**Extração de DNA de *suabes* de bexiga urinária coletados de cadáveres carbonizados e em putrefação: possível aplicação em identificação humana e DVI**

1.INTRODUÇÃO

Um desastre é um evento catastrófico e inesperado que resulta em ferimentos ou morte a várias pessoas, tais como quedas de aeronave, incêndios, explosões, ataques terroristas, entre outros. Desastres podem ser classificados como incidentes abertos ou fechados, ou uma mistura de ambos, dependendo do número de vítimas e se suas identidades são previamente conhecidas ou não. O processo de identificação de vítimas de desastres é chamado DVI (do inglês, *Disaster Victim Identification*).

A análise de DNA é considerada como um dos métodos primários para identificação de vítimas num evento DVI. Diversos tipos de amostras biológicas podem servir como fonte de DNA para análises genéticas, tais como tecidos moles, ossos, dentes, entre outros fluidos. Todavia, fatores como estado de conservação do cadáver, condições ambientais e outros relativos à natureza do evento podem prejudicar rigorosamente a qualidade do material genético obtido.

A Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG) e a Interpol recomendam, desde 2009, a coleta de suabes da mucosa interna da bexiga urnária como fonte de DNA em vítimas carbonizadas. No entanto, existem poucos relatos na literatura sobre a aplicação desta técnica de coleta. Um estudo prévio do nosso grupo conseguiu atestar a viabilidade da coleta deste material para fins de identificação humana em cadáveres de morte recente, sem sinais evidentes de putrefação ou carbonização.

No caso do estado do Rio de Janeiro, grande parte das vítimas de homicídio são encontradas carbonizadas, geralmente vítimas dos conflitos relacionados ao tráfico de drogas. Por outro lado, devido ao clima quente e úmido do estado e do seu extenso litoral, muitos cadáveres também são encontrados já em avançado estado de decomposição. A coleta do suabe de bexiga urinária para fins de identificação de tais corpos por DNA pode trazer benefícios na coleta, armazenamento, transporte e manipulação.

O objetivo deste trabalho é verificar a viabilidade e padronizar o uso de suabes da mucosa da bexiga urniária como fonte de DNA para fins de identificação humana, em cadáveres carbonizados e em avançado estágio de decomposição.

# 2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de 10 cadáveres carbonizados e 10 cadáveres putrefeitos durante necropsias realizadas no Instituro Médico Legal Afránio Peixoto (IMLAP), no Rio de Janeiro. Foram coletados 4 (quatro) suabes de esfregaço da mucosa da bexiga urinária de cada cadáver. Além disso, sempre que possível, foram coletadas amostras de osso e músculo esquelético como amostras de referência.

## 2.2 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO DNA

O DNA dos suabes foi extraído pelo método orgânico e pelo método com resina Chelex100®, conforme descrito; já o DNA das amostras de referência (ossos e músculos) foi extraído apenas pelo método orgânico. O DNA foi quantificado por qPCR com o kit Investigator Quantiplex (Qiagen) no equipamento Rotor Gene (Qiagen). Catorze amostras de DNA representativas dos grupos tiveram sua integridade analisada com o kit High Sensitivity no sistema Bioanalyser 2100 (Agilent).

As amostras foram amplificadas com o kit PowerPlex Fusion System (Promega Corporation) e analisadas por eletroforese capilar no sequenciador 3500 Genetic Analyser (Life Technologies). Os perfis genéticos obtidos foram analisados com o software GeneMapper ID-X (Life Technologies). As análises estatísticas foram realizadas com o *software* GraphPad Prism 5.

**3. RESULTADO****S**

Dentre as amostras de DNA, as concentrações obtidas a partir dos suabes extraidos com o método Chelex® foram significativamente menores que as demais extrações, para ambos os grupos (carbonizados e putrefeitos). Entretanto, em apenas 1 amostra do grupo dos carbonizados e 8 do grupo dos putrefeitos essas concentrações ficaram abaixo de 0,5ng/uL (concentração recomendada para uso com o kit PowerPlex Fusion System).

A análise da integridade do DNA no ensaio do Bioanalyser indicou que, mais importante que obter altas concentrações de DNA, sua integridade é crucial para a obtenção de perfis genéticos de qualidade. Embora a extração pelo método Chelex® produza, em geral, amostras com menores concentrações de DNA quando comparada com o método orgânico, é possível obter um perfil genético de boa qualidade quando os fragmentos de DNA são suficientemente longos para permitir a amplificação do material genético no momento da PCR.

Durante a análise dos perfis genéticos obtidos, foram considerados perfis genéticos completos quando foram obtidos resultados para todos os 24 locais genéticos avaliados; perfis genéticos parciais quando foram obtidos resultados entre 10 a 23 locais genéticos; e insuficientes para análise quando foram obtidos resultados para 9 ou menos locais genéticos.

Dentre os cadáveres carbonizados, foi possível obter perfis genéticos de boa qualidade para 100% dos suabes extraídos pelo método orgânico e 90% dos suabes extraídos pelo método Chelex® (considerando perfis genéticos completos e parciais). Já para o grupo dos cadáveres putrefeitos, esse quantitativo ficou em 90% para os suabes extraídos pelo método orgânico e 50% para os suabes extraídos pelo método Chelex®. Todos estes perfis apresentaram concordância com suas respectivas amostras de referência (Figuras 1 e 2).



**Figura 1:** Eletroferogramas com perfis completos das amostras de osso (A), músculo (B) e suabesextraídos pelo método orgânico (C) e método Chelex® (D) de um cadáver carbonizado, mostrando a concordância entre eles.

**Figura 2:** Eletroferogramas com perfis completos das amostras de osso (A) e suabesextraídos pelo método orgânico (C) e método Chelex® (D) e perfil parcial de músculo (B) de um cadáver putrefeito, demostrando a concordância entre eles.

**4. DISCUSSÃO**

A coleta de suabes da mucosa da bexiga urinária apresenta uma série de vantagens quando comparada aos materiais de rotina (tais como ossos e músculos): facilidade e rapidez na coleta; facilidade no transporte e armazenamento; rapidez na extração do DNA.

Comparado as metodologias empregadas para extração do DNA dos suabes, foi observado que aqueles extraídos pelo método orgânico apresentaram um alto rendimento em relação ao mínimo aceitável para a amplificação do DNA (0,5ng/uL). Embora os suabes extraídos com Chelex® não apresentassem o mesmo rendimento, ainda possibilitaram obter quantidades significativas de DNA para amplificação e perfis genéticos suficientes para análise.

A metodologia de extração com a resina Chelex® mostrou-se particularmente útil, principalmente na redução do tempo e do esforço assim como na segurança do operador, já que não utiliza solventes orgânicos tóxicos. Entretanto, os resultados obtidos neste estudo mostram que esta metodologia aplica-se melhor para amostras obtidas de cadáveres carbonizados. Para as amostras de cadáveres putrefeitos, o método orgânico de extração ainda mostra melhores resultados, permitindo a obtenção de perfis genéticos de melhor qualidade.

# 5. CONCLUSÃO

O presente estudo confirmou a viabilidade do uso dos suabes de mucosa da bexiga urinária como fonte de DNA para a identificação humana de cadáveres carbonizados e putrefeitos, possibilitando a obtenção de perfis genéticos de boa qualidade para utilização no laboratório. Em comparação com os materiais de rotina, tais como ossos e músculos, os suabes da bexiga provaram ser uma forma eficiente e de baixo custo para a identificação humana.

**6. APOIO FINANCEIRO**

Edital FAPERJ N.º 08/2014: PRIORIDADE RIO - Apoio ao estudo de temas prioritários para o Governo do Estado do Rio de Janeiro - 2014

# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BRITO FCA; PRATA DRBM; MARTHA SFP; BOTTINO CG. **Evaluation of the urinary bladder suabes as a source of DNA for human identification using two different extraction methods**. *For Sci Int: Gen Suppl S*, v. 5, e484-e486, 2015.

2. BUTLER JM. **Forensic DNA Typing.** 2nd ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005, 600p.

3.INTERPOL, Disaster Victim Identification Guide (2009). Available at [www.interpol.int/Public/DisasterVictim/guide/guide.pdf](http://www.interpol.int/Public/DisasterVictim/guide/guide.pdf).