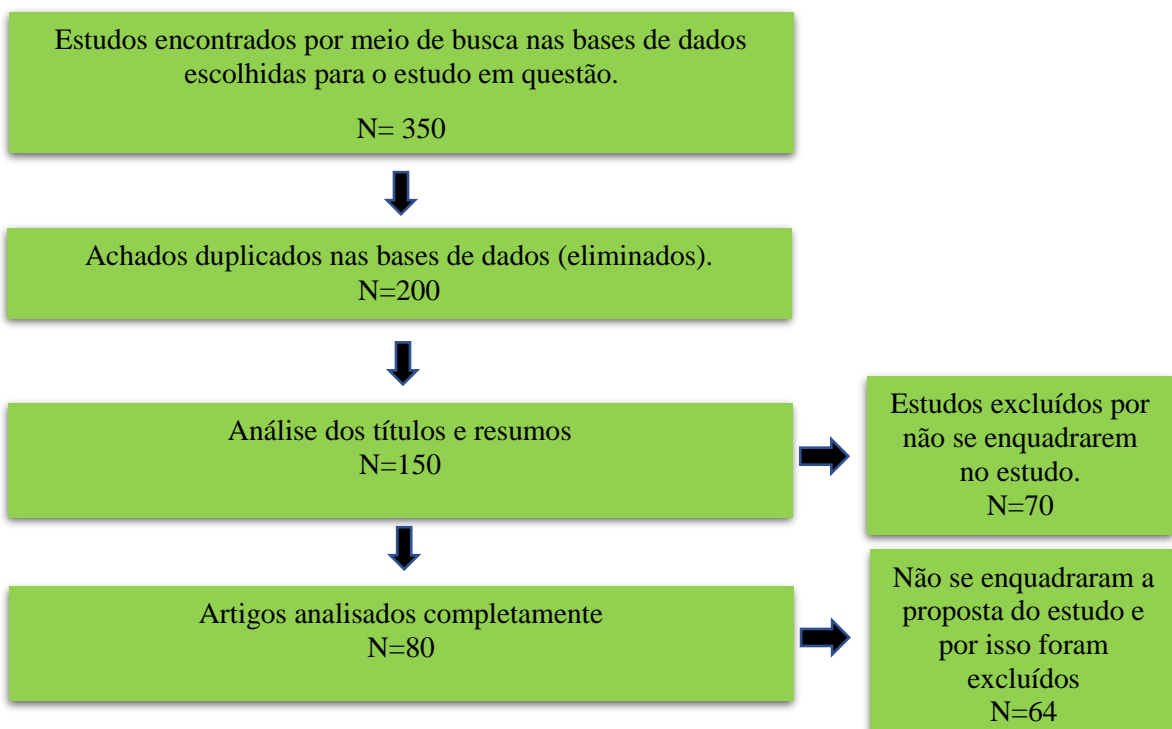
A presente pesquisa é uma revisão integrativa de literatura, de abordagem qualitativa, com busca ativa de artigos científicos publicados nos últimos quatro anos, nas seguintes bases

de dados: *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), Biblioteca Virtual de Saúde (BVS), *National Library of Medicine* (PubMed), Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (LILACS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Para realização da pesquisa foram utilizados os seguintes descritores em Ciências da Saúde (DeCS) nos idiomas português e inglês, respectivamente: Sêmen “*Semen*”, Medicina legal “*Forensic medicine*”, Vasectomia “*Vasectomy*”, Antígeno Prostático Específico “*Prostate-Specific Antigen*”, Sorologia “*Serology*”, combinados pelo operador booleano "AND". Foram incluídos na pesquisa: artigos disponíveis na íntegra, nos idiomas selecionados, que apresentassem pelo menos um dos descritores citados anteriormente, obras que estivessem disponíveis de forma online e gratuita, indexadas nas bases de dados escolhidas. Foram excluídos: estudos publicados em período anterior aos últimos quatro anos, que não apresentassem a temática proposta e que necessitassem da realização de algum tipo de pagamento financeiro para ter acesso a obra na íntegra.

De acordo com as estratégias utilizadas na presente pesquisa, foram encontrados um total de 350 artigos científicos. Entretanto, apenas 16 destes foram selecionados para a composição do estudo. A Figura 1 esquematiza a sequência metodológica utilizada para a seleção das publicações que compuseram essa revisão integrativa.

Figura 1 – Etapas para escolha dos estudos elegíveis para composição dos principais achados da pesquisa.





Artigos incluídos na Revisão Integrativa
N= 16

Fonte: autoria própria, 2020.

RESULTADOS

Agora está bastante claro que o termo Antígeno Prostático Específico (PSA) é um termo impróprio. Embora presente em grandes quantidades no plasma seminal, sua presença foi detectada em uma variedade de outros fluidos corporais como descritos na Tabela 1. As maiores concentrações de PSA fora do sêmen tem encontrado se no leite materno e no líquido amniótico (TOSELLI, 2020).

Tabela 1 – Concentração de PSA em vários fluidos corporais (líquidos).

Fluidos	Concentrações PSA (ng/mL)
Sêmen	200,000 para 5.5 milhões
Sêmen	820,000
Líquido amniótico	0.60 (média) 8.98
Leite materno	1 (média.) 2100
Leite materno	< 1.0; > 100
Leite materno	0.47
Saliva	Nenhum
Urina feminina	3.72
Urina feminina	1.73
Urina feminina	0.12 – 1.06; 0.29
Urina feminina	0.53
Soro feminino	< 0.01
Soro feminino	< 0.1

Fonte: Adaptado Satoh et al. (2020).

Pesquisas apontaram níveis relevantes substanciais de PSA encontrados no líquido amniótico e no leite materno. Os casos que envolvem mulheres lactantes ou grávidas devem ser tratados com o devido cuidado. Tendo particular preocupação para este analista a detecção de PSA na urina feminina e no soro feminino. Na literatura o achado de urina em um par de peças femininas de uma sobrevivente de estupro não seria incomum. Além disso, se houver trauma

ou se a sobrevivente estiver menstruada, pode haver sangue em esfregaços vaginais ou manchas na roupa íntima (GOUVEIA, 2016).

Quando um extrato é preparado a partir de uma mancha na roupa íntima e o PSA é detectado, como o analista pode ter certeza de que o resultado é de sêmen? Em outras palavras, qual é a probabilidade de a mancha ser de urina ou soro feminino? O Teste *Abacus Diagnostics OneStep ABACard P30* é utilizado extensivamente em laboratórios forenses nos Estados Unidos e consegue elucidar essas questões (TOSELLI, 2020).

Apresentando uma sensibilidade listada de 4 µg PSA / mL. Logo o Seratec PSA *Semiquant Kit* foi desenvolvido como um teste de rastreamento para a detecção de câncer de próstata humana, sendo projetado como um teste semiquantitativo que contém um padrão interno de 4 µg PSA / mL. A literatura declara a sensibilidade do kit como 2 µg / mL de PSA (GOUVEIA, 2016). Estudos concluem que o kit Seratec é o mais sensível dos dois kits PSA com reações positivas obtidas a 0,78 µg / mL PSA. Nesse nível de detecção, o teste está certamente na faixa de concentrações conhecidas de PSA na urina feminina e próximo ao limite detectado no soro feminino (RUIZ et al., 2017).

PSA em fluidos biológicos

A determinação quantitativa da PSA é conduzida através de equipamentos automatizados e totalmente computadorizados que são realizados por meio de métodos imunológicos, como enzimaímoensaios, quimioluminescentes imunoenzimáticos e imunorradiométricos. Estes métodos apresentam uma sensibilidade de pelo menos 0,001µg/ml, o que em 1994 conseguiu possibilitar a detecção da PSA em vários fluidos biológicos extraprostáticos (TOSELLI, 2020).

A partir de pesquisas aprofundadas, estudiosos investigaram a presença de PSA em amostras de fluido cerebrospinal colhidas de homens e mulheres concluindo que a PSA pode ser produzida pelo tecido cerebral, esses também evidenciaram a presença da PSA em secreções vaginais por meio de testes utilizando *swabs* vaginais livres de espermatozoides (SATO et al., 2020). De acordo com esses testes, os resultados relatados da detecção de PSA em secreções e fluidos corporais tanto masculinos quanto femininos poderiam ser amplamente confirmados (KUNICKI, 2010).

Pesquisas selecionadas da membrana não detectaram PSA em nenhuma amostra de mulheres. Além de sêmen de homens normais e vasectomizados, resultados positivos só foram

obtidos na urina pós-ejaculação de homens adultos, quando as amostras foram adicionadas diretamente aos testes de membrana (SCALON, 2017). No entanto, é bem estabelecido que o PSA ocorre nesses fluidos, o que demonstra a confiabilidade desses testes em um ambiente forense a partir da análise do material probatório de casos de violência sexual conhecidos por conterem fluido seminal de indivíduos não vasectomizados ou vasectomizados (SATOH et al., 2020).

Manchas de sêmen armazenadas em temperatura ambiente por até 30 anos produzem um resultado positivo. Os limites de sensibilidade e detecção dos testes rápidos de membrana específicos de PSA são iguais a um ensaio imunoabsorvente enzimático (diluições de fluido seminal até 1: 1.000.000 são positivas) (SCALON, 2017).

É importante notar que algumas manchas de sêmen apresentam um resultado negativo, que passa a ser positivo quando ocorre a diluição 1: 100 ou 1: 1.000 vezes e a amostra é testada novamente. Deve-se ter em mente que um resultado de teste de membrana negativo pode ser causado por altas concentrações de PSA no extrato (provocando o chamado efeito de gancho alto). Nestes casos, 1: 100 ou a diluição 1: 1.000 vezes dos 100 µl restantes do sobrenadante deve ser testada novamente (SATOH et al., 2020).

Abacus OneStep ABACard®

O *Abacus OneStep ABACard®* é um produto que pode ser utilizado para identificação rápida e qualitativa do antígeno P30, este confirma a presença de sêmen pela utilização de um anticorpo monoclonal móvel marcado com corante que se liga ao antígeno P30 (SATOH et al., 2020). O complexo P30 antígeno-anticorpo se difunde horizontalmente em uma membrana com duas regiões de anticorpos fixos. Os anticorpos policlonais P30 imobilizados estão localizados em uma região de teste e da imunoglobulina anti-humana, e estão presentes em uma região de controle no *Abacus OneStep ABACard®* a partir da membrana de teste (TOSELLI, 2020).

Nessas regiões, o complexo antígeno-anticorpo P30 móvel e / ou P30 marcado com corante livre interage com as regiões imobilizadas. Após a aplicação de 200 µl de amostra extrato e um tempo de difusão de 10 minutos, o acúmulo dos anticorpos marcados com corante resulta na formação de bandas rosa nas regiões de teste e controle no *Abacus OneStep ABACard®* membrana (KARADAYI et al., 2020).

Uma faixa rosa na região de controle significa que o teste foi executado de forma adequada. A partir da mobilização do antígeno o complexo de anticorpos na região de teste e

controle e identifica positivamente a presença do antígeno P30. Estudos de validação confirmaram a utilização *do Abacus OneStep ABACard®* teste P30 para uso em laboratórios como um teste confirmatório para a presença de sêmen (GOUVEIA, 2016).

Exemplos de aplicação de testes de membrana do Antígeno Específico da Próstata

Abuso sexual infantil

Manchas nas roupas das crianças são frequentemente examinadas quanto à presença de fluido seminal, quando é encontrado negativo para espermatozoides, um teste de membrana específico para PSA deve ser realizado. Na literatura são observados casos em que nenhum espermatozoide é detectado e um teste de membrana específico para PSA apresenta positividade isto logo demonstra a confirmação que o agressor era um indivíduo vasectomizado (SCALON,2017).

Estimativa de tempo aproximado da agressão sexual

Sabe-se que o PSA é detectável no trato vaginal até no máximo 14-47 horas, e esperma celular por muitos dias. Estudos, apresentaram um caso com relatório atrasado de quatro dias após uma agressão sexual. Muito poucas células de esperma foram encontradas e o teste de PSA foi negativo, confirmando a afirmação do paciente. Um teste de PSA positivo forte não teria sido consistente com o período de tempo relatado (SATOH et al.,2020).

CONCLUSÃO

Em comparação com as demoradas medições baseadas em ELISA de PSA, os testes rápidos de membrana oferecem a mesma sensibilidade (4 µg PSA / ml) dentro de 10 minutos usando 200 µl de sobrenadante da extração de DNA. Embora os bastões de teste ofereçam a mesma sensibilidade, não os consideramos úteis para trabalho de caso devido a maior quantidade de líquido necessária.

Os testes rápidos de membrana específicos de PSA oferecem à comunidade forense uma ferramenta extremamente sensível para a identificação de fluido seminal de indivíduos vasectomizados. Se houver a presença de urina masculina está em questão, deve passar por adicionais utilizando o antígeno específico da vesícula seminal MHS-5 (SEMA, Humagen Fertility Diagnostics, Inc.). Portanto esses testes podem ser facilmente implementados em todas as áreas forenses laboratoriais de assistência social.

REFERÊNCIAS

- KOUKOUVINOS, Georgios et al. White light reflectance spectroscopy biosensing system for fast quantitative prostate specific antigen determination in forensic samples. *Talanta*, v. 175, p. 443-450, 2017.
- GONÇALVES, A. B. R. et al. Comparison of the sensitivity and specificity of colorimetric and immunochromatographic presumptive methods for forensic semen detection. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v. 6, p. e481-e483, 2017.
- KRANIOTI, E. K. et al. Sexual dimorphism of the tibia in contemporary Greek-Cypriots and Cretans: forensic applications. *Forensic Science International*, v. 271, p. 129. e1-129. e7, 2017.
- ZHAO, Yi et al. The Discussion of semen stains examination in the field of forensic applications. *Chinese Journal of Forensic Medicine*, v. 32, n. z1, p. 13-16, 2017.
- SATOH, Tetsuya et al. Detection of prostate-specific antigen in semen using DNA aptamers: an application of nucleic acid aptamers in forensic body fluid identification. *Analytical Methods*, 2020.
- KARADAYI, Sukriye et al. Evaluating the persistence of laundered semen stains on fabric using a forensic light source system, prostate-specific antigen Semiquant test and DNA recovery-profiling. *Medicine, Science and the Law*, v. 60, n. 2, p. 122-130, 2020.
- TOSELLI, Milena; PACHECO, Ana Cláudia; DIAS FILHO, Claudemir Rodrigues. PSA positivo, espermatozoides ausentes: vale a tentativa de obtenção de perfil genético masculino?. *Revista Brasileira de Criminalística*, v. 8, n. 2, p. 51-57, 2020.
- RUIZ, Karine Pequeno Nakao et al. Análise molecular de amostras negativas para o antígeno específico da próstata (PSA) coletadas de vítimas de crimes sexuais. 2017.
- SCALON, Amanda Brancher; MASSUDA, Thiago Yuiti Castilho. ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS PERÍCIAS DE DNA EM VESTÍGIOS BIOLÓGICOS DE VÍTIMAS DE VIOLÊNCIA SEXUAL NO ESTADO DO PARANÁ NO ANO 2017. *Anais do EVINCI-UniBrasil*, v. 3, n. 2, p. 26-33, 2017.
- GOUVEIA, Mónica Alexandra Florêncio. Comparação de diferentes métodos de análise de manchas de sémen, em tecidos analisados na rotina forense. 2016.

NAGAR, Renu; MSALATI, Abdulghani A. Changes in serum PSA during normal menstrual cycle. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, v. 28, n. 1, p. 84-89, 2013.

HOBBS, Marcia M. et al. Vaginal swab specimen processing methods influence performance of rapid semen detection tests: a cautionary tale. *Contraception*, v. 82, n. 3, p. 291-295, 2010.

JAMSHIDI, Roxanne et al. Detection of two biological markers of intercourse: prostate-specific antigen and Y-chromosomal DNA. *Contraception*, v. 88, n. 6, p. 749-757, 2013.

EFTHIMIOU, Ioannis et al. Determination of the association of urine prostate specific antigen levels with anthropometric variables in children aged 5-14 years. *International braz j urol*, v. 36, n. 2, p. 202-208, 2010.

KUNICKI, Michał; RADOWICKI, Stanisław. Antygen specyficzny dla prostaty–PSA u kobiet. *Ginekol Pol*, v. 81, p. 704-707, 2010.

OLD, Jennifer et al. Developmental validation of RSID™-Semen: a lateral flow immunochromatographic strip test for the forensic detection of human semen. *Journal of forensic sciences*, v. 57, n. 2, p. 489-499, 2012.