

## EPIGENÉTICA FORENSE

**Robson Willian de Melo Matos**

Bacharel em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de Brasília (UnB)

Mestre em Patologia Molecular pela Universidade de Brasília (UnB)

Especialista em Ciências Forenses IFAR/LS

E-mail: robsonwillian@gmail.com

### Resumo

A Epigenética pode ser descrita como o conjunto de mecanismos moleculares herdáveis com capacidade de regular a expressão gênica na ausência de qualquer alteração na sequência do DNA. Estes mecanismos, tais como metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e ação de RNAs não-codificantes estão associados à regulação da expressão gênica de maneira universal. Nos últimos anos, a epigenética tem ganhado ênfase nos estudos de identificação forense, em virtude de sua capacidade de revelar informações anteriormente impossíveis de serem obtidas por análises genotípicas tradicionais. Estudos epigenéticos têm mostrado ser possível a distinção entre gêmeos monozigóticos; estimar a idade de um indivíduo; identificação de tipos teciduais; entre outros, utilizando somente amostras de DNA. Desta maneira, a epigenética forense se apresenta como um ramo promissor da criminalística.

**Descritores:** Epigenética, Metilação do DNA, Criminalística, Cromatina.

## FORENSIC EPIGENETICS

### Abstract

Epigenetics can be described as the set of inheritable molecular mechanisms capable of regulating gene expression in the absence of any change in DNA sequence. Mechanisms such as DNA methylation, post-translational modifications of histones and non-coding RNAs are associated with the regulation of gene expression in a universal manner. In recent years, epigenetics has gained emphasis in forensic identification studies due to its ability to reveal information that was previously impossible to obtain by traditional genotypic analysis. Epigenetic studies have shown to be possible to distinguish between monozygotic twins; estimate the age of an individual; identification of tissue sources; among others, using only DNA samples. Thus, forensic epigenetics is presented as a promising field of criminalistics.

**Keywords:** Epigenetics, DNA methylation, Criminalistics, Chromatin.

## INTRODUÇÃO

Apesar de sua origem datar da primeira metade do Século XX, a epigenética é um dos campos mais atuais da genética e da biologia molecular e é conceituada como o ramo da ciência que estuda as variações fenotípicas herdáveis que ocorrem independentemente de alterações na sequência de pares de bases do ácido desoxirribonucleico (DNA) (LIEB *et al.*, 2006).

O fenótipo, manifestação observável de um genótipo, é ocasionado por alterações na expressão dos genes em um organismo. Alterações epigenéticas tem a capacidade de modificar a expressão gênica, mas o fazem a partir de mecanismos independentes de qualquer variação na sequência do DNA, seja por meio do recrutamento de proteínas a regiões específicas do DNA ou alteração do grau de compactação da cromatina, entre outros, impedindo assim, o acesso a complexos transcricionais ou replicacionais (MCQUEEN, 2010).

Alterações epigenéticas ocorrem essencialmente por meio de modificações químicas que incidem diretamente no DNA, em proteínas constituintes da cromatina, particularmente histonas, ou pela ação de RNA (ácido ribonucleico) não-codificantes (do inglês *non-coding RNA – ncRNA*) (SCHAUKOWITZ e KIM, 2014; VIDAKI *et al.*, 2013). Por serem geralmente menos danosas ao organismo, observam-se que essas alterações têm ocorrência mais comum do que modificações na sequência do código genético (FRAGA *et al.*, 2005). Hoje, é sabido que as modificações epigenéticas são sensíveis a pressões ambientais e até mesmo sociais, representando assim, a fronteira entre o meio ambiente e a expressão dos genes (TURNER *et al.*, 2015). Assim, as informações contidas no epigenoma (conjunto de caracteres epigenéticos) de um indivíduo são únicas (VIDAKI *et al.*, 2013).

Por se apresentar como uma nova maneira de identificar um indivíduo e suas características, a epigenética começa a despontar como um ramo da Genética Forense.

Estudos recentes têm demonstrado as possibilidades de investigação de características epigenéticas para a diferenciação de gêmeos monozigóticos, estimativa da idade de indivíduos, identificação de tipos teciduais encontrados em cenas de crime, validação de amostras de DNA encontradas em cenas de crime, entre outras (KAYSER, 2013).

Este trabalho objetiva realizar uma abordagem histórica da evolução dos conceitos da epigenética, descrever algumas das atuais aplicações em ciências forenses e discutir perspectivas para o uso e aplicação de novas técnicas relacionadas a este ramo da ciência.

## **METODOLOGIA**

A literatura utilizada neste trabalho foi buscada a partir das bases de dados do PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e ScienceDirect (<http://www.sciencedirect.com/>). Destas, foram extraídos artigos e capítulos de obras científicas a partir da busca pelos seguintes termos: *Epigenetics*, *DNA Methylation*, *Epigenetic AND Forensic*, *Histone Modification*, *ncRNA* e *Heterochromatin*. Os documentos de interesse foram selecionados preferencialmente com data de publicação a partir do ano de 2005. Referências de importância histórica também foram citadas neste trabalho.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Epigenética**

Todas as células de um humano, a exceção dos clones de linfócitos B e T, possuem a mesma sequência de pares de bases no DNA (MCQUEEN, 2010). Entretanto, apesar de compartilharem o mesmo genoma, células de organismos multicelulares possuem

distintas morfologias e funções. Este fato é explicado por diferenças quantitativas e qualitativas na expressão gênica nos vários tipos celulares de um indivíduo. A diferenciação celular ao longo do desenvolvimento fetal é um exemplo da possibilidade de um único genótipo fornecer distintos fenótipos (JABLONKA e LAMB, 2015).

Por muito tempo, acreditou-se que todas as características expressas (fenótipo) em um organismo poderiam ser explicadas somente pela sequência de bases do DNA. Todavia, esse entendimento não era capaz de explicar as diferenças fenotípicas observadas entre gêmeos monozigóticos ao longo do desenvolvimento ou os mecanismos relacionados a fenômenos genéticos como o *imprinting* parental ou inativação do cromossomo X em fêmeas. Assim, percebeu-se que a sequência do código genético não poderia, por si só, determinar todos os traços de um indivíduo (FRAGA *et al.*, 2005; CASADESÚS e NOYER-WEIDNER, 2013).

Proposto pelo biólogo do desenvolvimento Conrad Waddington, na década de 1940, o termo epigenética descreve processos de diferenciação fenotípica a partir de variações da expressão gênica, e não do conteúdo gênico em si (WADDINGTON, 1942). A descoberta inicial, e talvez a mais importante no campo da epigenética, foi a metilação de promotores gênicos no DNA que está frequentemente associada, total ou parcialmente, à inativação da expressão gênica em longo prazo (DOEFLER 2014).

Atualmente a epigenética pode ser descrita como o conjunto de mecanismos moleculares herdáveis com capacidade de regular a expressão gênica na ausência de qualquer alteração da sequência de pares de bases do DNA. Utilizando esses recursos, células são capazes de regular a expressão gênica de modo temporal e espacial, permitindo então, que um mesmo código genético seja capaz de expressar diversos fenótipos, característica dos organismos multicelulares (MCQUEEN, 2010). Entende-se hoje que existem inúmeras categorias de informação associadas ao código genético e que a sequência gênica não é suficiente para explicar todas as características fenotípicas de um indivíduo (ECKHARDT e WALTER, 2014). Nesse sentido, a epigenética é cada vez mais

aceita como um mecanismo universal de regulação da expressão gênica, ainda que pouco compreendida (GOLDBERG *et al.*, 2007).

O número de publicações científicas sobre epigenética aumentou consideravelmente nos últimos anos, sendo descrita a participação de eventos epigenéticos na oncogênese, senescência celular, plasticidade neuronal, desenvolvimento embrionário, distúrbios comportamentais e até mesmo na evolução das espécies (JABLONKA e LAMB, 2015; SZYF, 2009). Adicionalmente, vários institutos de pesquisa ao redor do mundo estão desenvolvendo iniciativas de trabalho com o intuito de sequenciar o epigenoma de diversos organismos (ECKHARDT e WALTER, 2014).

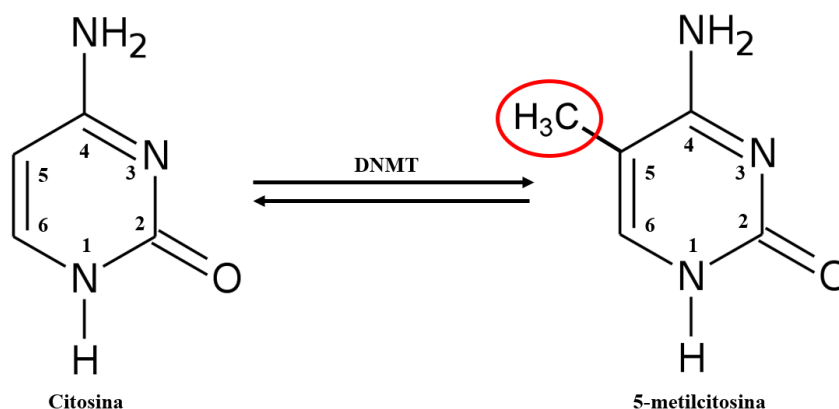
### **Mecanismos de regulação epigenética**

Os principais mecanismos de regulação epigenética descritos são: metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas e a ação de *ncRNA*. A metilação do DNA é caracterizada como alteração epigenética mais frequentemente observada e ocorre diretamente na molécula de DNA (TURNER *et al.*, 2015). As histonas, proteínas de maior importância na estrutura da cromatina, podem sofrer modificações químicas como a inserção de grupos acetil, metil, fosforil, de ubiquitina etc. (BANNISTER e KOUZARIDES, 2011). Da mesma forma, a ação de *ncRNA* interferem na estabilidade de RNAm (mensageiro do ácido ribonucleico), na tradução de RNAm e na estrutura da cromatina (GHILDIYAL e ZAMORE, 2009; MCQUEEN, 2010).

### **Metilação do DNA**

A metilação do DNA foi o primeiro mecanismo de regulação epigenética observado (HOLLIDAY e PUGH, 1975). Desta forma, sendo o mais bem caracterizado, constitui a única

modificação covalente natural do DNA em vertebrados e é considerada uma das principais interfaces entre o meio ambiente e o genoma hospedeiro (TURNER *et al.*, 2015). A metilação do DNA ocorre por meio da transferência de um grupo metil para o carbono de número cinco da molécula de citosina, formando a 5-metilcitosina (**Figura 1**) (LEENEN *et al.*, 2016).



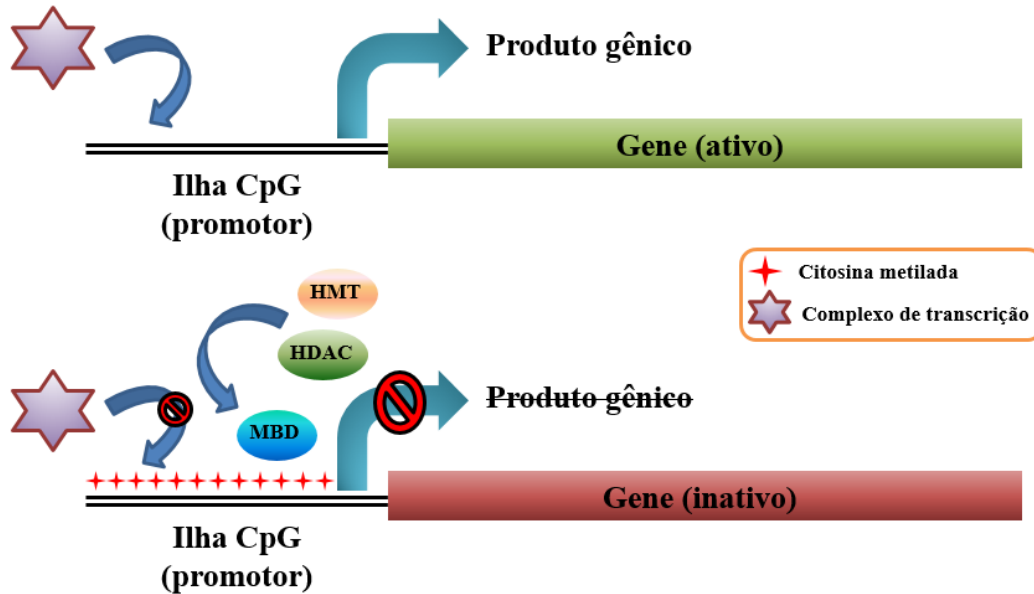
**Figura 1 - Representação esquemática da reação de metilação da citosina no DNA:** a transferência do grupo metil ocorre no carbono cinco da molécula. A reação é catalisada por enzimas da família das DNMT (DNA metiltransferases).

A metilação das citosinas não ocorre uniformemente ao longo da molécula de DNA. Estima-se que apenas 3% das citosinas do DNA humano são metiladas (NAFEE *et al.*, 2008). Entretanto, a frequência de metilação se altera drasticamente nas regiões denominadas Ilhas CpG, podendo chegar a 75% de sua composição (SKALNIK, 2013). As ilhas CpG são porções do código genético que contém sequências repetitivas do dinucleotídeo CG. Essas regiões possuem aproximadamente 1kb de extensão e se sobrepõem a aproximadamente 70% dos genes em humanos, sendo as ilhas CpG localizadas preferencialmente junto a promotores gênicos (ILLINGWORTH e BIRD, 2009).

O mecanismo de metilação é catalisado por enzimas da família DNA metiltransferase (DNMT). Esta família é composta por quatro isoformas em mamíferos. A DNMT1 possui a função de manter o padrão de metilação durante a divisão celular. A atividade da DNMT2 ainda não é bem caracterizada. Sugere-se que sua função esteja associada à metilação de moléculas localizadas fora do núcleo, como RNA transportadores

(GOLL *et al.*, 2006). Em contrapartida, a DNMT3a e DNMT3b agem diretamente no DNA e estão associadas à sua metilação *de novo*, sendo fundamentais no estabelecimento do padrão de metilação do DNA no período embrionário (estabelecimento do *imprinting* genômico) e a diferenciação celular (MCQUEEN, 2010). O padrão de metilação do DNA é específico para cada tipo de tecido. Esse é estabelecido durante a embriogênese e mantido durante o processo de mitose (DNMT1). Na meiose, o DNA dos parentais é desmetilado, sendo restabelecido na embriogênese (DNMT3a e DNMT3b) (TURNER *et al.*, 2015).

A metilação de citosinas do DNA é um sinal característico no código genético para recrutar e interagir com proteínas de ligação a domínios metil-CpG (MBD, do inglês *methyl-CpG-binding domain*). Essas proteínas reconhecem e se ligam às citosinas metiladas e, por sua vez, promovem o recrutamento de enzimas, tais como histona metiltransferase (HMT) e histona deacetilase (HDAC) que ocasionam a compactação da cromatina, tornando a região transcricionalmente inativa. Além disso, a metilação de ilhas CpG também é capaz de impedir diretamente a interação entre os promotores gênicos e complexos transcricionais (MCQUEEN, 2010; PFEIFER e HAHN, 2014) (**Figura 2**). Assim, a metilação de citosinas do DNA é caracterizada como um mecanismo epigenético de repressão da expressão gênica.



**Figura 2 - Representação esquemática do efeito da metilação em um promotor gênico:** promotores que apresentam metilação de ilhas CpG se mostram transcricionalmente silentes: a inativação do gene se dá pelo reconhecimento dessa marca de metilação por proteínas do tipo MBD que, por sua vez, recruta enzimas que promovem a remodelação de cromatina, tais como HDAC e HMT, tornando o lócus inativo. Por outro lado, promotores não metilados são permissivos à transcrição gênica.

A metilação das citosinas, apesar de ser uma modificação que pode se perpetuar por anos, é um processo reversível. A desmetilação de regiões do DNA pode ocorrer tanto pela ação enzimática, quanto pela inibição da DNMT1 (manutenção do padrão de metilação). No primeiro caso, é observada a formação de um intermediário (5-hidroximetilcitosina) antes da reversão do total da modificação química (PFEIFER e HAHN, 2014; TURNER *et al.*, 2015).

### Modificações pós-traducionais de histonas



As histonas caracterizam o principal componente proteico da cromatina. Essa compreende o arranjo tridimensional composto entre DNA e proteínas, formando o nucleossomo: estrutura que tem como objetivo a compactação do material genético no interior do núcleo celular. Essa estrutura é dinâmica, podendo assumir maior



(heterocromatina) ou menor (eucromatina) grau de compactação do DNA (GORDON *et al.*, 2013), a depender do nível de interação química entre o material genético e as histonas que compõem o nucleossomo.

No nucleossomo, as extremidades N-terminais das proteínas histonas ficam projetadas para o exterior do eixo da cadeia da cromatina. Estando nessa posição, se encontram acessíveis e sujeitas a modificações, sendo essas as regiões onde ocorrem as modificações pós-traducionais nas histonas (MCQUEEN, 2010; GORDON *et al.*, 2013). Entre elas, pode-se citar: metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, entre outras (**Tabela 1**), sendo as duas primeiras mais bem descritas. Essas modificações ocorrem em várias posições (aminoácidos) das caudas N-terminais das histonas e a mesma modificação pode ocorrer mais de uma vez em um mesmo resíduo de aminoácido da cadeia (ex.: dimetilação ou trimetilação) (TURNER *et al.*, 2015).

**Tabela 1: Modificações pós-traducionais em histonas e seus efeitos sobre a expressão gênica** (adaptado de Mcqueen, 2010).

Modificação pós-traducional	Grupo químico adicionado	Enzima que adiciona a modificação	Efeito na expressão gênica	Enzima que remove a modificação
Acetilação		Histona acetiltransferases (HAT)	Estimulação	Histona deacetilases (HDAC)
Metilação	- CH <sub>3</sub>	Histona metiltransferases (HMT)	Estimulação/Repressão	Desmetilases / Hidroxilase contendo domínio Jumonji (JMJD)
Fosforilação		Quinases	Estimulação	Fosfatases
Ubiquitinação	Proteína de 76aa.	E3 ligase	Estimulação	Deubiquitinases

Observa-se que um mesmo tipo de modificação pode ter efeitos contraditórios, a depender da histona e do resíduo de aminoácido modificado (ex.: metilação). Desse modo, as modificações pós-traducionais em histonas caracterizam um complexo e

truncado processo de controle da estrutura da cromatina e, conseqüentemente, da expressão gênica (**Tabela 2**) (MCQUEEN, 2010).

**Tabela 2: Modificações pós-traducionais em histonas mais comumente observadas e seus efeitos sobre a transcrição gênica** (adaptado de Turner *et al.*, 2010).

Resíduo de aminoácido	Histona H3				Histona H4	Histona H2B
	K4	K9	K27	K36	K79	K5
Monometilação			Ativação		Ativação	Repressão
Dimetilação	Ativação		Repressão	Ativação	Ativação	
Trimetilação	Ativação	Repressão	Repressão		Ativação + Repressão	Repressão
Acetilação	Ativação	Ativação	Ativação			Ativação

Geralmente, as modificações químicas das histonas exercem efeitos sobre a estrutura da cromatina a partir de dois mecanismos: aumento ou diminuição da interação entre o DNA e as histonas por alteração do nível de atração eletrostática entre essas moléculas, ou a partir do reconhecimento das modificações químicas e ação de efetores secundários (TURNER *et al.*, 2015). Assim, modificações químicas sobre as histonas podem alterar a estrutura da cromatina, tornando a interação mais frouxa (permissiva ao acesso de complexos transcrpcionais) ou mais compacta (inativação gênica).

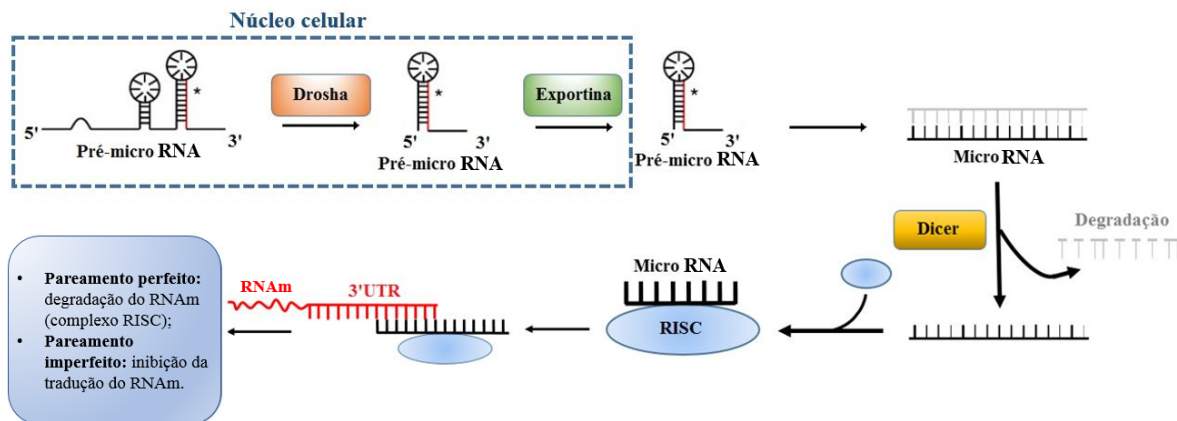
### RNA não-codificante (*ncRNA*)

Por muito tempo, acreditou-se que grande parte dos genomas eucarióticos, compostos majoritariamente por sequências repetitivas, não possuía funcionalidade alguma, sendo denominado de DNA lixo. Hoje, sabe-se que grande parte dessas sequências são transcritas em RNA, caracterizado como RNA não codificante (*ncRNA*) (GIBNEY e NOLAN, 2010; DOEFLER, 2014).

Os *ncRNA* constituem um variado grupo de RNA de tamanhos, localizações celulares e funções distintas, tais como: RNA de dupla fita (*dsRNA*), micro RNA (*miRNA*), *siRNA* (*small interfering RNA*), entre outros (MCQUEEN, 2010). Os *ncRNA* são considerados

reguladores epigenéticos e estão associados a processos como a inativação do cromossomo X, *imprinting* parental, formação de heterocromatina e regulação pós-transcricional da expressão gênica (ROYO e CAVAILLÉ, 2008; LEE, 2009).

Em mamíferos, os micro RNA (19 a 25 nucleotídeos de extensão) são descritos como os principais responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica (PASQUINELLI, 2012; PILETIC e KUNEJ, 2016). Micro RNA são gerados a partir da transcrição pela RNA polimerase II de regiões intergênicas, íntrons ou éxons de genes codificadores no genoma (PILETIC e KUNEJ, 2016). Inicialmente, essas moléculas possuem grande extensão e forma de grampo de cabelo (pré-micro RNA). Após sua transcrição, o micro RNA é submetido a dois passos consecutivos de clivagem pelas ribonucleases Drosha e Dicer, sendo exportado para o citoplasma após a primeira clivagem. É formado então o Complexo de Indução de Silenciamento do RNA (RISC), fruto da associação do micro RNA com a proteína da família das Argonautas. Este complexo atua sobre o RNA mensageiro alvo, impedindo sua tradução ou promovendo a sua degradação (**Figura 3**) (GHILDIYAL e ZAMORE, 2009).



**Figura 3 – Representação esquemática da síntese e mecanismo de ação de um micro RNA.**

Estima-se que 50% dos genes que codificam proteínas têm sua atividade regulada pela ação de micro RNA (KROL *et al.*, 2010). Esses são caracterizados como reguladores epigenéticos essenciais em diversos processos celulares (IORIO *et al.*, 2010) e correlaciona-se a alteração de sua expressão (por processos de hiper/hipometilação ou

alterações pós-traducionais de histonas na região de seus promotores) a estados patológicos como câncer, doenças autoimunes, cardiovasculares e neurodegenerativas (PILETIC e KUNEJ, 2016).

### **Epigenética forense**

A criminalística sempre busca inovar os seus métodos, de maneira a elucidar a autoria e dinâmica de um crime de forma incontestável. Por muito tempo, a observação de polimorfismos na sequência de DNA satélites ou DNA mitocondrial tem sido utilizada na identificação criminal. Entretanto, esses métodos, apesar de corriqueiramente empregados na identificação forense, carregam limitações, tais como: impossibilidade de distinção entre gêmeos monozigóticos, de identificação de tipos teciduais encontrados em cenas de crime, de estimar a idade de um indivíduo, entre outros (GUNN *et al.*, 2014).

A análise de alterações epigenéticas, particularmente do padrão de metilação do DNA, pode ser uma ferramenta útil para a identificação de indivíduos. Além da identificação do tipo de material biológico encontrado, esse tipo de investigação também possibilita a avaliação de como e quando o material biológico foi exposto à cena de crime, além de viabilizar estimativas de idade dos envolvidos em uma cena de crime (KADER e GHAI, 2015/GUNN *et al.*, 2014).

### **Identificação de tipos teciduais pelo DNA**

Frequentemente, são encontrados fluidos biológicos em uma cena de crime. A perícia criminal, além de identificar a autoria de um crime, tem a necessidade de explicar como, onde, quando e por que o fato delituoso ocorreu. Assim, todo vestígio de natureza biológica deve ser identificado inequivocamente, a fim de reconstruir a dinâmica dos fatos

(LEE *et al.*, 2012). Uma vez que a sequência de DNA é idêntica entre os tecidos, não é possível identificar um tipo tecidual a partir da mera análise da sequência desse tipo de material genético.

Uma vez que a metilação do DNA é um mecanismo de controle da expressão gênica, espera-se que o seu padrão seja variável em diferentes tecidos. Hoje, sabe-se que existem *loci* cromossômicos que apresentam padrões específicos de metilação do DNA para cada tipo de tecido. Esses segmentos são denominados regiões diferentemente metiladas de maneira tecido-específica (*tDMR*, do inglês *tissue-specific differentially methylated regions*). Tais regiões caracterizam-se como marcadores apropriados para a identificação de tecidos ou fluidos biológicos em cenas de crime (ECKHARDT *et al.*, 2006).

Em 2011, Frumkin *et al.*, conseguiu identificar amostras de saliva, sangue, sêmen e pele por meio de análise do padrão de metilação do DNA. Neste estudo, cada amostra foi submetida à PCR sensível à metilação, seguido de eletroforese capilar. A amplificação das amostras de DNA ocorreu de modo diferencial entre os tecidos, permitindo assim sua diferenciação. Outros estudos, utilizando técnicas de conversão por bissulfito ou pirosequenciamento, também se mostraram bem-sucedidos na discriminação de tipos teciduais, indicando novas *tDMR* e mostrando, cada vez mais, o grande potencial desse tipo de metodologia para a identificação de materiais biológicos, pois possibilita diferenciar vários tipos teciduais em uma única análise, sem conhecimento prévio da amostra (KADER e GHAI, 2015; LEE *et al.*, 2012).

### **Autenticação de amostras de DNA**

A avaliação de como e quando o material biológico foi exposto à cena do crime traz ao universo das ciências forenses o conceito de autenticação de amostras de DNA. A análise do DNA encontrado em local de crime é tratada como uma prova de identificação praticamente irrefutável, pois o DNA analisado é considerado genuíno. Todavia,

atualmente, métodos e aparelhos para síntese de DNA são de simples manuseio e de baixo custo, permitindo assim, a produção de moléculas sintéticas e a possibilidade de introdução de DNA estranho à cena de crime com o intuito de incriminar pessoa sem relação com o delito (VIDAKI *et al.*, 2013).

Em 2010, Frumkin *et al.*, comparou sequências de DNA genuínas e sintéticas presentes em amostras de saliva e sangue posicionadas em diferentes superfícies. Os DNA artificiais foram obtidos por três métodos distintos (reação em cadeia da polimerase – PCR, amplificação de todo o genoma – WGA e clonagem molecular). Para identificação das moléculas de DNA, foi empregada a análise de DNA microssatélite. A partir dessa análise, não foi possível discernir quais amostras de DNA eram genuínas ou sintéticas. Entretanto, ao analisar o padrão de metilação do DNA coletado, observou-se que as amostras sintéticas não possuíam *loci* metilados, enquanto que as amostras genuínas apresentavam padrão de metilação, indicando que o padrão de metilação do DNA não é reproduzido por nenhum dos métodos de síntese de DNA empregados. Em suma, a análise do padrão de metilação do DNA entre as amostras foi capaz de diferenciar as amostras genuínas das sintéticas do material genético investigado.

Com a rápida evolução tecnológica, o processo de síntese de DNA pode ser realizado de maneira simples e com baixo custo. Assim, a técnica de análise de metilação diferencial entre moléculas de DNA encontradas na cena do crime (autenticação do DNA) se torna imprescindível para que o estudo do DNA forense mantenha sua credibilidade em decisões judiciais e, sobretudo, a fim de elucidar a dinâmica e autoria de um crime de maneira inequívoca (FRUMKIN *et al.*, 2010; VIDAKI *et al.*, 2013; GUNN *et al.*, 2014).

### **Estimação da idade de um indivíduo por meio do DNA**

A estimativa da idade de um indivíduo é um dado importante tanto para fins cíveis quanto criminais (GUNN *et al.*, 2014). Usualmente, a idade de um indivíduo é estimada

pela análise do desenvolvimento ósseo ou desgaste dentário (LYNNERUP *et al.*, 2010). Todavia, tais análises apresentam a limitação da necessidade da presença de dentes e ossos, nem sempre disponíveis em uma cena de crime (GUNN *et al.*, 2014).

Recentemente, a análise do nível de metilação do DNA tem despontado como um método inovador e confiável para a estimação da idade cronológica de um indivíduo (VIDAKI *et al.*, 2013). Sabe-se que o padrão de metilação do DNA é modificado ao longo da vida de um indivíduo, sendo alguns *loci* hiper ou hipometilados (FRAGA e ESTELLER, 2007). Novos sítios de ilha CpG que tem o padrão de metilação alterado com o tempo têm sido descobertos. Alguns apresentam alterações nesse padrão de maneira quase linear ao longo do tempo, caracterizando-se assim como candidatos apropriados para estudos de estimação de idade (BOCKLANDT *et al.*, 2011; KOCH e WAGNER, 2011).

Em 2014, Yi *et al.*, descreve um método de estimação da idade cronológica analisando sítios de ilha CpG de fragmentos gênicos nos quais o padrão de metilação está relacionado a idade (*TBOX3*, *GPR137*, *ZIC4*, *ZDHHC22*, *MEIS1*, *UBE2E1*, *PTDSS2* e *UBQLN1*). As amostras analisadas (sangue periférico) foram obtidas de indivíduos com idade variando entre 11 e 72 anos. O padrão de metilação dos *loci* investigados foi quantificado por meio da técnica de espectrometria de massas e, utilizando um modelo matemático de regressão linear multivariada, foi realizada a estimação da idade dos indivíduos investigados. Essa metodologia foi capaz de estimar as idades cronológicas individuais com elevada acurácia ( $R^2 = 0,918$ ). Além disso os valores estimados apresentam elevada correlação com o valor real ( $r = 0,91$ ).

Em 2015, Zbiec-Piekarska *et al.*, relata a análise de outros cinco potenciais marcadores de DNA para a estimação de idade cronológica em humanos (*ELOVL2*, *C1orf132*, *TRIM59*, *KLF14* e *FHL2*). Foram utilizadas amostras de sangue periférico de candidatos com idades entre 2 e 75 anos. O método de análise utilizado para avaliar os padrões de metilação dos *loci* foi o pirosequenciamento de DNA. Utilizando um modelo de regressão linear multivariada para análise simultânea de todos os sítios de ilha CpG

testados nas amostras sanguíneas, foi encontrado um desvio médio absoluto de apenas 4,5 anos em relação ao valor real.

A utilização da técnica de pirosequenciamento apresenta a grande vantagem por requerer menores quantidades de DNA e de ser uma técnica de fácil execução, sendo um modelo viável para sua aplicação na criminalística (PARK *et al.*, 2016). O mesmo autor relata a análise do padrão de metilação dos *loci* (*ELOVL2*, *ZNF4234* e *CCDC102*) por pirosequenciamento. No modelo de regressão linear multivariada utilizado, chegou-se ao desvio médio absoluto de apenas 3,3 anos em um dos grupos amostrais.

Tais resultados mostram como a análise do padrão de metilação do DNA é uma interessante ferramenta para estimar a idade cronológica de indivíduos, sendo assim um método promissor para a criminalística. Desta forma, este tipo de análise se sobressai diante das análises rotineiramente utilizadas pela antropologia forense, apresentando menos limitações no que se refere às amostras utilizadas.

### **Distinção de gêmeos monozigóticos a partir da análise do DNA**

Observa-se entre gêmeos monozigóticos diferenças morfológicas, comportamentais e distintas susceptibilidades a doenças ao longo do envelhecimento (BELL e SPECTOR, 2012). Essas dessemelhanças são explicadas por diferenças na expressão gênica, acumuladas ao longo da vida por influência de distintas pressões ambientais. (FRAGA *et al.*, 2005). Em 2005, Fraga *et al.*, em um estudo pioneiro, avaliando o padrão de metilação do DNA e de acetilação de histonas de 40 pares de gêmeos monozigóticos, observou que, quanto mais avançada for a idade dos irmãos, maiores diferenças eram observadas no padrão de metilação do DNA e de acetilação de histonas, resultando em diferenças na expressão gênica.

Em 2011, Li *et al.*, testando amostras de sangue de 22 pares de gêmeos monozigóticos, apontou diferenças significativas no padrão de metilação do DNA em 377 sítios de ilha CpG, de um total de 27.000 sítios analisados. Em 2013, Martino *et al.*



demonstrou que alterações epigenéticas em gêmeos monozigóticos podem ser visualizadas logo após o nascimento. Esse autor também relata a observação de diferenças no padrão de metilação do DNA entre gêmeos ainda durante a gestação, provavelmente causadas por diferenças no ambiente intra-uterino.

Apesar de configurarem uma eventualidade na maioria das populações (um nascimento a cada 250) e por compartilharem a mesma sequência de DNA, esse pequeno grupo populacional é motivo de preocupação para a criminalística devido a difícil discriminação entre os indivíduos. Dessa maneira, o despontar das análises epigenéticas surgem para preencher as limitações das técnicas atuais e tornar a identificação criminal cada vez mais acurada e incontestável.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Apesar de primeiramente descrita na década de 1940, a epigenética despertou a atenção da comunidade científica há poucos anos. O recente estabelecimento de consórcios internacionais para a elaboração de projetos de epigenoma ressalta a importância crescente desse campo de estudo (ECKHARDT e WALTER, 2014). Com o avanço do conhecimento sobre esse ramo da ciência, descobre-se que seus mecanismos se apresentam cada vez mais interconectados, compondo uma complexa rede de informações além da sequência de pares de bases do DNA (PILETIC e KUNEJ, 2016).

Pesquisando-se pelo termo epigenética nas principais plataformas de periódicos científicos, encontra-se uma grande quantidade de estudos relacionando a epigenética aos mais diversos temas, sendo prevalente o estudo sobre o câncer (YOU e JONES, 2012). Observa-se também um aumento de relevância da epigenética em estudos com objetivos forenses. A investigação do epigenoma representa um novo horizonte para as

investigações criminais, pois permite a obtenção de informações antes indisponíveis por meio do uso de técnicas usuais de biologia forense.

Alterações epigenéticas representam uma ponte de interação direta entre o meio ambiente e a modulação da expressão gênica. Assim, pode-se dizer que o epigenoma de um indivíduo representa a sua história de vida, por meio da combinação de fatores genéticos, ambientais e estocásticos (MARTIN *et al.*, 2015). Essa nova camada de informação fornece um valioso conjunto de dados a ser explorado pela criminalística, a fim de tornar as perícias de identificação incontestáveis.

Além do apresentado neste trabalho, as alterações no epigenoma de um indivíduo também são apontadas como sendo capazes de determinar características tais como: a determinação da origem parental de alelos, sexo do indivíduo e até mesmo as causas ou circunstâncias de uma morte (VIDAKI *et al.*, 2013). Devido à complexidade das interações entre mecanismos epigenéticos, pode-se dizer que estamos somente no início da exploração desse ramo da ciência. Dessa maneira, o desenvolvimento de novas técnicas e tecnologias contribuirá imensamente para a descrição dos mecanismos moleculares que controlam as alterações epigenéticas e para sua detecção (MARTIN *et al.*, 2015).

Apesar de serem recentes os estudos de epigenética forense, sua aplicação já se mostra apropriada em situações que simulam cenas de crime (FRUMKIN *et al.*, 2010). Assim, estudos epigenéticos se mostram promissores na área forense, tendo muito a contribuir para a criminalística. Para isso, são necessários a pesquisa e o desenvolvimento de métodos validados, de baixo custo e que se adaptem a rotina dos laboratórios de ciências forenses (GUNN *et al.*, 2014).

## REFERÊNCIAS

BANNISTER, A.J.; KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Research**, 21, p. 381-395, 2011.

- BELL, Jordana T.; SPECTOR, Tim D. DNA methylation studies using twins: what are they telling us?. **Genome biology**, v. 13, n. 10, p. 1, 2012.
- BOCKLANDT, Sven et al. Epigenetic predictor of age. **PLoS one**, v. 6, n. 6, p. e14821, 2011.
- CASADESÚS, J.; NOYER-WEIDNER, M. Epigenetics. **Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)**, Academic Press, San Diego, p. 500-503, 2013.
- DOEFLER, W. Epigenetics: Introduction, Caveats, and Historic Overview. **Reference Module in Biomedical Sciences**, 3<sup>rd</sup> Edition, Elsevier, 2014.
- ECKHARDT, Florian et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature genetics**, v. 38, n. 12, p. 1378-1385, 2006.
- ECKHARDT, F.; WALTER, J. Epigenomics – Understanding the epigenetic landscape of cells. **Reference Module in Biochemical Research**, 3<sup>rd</sup> edition, Elsevier, 2014.
- FRAGA, Mario F. et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10604-10609, 2005.
- FRAGA, Mario F.; ESTELLER, Manel. Epigenetics and aging: the targets and the marks. **Trends in Genetics**, v. 23, n. 8, p. 413-418, 2007.
- FRUMKIN, Dan et al. Authentication of forensic DNA samples. **Forensic science international: genetics**, v. 4, n. 2, p. 95-103, 2010.
- FRUMKIN, Dan et al. DNA methylation-based forensic tissue identification. **Forensic Science International: Genetics**, v. 5, n. 5, p. 517-524, 2011.
- GHILDIYAL, Megha; ZAMORE, Phillip D. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 2, p. 94-108, 2009.
- GIBNEY, E. R.; NOLAN, C. M. Epigenetics and gene expression. **Heredity**, v. 105, n. 1, p. 4-13, 2010.
- GOLDBERG, Aaron D.; ALLIS, C. David; BERNSTEIN, Emily. Epigenetics: a landscape takes shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635-638, 2007.
- GOLL, Mary Grace et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 395-398, 2006.

GORDON, *et al.* Chromatin. **Brenner's Encyclopedia of Genetics, 2nd edition, Volume 1.** P 538-541, 2013.

GUNN, Peter; WALSH, Simon J.; ROUX, Claude. The nucleic acid revolution continues—will forensic biology become forensic molecular biology?. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 44, 2014.

HOLLIDAY, Robin; PUGH, John E. DNA modification mechanisms and gene activity during development. **Science**, 187(4173), p. 226-232, 1975.

ILLINGWORTH, Robert S.; BIRD, Adrian P. CpG islands—'a rough guide'. **FEBS letters**, v. 583, n. 11, p. 1713-1720, 2009.

IORIO, Marilena V.; PIOVAN, Claudia; CROCE, Carlo M. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n. 10, p. 694-701, 2010.

JABLONKA, E.; LAMB, M. J. Epigenetic Inheritance. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences (Second Edition)**, Elsevier, Oxford, p. 832-838, 2015.

KADER, Farzeen; GHAI, Meenu. DNA methylation and application in forensic sciences. **Forensic science international**, v. 249, p. 255-265, 2015.

KAYSER, M. Forensic DNA Phenotyping: DNA testing for externally visible characteristics. **Encyclopedia of forensic sciences. Academic, Waltham**, p. 369-374, 2013.

KOCH, Carmen M.; WAGNER, Wolfgang. Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. **Aging (Albany NY)**, v. 3, n. 10, p. 1018-1027, 2011.

KROL, Jacek; LOEDIGE, Inga; FILIPOWICZ, Witold. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, n. 9, p. 597-610, 2010.

LEE, Jeannie T. Lessons from X-chromosome inactivation: long ncRNA as guides and tethers to the epigenome. **Genes & development**, v. 23, n. 16, p. 1831-1842, 2009.

LEE, Hwan Young *et al.* Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. **International journal of legal medicine**, v. 126, n. 1, p. 55-62, 2012.

LEENEN, Fleur AD; MULLER, Claude P.; TURNER, Jonathan D. DNA methylation: conducting the orchestra from exposure to phenotype?. **Clinical Epigenetics**, v. 8, n. 1, p. 92, 2016.

- LI, Chengtao et al. Identical but not the same: the value of DNA methylation profiling in forensic discrimination within monozygotic twins. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**, v. 3, n. 1, p. e337-e338, 2011.
- LIEB, Jason D. *et al.* Applying whole-genome studies of epigenetic regulation to study human disease. **Cytogenetic and genome research**, v. 114, n. 1, p. 1-15, 2006.
- LYNNERUP, Niels et al. Ascertaining year of birth/age at death in forensic cases: a review of conventional methods and methods allowing for absolute chronology. **Forensic science international**, v. 201, n. 1, p. 74-78, 2010.
- MCQUEEN, Charlene. **Comprehensive toxicology**. Volume 2. Capítulo 2.18. Newnes, 2010.
- MARTIN, Tiphaine et al. Twin Studies and Epigenetics. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences (Second Edition)**, Elsevier, Oxford, p. 683-702, 2015.
- MARTINO, David et al. Longitudinal, genome-scale analysis of DNA methylation in twins from birth to 18 months of age reveals rapid epigenetic change in early life and pair-specific effects of discordance. **Genome biology**, v. 14, n. 5, p. 1, 2013.
- NAFEE, T. M. et al. Review article: epigenetic control of fetal gene expression. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 115, n. 2, p. 158-168, 2008.
- PARK, Jong-Lyul et al. Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. **Forensic Science International: Genetics**, v. 23, p. 64-70, 2016.
- PASQUINELLI, Amy E. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 271-282, 2012.
- PFEIFER, G.P.; HAHN, M.A. Relationships between DNA and Histone Modifications. **Reference Module in Biomedical Sciences, 3<sup>rd</sup> Edition**, 2014.
- PILETIC, Klara; KUNEJ, Tanja. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2405-2419, 2016.
- ROYO, Hélène; CAVAILLÉ, Jérôme. Non-coding RNAs in imprinted gene clusters. **Biology of the Cell**, v. 100, n. 3, p. 149-166, 2008.
- SCHAUKOWITCH, Katie; KIM, T.-K. Emerging epigenetic mechanisms of long non-coding RNAs. **Neuroscience**, v. 264, p. 25-38, 2014.

- SKALNIK, D. G. Chromatin: Methyl-CpG-Binding Proteins. **Elsevier**, 2013.
- SZYF, Moshe. The early life environment and the epigenome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1790, n. 9, p. 878-885, 2009.
- TURNER, J. D.; KIRSCHNER, S. A.; MOLITOR, A. M.; EVDOKIMOV, K.; MULLER, C. P. Epigenetics. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences (Second Edition)**, Elsevier, Oxford, p. 839-847, 2015.
- VIDAKI, Athina; DANIEL, Barbara; COURT, Denise Syndercombe. Forensic DNA methylation profiling—Potential opportunities and challenges. **Forensic Science International: Genetics**, v. 7, n. 5, p. 499-507, 2013.
- WADDINGTON, C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**. no. 150, p. 563-565, 1942.
- YI, Shao Hua et al. Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction. **Forensic Science International: Genetics**, v. 11, p. 117-125, 2014.
- YOU, Jueng Soo; JONES, Peter A. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?. **Cancer cell**, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2012.
- ZBIEC-PIEKARSKA, Renata et al. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. **Forensic Science International: Genetics**, v. 17, p. 173-179, 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marciano Régis Rubini pelas contribuições ao conteúdo deste trabalho.

Não foram declarados conflitos de interesse associados à publicação deste artigo.