

Eixo Temático ET-01-002 - Áreas de Atuação do Biólogo

EVIDÊNCIAS EPIGENÉTICAS PARA ANÁLISE FORENSE

Yorran Hardman Araujo Montenegro¹, Rosália Santos Ferreira², Ellen Rachel de Almeida Martins³, Maria Karoline da Silva Marcelino⁴, Denise de Queiroga Nascimento⁵

¹Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). E-mail: yorran_montenegro@hotmail.com.

²Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). E-mail: rosaliaferreira496@gmail.com.

³Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). E-mail: ellenmartinsjp@gmail.com.

⁴Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). E-mail: karollmarcelinos@gmail.com.

⁵Mestranda em Genética, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) E-mail: dennise.queiroga@gmail.com.

RESUMO

Epigenética é definida como uma alteração herdável na expressão gênica, incluindo modificações na atividade de proteínas histonas, metilação do DNA, remodelação da cromatina por RNAs, e não-codificação de alguns produtos gênicos sem ao menos alterar as bases nitrogenadas do DNA. Objetivando saber os principais avanços epigenéticos que podem ser aplicados ao âmbito forense, foi realizado um levantamento bibliográfico, analisando responder à seguinte pergunta condutora: quais as principais evidências e avanços da epigenética para análise forense? Optou-se por selecionar artigos com delineamento experimental e resultados que viessem a contribuir com a construção das discussões sobre as evidências epigenéticas no campo da forense. Foram encontrados evidências de classificação epigenética na diferenciação de idade dos indivíduos, podendo-se através dela diferenciar um gêmeo monozigótico de outro, por exemplo. Tais evidências também puderam ser analisadas quanto ao estilo de vida de um indivíduo e como pode-se compreender de forma intrínseca os hábitos e a construção dessas verdadeiras marcas em seu material genético.

Palavras-chave: Expressão gênica; Forense; Epigenética.

INTRODUÇÃO

A ciência forense a cada ano vem avançando em novos conhecimentos técnicos e científicos a fim de solucionar casos criminais. Um desses avanços é a utilização da epigenética para o reconhecimento de indivíduos visando à redução quanto ao número de suspeitos. O termo epigenética ao longo do tempo foi sendo modificada através de várias pesquisas científicas e é definido como uma alteração herdável na expressão gênica, sem alteração nas bases de nucleotídeos do DNA. Que de acordo com Kader; Ghai (2015) inclui modificações na atividade de proteínas histonas, metilação do DNA, remodelação da cromatina por RNAs e não-codificação de alguns produtos gênicos.

Quando se fala no padrão de metilação do DNA consiste na adição de um grupamento metil (-CH₃) a base citosina. Além de ser influenciada pela senescência e o estilo de vida daquele indivíduo, a metilação torna-se um forte indício da possível idade, sexo e fenótipo dos suspeitos em casos forenses, analisados por meio de marcadores moleculares (KADER; GHAI, 2015; LEE et al., 2015).

Através de fluídos corporais presentes em cenas de crime, são extraídas amostras de DNA para análise em laboratórios. Na maioria das vezes esse material é escasso e sensível, tendo que as técnicas utilizadas devem ser cuidadosamente aplicadas para que não haja perda do mesmo. A análise do DNA metilado é um benefício que já demonstra alta especificidade, além

de um consumo mínimo de material coletado e pouca susceptibilidade à degeneração por fatores externos e ambientais (Kader & Ghai, 2015). Vários estudos demonstram esta especificidade por amostras de sangue, sêmen, suor, saliva, tecidos epidérmicos como também a distinção epigenética de gêmeos idênticos, anteriormente impossíveis de se diferenciar. Outra aplicabilidade se dá pelo estudo da idade prevista e a idade cronológica do suspeito por amostras de sêmen e saliva, estimada pelas alterações químicas que o DNA sofre ao longo da vida (LEE et al., 2015; MATOS, 2016).

Desse modo este trabalho tem como objetivo explorar as principais evidências epigenéticas em âmbito forense, trazendo os seus atuais mecanismos para a resolução de crimes e como essas técnicas podem ser aplicadas de forma intrínseca à investigação criminal.

METODOLOGIA

A revisão sistemática da literatura é um estudo secundário, onde podemos confrontar resultados contraditórios, analisar, e sintetizar assuntos propostos, além de ser um sistema de abrangência ao tema escolhido (GALVÃO; PEREIRA, 2014).

A pesquisa dos artigos foi realizada durante o período de 12 a 18 de março de 2018, analisando responder à seguinte pergunta condutora: quais as principais evidências e avanços da epigenética para análise forense?. Para a busca dos artigos, foram utilizadas combinações de palavras-chave, sendo estas: “*Forensic Epigenetics*”, “*Methylation of DNA*”, “*CpG Islands*”, “*Forensic Genetics*”, “*Molecular markers*”, “*Epigenetic analysis*”.

Nesse contexto, optou-se por selecionar trabalhos nos idiomas inglês e português com delineamento experimental e resultados satisfatórios, publicados entre 2008 até a atualidade, garantindo assim um levantamento bibliográfico atualizado. Os critérios de exclusão são aplicados aqueles artigos que não possuem correlação com essa análise e técnica molecular como também de datas anteriores a citada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionados 7 artigos para o estabelecimento de uma discussão mais abrangente envolvendo o tema do presente trabalho. A relação dos artigos selecionados estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 2. Relação de Artigos selecionados para a revisão bibliográfica sistemática organizados por nome do artigo, autor e ano.

ARTIGO	AUTOR	ANO
Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações.	COSTA; PACHECO	2013
Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração.	GALVÃO; PEREIRA	2014
DNA methylation and application in forensic sciences.	KADER; GHAI	2015
Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study.	LEE et al.	2015
DNA methylation profiling for a confirmatory test for blood, saliva, semen, vaginal fluid and menstrual blood.	LEE et al.	2016
Epigenetic discrimination of identical twins from blood under the forensic scenario.	VIDAKI et al.	2017a
DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing.	VIDAKI et al.	2017b

(Fonte: Os autores).

Uma das maiores dificuldades que esporadicamente podem ocorrer em investigações criminais é na identificação entre gêmeos, especialmente os monozigóticos, no qual

compartilham o mesmo genoma. Esse compartilhamento de características genéticas quase idênticas dificulta, por exemplo, a identificação do verdadeiro culpado em uma investigação criminal, levando em consideração a identidade do material genético. Com o estudo dos padrões epigenéticos, segundo Vidaki et al., (2017), foi possível uma diferenciação, graças aos padrões de metilação entre ambos os fenótipos que podem ser observados ao nível de todo o genoma.

Evidenciado por um estudo pioneiro onde foram coletadas amostras de sangue de 10 pares de gêmeos do sexo feminino com idades entre 52 a 56 anos, mostrou-se pequenas variações de metilação do DNA que podem ser atribuídos a fatores externos como exposições ambientais e doenças. A identificação tDMSs, por par de gêmeos MZ pelos níveis de metilação de todas as ilhas CpG (regiões de repetição de citosina e guanina) que foram testados e avaliados utilizando a técnica da reação em cadeia de polímerase em tempo real (qPCR) e obtiveram sucesso ao observar que as diferenças nos padrões de metilação de gêmeo para outro possuíam um diferencial de 19 tDMs (67,85%), enquanto 9 tDMSs (32,15%) deram diferenças de metilação menores ($< 0,1$). O DNA de interferência também mostrou evidências em que um dos gêmeos apresentou um alto perfil de metilação, enquanto outro demonstrou metilação intermediária, não esperada (VIDAKI et al., 2017).

Para uma aplicabilidade forense, o estudo ainda requer o aprimoramento de técnicas para obtenção de dados novos para a diferenciação pelo número ideal de marcadores epigenéticos na identificação entre gêmeos MZ (VIDAKI et al., 2017).

As evidências entre marcas epigenéticas pela influência do meio em mamíferos não é bem definida. No entanto, hoje, sabe-se que a partir dos padrões de hipo- ou hipermetilação em um DNA, pode-se definir a idade relativa dos indivíduos. Entre os alvos de investigações quanto a relação entre idade de um indivíduo e o meio, encontra-se os genes H19 e IGF2. Os estudos pioneiros utilizando estes genes se deu pela observação de que, com o passar dos anos, com o número avançado de divisões celulares, as células perdiam parte de sua capacidade de metilar algumas regiões do DNA, e entre estas, encontram-se as supracitadas (KADER; GHAI, 2015).

Essas observações levaram os pesquisadores a perguntarem-se: como, através dos padrões de metilação pode-se estudar o envelhecimento nos mais variados tecidos? A resposta para essa pergunta surgiu logo em seguida. Ao se analisar os graus de metilação em pessoas com idade relativa de 45 e 75 anos de idade, observou-se que esses padrões mudaram e conseqüentemente houve uma baixa quanto aos sítios de metilação no material genético, passando a concluir que o próprio organismo não conseguiu manter uma resposta eficiente ao ambiente com o passar dos anos (LEE et al., 2015).

Os diferentes graus de metilação de um organismo variam a partir dos tecidos que estão sendo investigados. Como pode ser percebido na Figura 01 abaixo, as variações e os graus de metilação correspondentes com a idade do indivíduo comportam-se de diferentes formas nos diferentes marcadores utilizados.

Como forma de uniformizar o quadro de descobertas, Vidaki et al. (2017b) incutiram um gráfico que traz em seus eixos os paradigmas comparativos entre a idade estipulada pelos graus de metilação e a idade real dos indivíduos analisados (Figura 2).

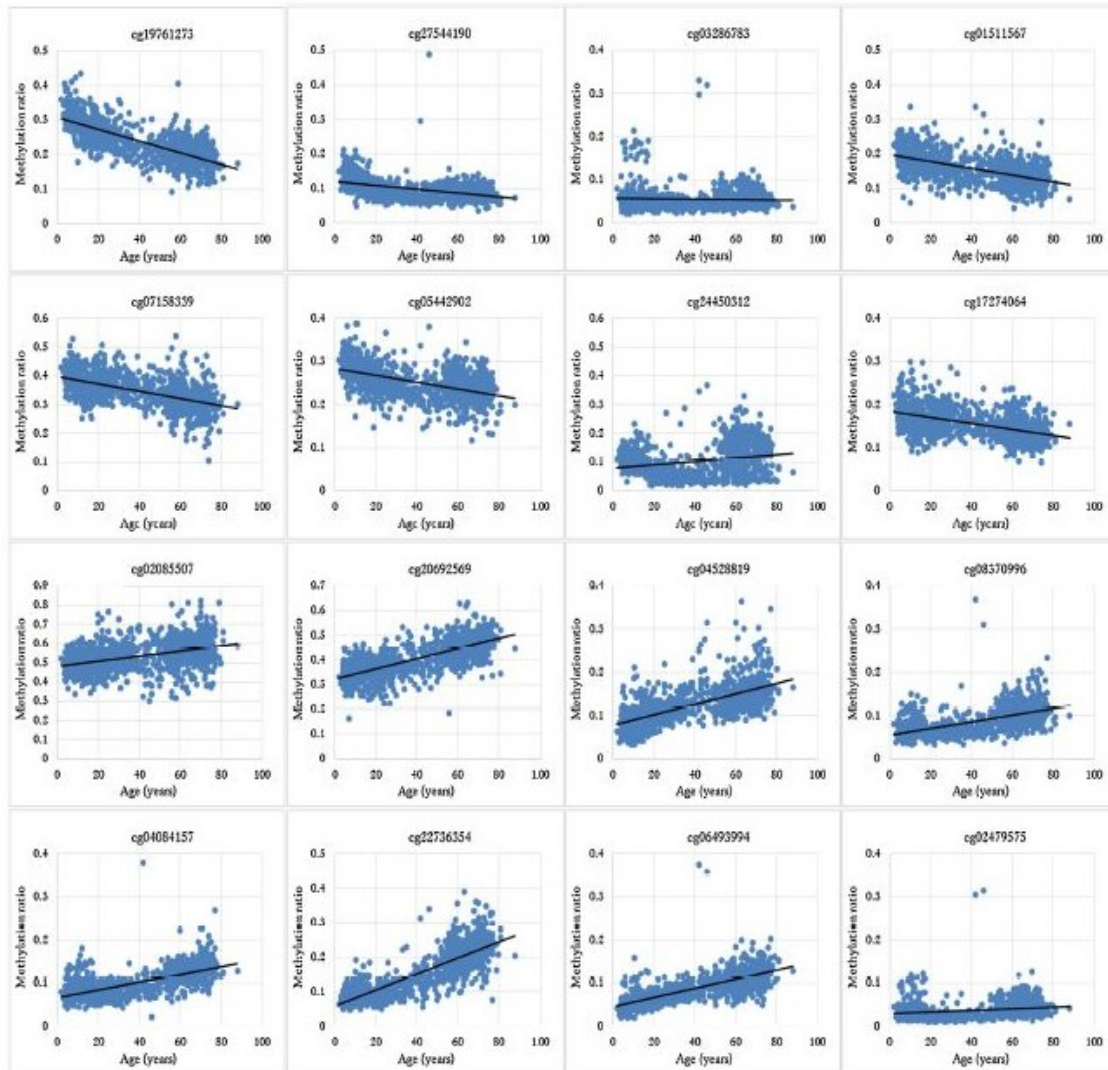


Figura 1. Marcadores utilizados na análise dos diferentes graus de metilação nos tecidos do corpo. Fonte: VIDAKI et al. (2017b).

Como se pode observar, a margem de erro aplicada na análise relativa da idade dos indivíduos apresentou uma diferença mínima, no entanto, novos estudos precisam ser realizados para uma constatação mais acurada quanto a predição da idade relativa dos indivíduos. Mesmo com a margem de erro apresentada, em nada se tira o potencial de utilização dessa técnica aplicada às análises forenses, não só em investigações criminais, mas também na aplicabilidade relativa da genética no entendimento dos perfis arqueológicos.

Segundo Kader; Ghai (2015), a aplicação da análise epigenética pode revelar uma grande aplicabilidade nas investigações forenses, especialmente no que concerne aos modos de vida dos indivíduos podendo-se inferir sobre as características e hábitos que rodeavam ou rodeiam a vida deste. Para isso, a epigenética teve uma terceira grande aplicação que foi na inferência desses hábitos de vida.

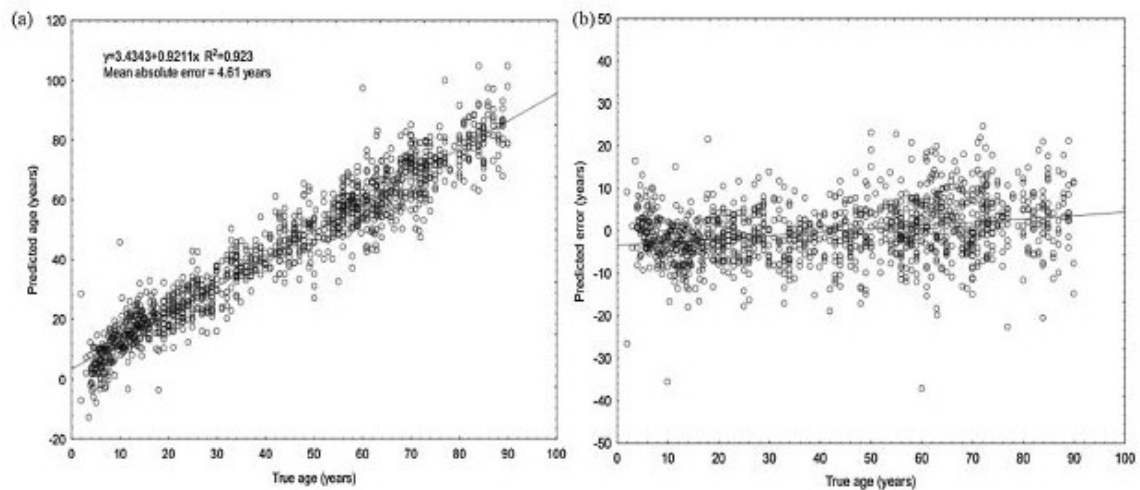


Figura 2. Método de predição da idade dos indivíduos através do grau de metilação. (a) Idade cronológica dos indivíduos. (b) Erros previstos na predição da idade relativa dos indivíduos, com uma margem de 5 anos. Fonte: VIDAQUI et al. (2017b).

A fim de informar os outros possíveis alvos de metilação e, conseqüentemente, susceptibilidade a análise epigenética, cita-se os aspectos nutricionais, especialmente adquiridos pela mãe em gestação. A dieta durante a gestação funciona como um indicador para o organismo do feto quanto as condições que ele irá enfrentar quando nascer. Observa-se que, a partir dos hábitos alimentares e dos hábitos de vida da mãe, por exemplo, o uso de drogas como álcool e tabaco, gera uma marca epigenética no organismo do feto, levando ao surgimento, quando adulto, de doenças associadas ao sistema cardiovascular, sistema endócrino como por exemplo, a susceptibilidade a diabetes. A utilização da epigenética nesses casos surge como uma ferramenta de identificação do perfil gênico de um indivíduo a partir dos seus hábitos de vida, inferindo sobre o perfil de metilação em nível de DNA (KADER; GHAI, 2015).

CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento dos novos métodos de investigação forense, hoje se têm levantado hipóteses a aplicabilidade das novas descobertas não só em um cenário investigativo no âmbito criminal, mas também em uma análise arqueológica e forense quanto à história das populações humanas. A epigenética é uma ferramenta recente, descoberta em meados dos anos 2000 e necessita ser mais explorada. Apenas com o desenvolvimento de novas pesquisas, pode-se compreender a dimensão da aplicabilidade dessa ferramenta no desenvolvimento de marcadores de análise epigenético. Não se compreende em sua totalidade como o meio pode inferir no DNA sem modificar suas bases nitrogenadas, e por isso, espera-se que em um futuro próximo, a elucidação dessa evidência possa ser esclarecida.

Hoje sabe-se que a partir das análises dos marcadores epigenéticos, especialmente em zonas de metilação, o potencial de aplicabilidade dessas técnicas só aumenta. Primeiro, pode-se observar diferenças relativas quanto aos indivíduos por marcas epigenéticas únicas em seu DNA pelas suas experiências pessoais. Por exemplo, no caso dos gêmeos MZ, as experiências diferenciadas na vivência dos indivíduos traçaram um perfil de diferenciação em nível de metilação. Esse exemplo reflete em como os hábitos de vida influenciam na atividade de regulação de metilação no próprio DNA e como as impressões dessas experiências podem ser marcadas e, até mesmo, herdadas de uma geração para outra.

REFERÊNCIAS

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C.. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 2, n. 32, p.125-126, 2013.

GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 1, p. 183-184, 2014. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742014000100018>

KADER, F.; GHAI, M. DNA methylation and application in forensic sciences. **Forensic Science International**, v. 249, p. 255-265, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.01.037>

LEE, H. Y. et al. Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study. **Forensic Science International: Genetics**, v. 19, p. 28-34, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.014>.

LEE, H. Y. et al. DNA methylation profiling for a confirmatory test for blood, saliva, semen, vaginal fluid and menstrual blood. **Forensic Science International: Genetics**, v. 24, p. 75-82, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2016.06.007>

VIDAKI, A. et al. Epigenetic discrimination of identical twins from blood under the forensic scenario. **Forensic Science International: Genetics**, v. 31, p. 67-80, 2017a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.014>

VIDAKI, A. et al. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. **Forensic Science International: Genetics**, v. 28, p. 225-236, 2017b. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.009>