

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR  
DOUTORADO

DÉBORAH SOARES BISPO SANTOS SILVA

**PADRÃO DE METILAÇÃO DE DNA PARA FINS  
FORENSES: ANÁLISE DE CÉLULAS DE SANGUE,  
SÊMEN E SALIVA; E ESTUDO DE SENSIBILIDADE  
E ESPECIFICIDADE**

Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho  
Orientadora

Porto Alegre  
2015

DÉBORAH SOARES BISPO SANTOS SILVA

**PADRÃO DE METILAÇÃO DE DNA PARA FINS FORENSES: ANÁLISE DE CÉLULAS DE SANGUE, SÊMEN E SALIVA; E ESTUDO DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do grau de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientador

Profa. Dra. Clarice Sampaio Alho

Porto Alegre

2015

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a minha orientadora Dra. Clarice Sampaio Alho, pelo apoio, dedicação e confiança depositada em mim.

Aos demais professores e funcionários da Faculdade de Biociências da PUCRS, que me acompanharam nesta caminhada de estudos.

Aos meus amigos e amigas do Laboratório de Genética Humana e Molecular em especial, Fernanda Sawitzki, Elisa De Toni (vai ser sempre considerada como parte do laboratório!), Juliane Picanço, Pietra Graebin e Paulo Raimann, pela companhia, carinho, amizade e convivência junto a vocês nestes longos tempos de Doutorado.

To Dr. McCord, for allowing me to work in his lab. I could not have asked for a better lab to work and with such amazing lab mates. I had the most wonderful time in Miami. In special, to my new friends, who are now friends for life, Joana, Lauren, Georgiana and Ivy.

To Dr. Bala and Dr. Duncan.

To the best surprise and gift Miami gave me, João Marcelo.

As minhas amigas, Mariana Resende, Gabriela Borin, Fernanda Gueiros e Rayana Schuster, que mesmo distantes foram indispensáveis, me dando muito apoio, carinho e amizade.

A minha amiga e mãe carioca/gaúcha Vânia Caminha pelo carinho e incentivo durante essa minha jornada.

E em especial a minha família, por toda compreensão e apoio e, principalmente aos meus pais, que acreditaram no meu potencial e estiveram sempre ao meu lado.

## RESUMO

O DNA obtido a partir de fluidos corporais encontrados em cenas de crime pode ser usado para identificar o doador da amostra, mas não revela a fonte de tecido ou a possível idade do doador. A metilação do DNA é uma modificação epigenética envolvida na regulação da transcrição. Sabe-se que a metilação é importante na diferenciação celular e *loci* genômicos são diferencialmente metilados entre os tecidos. Devido a esse fato, diferentes padrões de metilação entre tecidos e células podem proporcionar a base de um ensaio para a identificação de fluido corporal. Sabe-se também que a capacidade de determinar a idade do doador de uma amostra com base no DNA seria uma ferramenta poderosa para a investigação forense. O envelhecimento humano é associado com modificações epigenéticas, como a metilação do DNA. Vários estudos investigaram biomarcadores para o envelhecimento, que podem ser usados para estimar a idade do doador, o que apresenta implicações práticas na análise forense. Dois genes, NPTX2 e GRIA2, previamente associados com idade e metilação do DNA, foram testados para predição de idade em amostras de saliva e sangue. Ambos os marcadores mostraram-se hipermetilados com o aumento da idade. A predição de idade epigenética foi calculada para ambos os marcadores, com uma diferença média de 6.9 anos entre as idades estimadas e observadas para o marcador GRIA2, e uma diferença média de 9.2 anos para o marcador NPTX2. Outros estudos investigaram biomarcadores para análise de fluidos biológicos. Os fluidos corporais mais comuns encontrados em cenas de crime são de sangue, sêmen e saliva. Um conjunto de marcadores epigenéticos, cg-06379435, ZC3H12D e BCAS4, que produz padrões únicos e específicos de metilação do DNA, pode ser usado para identificar estes tipos de fluidos corporais. No entanto, para assegurar a eficácia desses marcadores epigenéticos, estudos de validação precisam ser realizados para determinar as condições e as limitações desta nova ferramenta para análise forense. Em relação à especificidade ao testar os marcadores usando diferentes organismos, resultados positivos foram obtidos para algumas amostras de primatas, entretanto os resultados para todas as outras espécies testadas foram negativos. Em relação à sensibilidade a concentração mais baixa detectada variou de 0,1 a 10 ng, dependendo do *locus*. Esse ensaio também se mostrou eficaz quando inibidores estavam presentes nas amostras ou quando as amostras foram degradadas pelo calor. No caso de misturas, os níveis de metilação variaram de maneira consistente e previsível na presença de múltiplos tipos celulares em uma só amostra. No geral, a pesquisa de marcadores de predição de idade pode ser uma chave importante na busca de suspeitos/vítimas em investigações forenses, assim como a capacidade para identificar uma amostra biológica a partir do DNA seria uma ferramenta poderosa. Marcadores epigenéticos vão proporcionar à comunidade forense métodos novos e aprimorados para interpretar a cena do crime.

**PALAVRAS CHAVE:** Metilação do DNA, Fluido biológico, Pirosequenciamento, Predição de idade, Estudos de validação

## ABSTRACT

DNA obtained from body fluids recovered from crime scenes can be used to identify the donor of the biological material but it cannot reveal the tissue source or the possible age of the donor. DNA methylation is an epigenetic modification involved in transcriptional regulation. It is known that methylation is important in cell differentiation and genomic *loci* are differentially methylated between tissues. Because of this, different methylation patterns between tissues and cells can provide the basis of an assay for body fluid identification. We also know that the ability to determine the age of the sample donor based on DNA would be a powerful tool for forensic investigation. Human aging is associated with epigenetic modifications such as DNA methylation. Several studies have investigated biomarkers for aging which can be used to track donor age, presenting practical implications in forensic analysis. Two genes previously found to be DNA methylation age-associated, NPTX2 and GRIA2, were tested for prediction of age in saliva and blood samples. Both age markers were hypermethylated with the increase of age. The epigenetic predicted age was calculated for both markers, with an average difference of 6.9 years between estimated and observed ages for GRIA2 marker, and an average difference of 9.2 years for NPTX2 marker. Other studies investigated biomarkers for identification of body fluids. The most common body fluids found at crime scenes are blood, semen and saliva. A set of epigenetic markers, cg-06379435, ZC3H12D and BCAS4, which produce unique and specific patterns of DNA methylation, can be used to identify these body fluid types. However, to ensure the efficiency of these epigenetic markers, developmental validation studies need to be performed to determine the conditions and limitations of this new tool for forensic analysis. When testing the markers for body fluid identification using different organisms, we did obtain positive results for certain primate samples, however all other tested species were negative. The lowest concentration consistently detected varied from 0.1 to 10ng, depending on the *locus*. The method also proved to be effective when inhibitors were present in the samples or when samples were degraded by heat. In the case of mixtures, the overall methylation values varied in a consistent and predictable manner when multiple cell types were present in the same sample. Overall, the search of age markers candidates can be an important key in tracking suspects/victims in forensic investigations, and the ability to identify the biological sample using DNA would be a powerful tool. Epigenetic markers will provide the forensic community with new and improved methods to interpret the crime scene.

KEYWORDS: DNA methylation, Body fluid, Pyrosequencing, Age prediction, Developmental validation

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALS	fonte de luz alternativa
AMY1	do inglês, <i>Alpha-amylase 1</i>
AMY	do inglês, <i>Alpha-amylase 2</i>
BCAS4	do inglês, <i>breast carcinoma amplified sequence 4</i>
CODIS	do inglês, <i>Combined DNA Index System</i>
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
EDARADD	do inglês, <i>EDAR-associated death domain</i>
FBI	do inglês, <i>Federal Bureau Investigation</i>
NPTX2	do inglês, <i>neuronal pentraxin II</i>
pb	par de bases
PCR	do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PSA	antígeno prostático específico
RNA	ácido ribonucléico
sjTREC	do inglês, <i>signal joint T cell receptor excision circles</i>
STR	short tandem repeat
TOM1L1	do inglês, <i>TOM1-like protein 1</i>
WL	lâmpada de Wood
ZC3H12D	do inglês, <i>zinc finger CCCH-type containing 12D</i>

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS</b>	01
<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	01
1. Epigenética e a metilação do DNA	01
2. Predição de Idade	04
2.1 Biomarcadores de DNA previamente estudados	04
2.1.1 Deleções de DNA mitocondrial	05
2.1.2 Encurtamento dos telômeros	06
2.1.3 Rearranjos de DNA de células T	07
2.2 Epigenética e a predição de idade	07
3. Análise de fluidos corporais	09
3.1 Testes presuntivos e de confirmação	10
3.1.1 Sangue	10
3.1.2 Sêmen	11
3.1.3 Saliva	12
3.1.4 Desvantagens do uso dos testes presuntivos e de confirmação atuais	13
3.2 Análise genética (sequências de DNA)	15
3.3 Origem embrionária dos tecidos e diferenciação celular (metilção de DNA)	15
3.4 Marcadores de metilação de DNA para análise de fluidos corporais	16
<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>CAPÍTULO 2 - Evaluation of DNA methylation markers and their potential to predict human aging</b>	19
<b>CAPÍTULO 3 - Developmental validation studies of epigenetic DNA methylation markers for the detection of blood, semen and saliva samples</b>	26
<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	40
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	41

## CAPÍTULO 1 - APRESENTAÇÃO DO TEMA E OBJETIVOS

### REFERENCIAL TEÓRICO

#### 1. Epigenética e a Metilação do DNA

Epigenética é o estudo de alterações no DNA causados por mecanismos que regulam a expressão de genes mas que não alteram a sequência de nucleotídeos. A regulação epigenética abrange vários níveis de expressão gênica e envolve modificações de DNA, histonas, RNA e cromatina, com consequências funcionais para o genoma humano. A combinação destas alterações modula e estabelece diferentes perfis de expressão genética a partir do mesmo genoma (Cordero et al., 2015; Haggarty, 2015; Lardenoije et al., 2015).

As mudanças na expressão gênica podem ser induzidas por fatores ambientais ou podem ser programadas. No caso de mudanças impulsionadas por fatores ambientais, tem-se como exemplo modelos experimentais de regulação epigenética baseados em estudos com gêmeos, que mostram como as variações nos perfis epigenéticos aumentam à medida que os gêmeos envelhecem. O caso de mudança programada pode ser observado em organismos complexos, como mamíferos, onde todas as células têm a mesma informação genética, mas cada tipo de célula tem um padrão de expressão gênica programado para diferenciação celular e que está associado a uma função específica (Fraga et al., 2005; Grundberg et al., 2013; Cordero et al., 2015; Lardenoije et al., 2015).

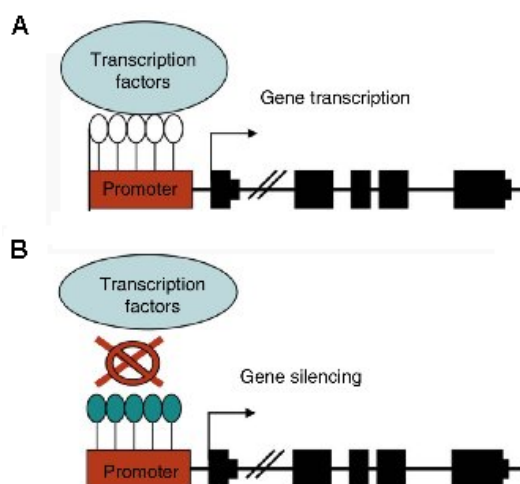
Essas alterações podem ser altamente estáveis, como aquelas que resultam no *imprinting* genômico, ou podem apresentar um comportamento dinâmico. Muitas modificações epigenéticas podem ser herdadas através de mitose ou apresentar herança meiótica (transgeracional) (Mayer et al., 2000; Handel et al., 2010; Lardenoije et al., 2015; Loke et al., 2015).

Os diferentes níveis de controle da maquinaria epigenética envolvem a metilação do DNA, a remodelação da cromatina e a regulação por RNA não-codificante. Dentre estas, a metilação do DNA é a modificação epigenética mais bem caracterizada (Peterson e Laniel, 2004; Kouzarides, 2007; Lardenoije et al., 2015).

A metilação do DNA é uma modificação epigenética que facilita o ajuste fino das taxas de regulação da transcrição. A metilação geralmente está associada com a repressão transcricional e é encontrada principalmente nas regiões de heterocromatina, enquanto regiões de eucromatina costumam apresentar baixas quantidades de DNA metilado. A maneira como a metilação do DNA afeta a transcrição é altamente dependente de sua localização dentro ou em torno do gene. A forma mais conhecida de inibição de transcrição é quando a metilação de DNA ocorre em regiões promotoras, interferindo com a ligação de fatores de transcrição e inativando o gene (Figura 1) (Klose e Bird, 2006; Miller e Sweatt, 2007; Ziller et al.,



2013; Lardenoije et al., 2015). Os perfis de metilação de DNA são normalmente hereditários. As metilações hereditárias são copiadas para a nova cadeia de DNA sintetizada, num processo conhecido como manutenção da metilação de DNA. Já a adição de novas metilações no DNA é chamado metilação *de novo*. Ambos os processos de manutenção e metilação *de novo* são sintetizados por enzimas denominadas DNA Metiltransferases (DNMT) (Mastroeni et al., 2010; Lardenoije et al., 2015).



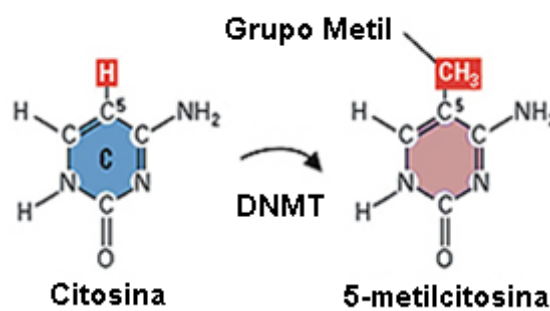
**Figura 1.** A- Gene ativo: quando não há metilação de DNA na região promotora do gene, ocorre a ligação dos fatores de transcrição e o processo de transcrição ocorre normalmente. B- Gene bloqueado: quando há metilação de DNA na região promotora do gene, ocorre o bloqueio da ligação dos fatores de transcrição e o processo de transcrição é interrompido. (Adaptado de: Fontes et al., 2015).

A regulação espacial e temporal da transcrição por metilação do DNA tem sido demonstrada desempenhando um papel importante em muitos contextos, incluindo a inativação do cromossomo X do sexo feminino, o *imprinting* genômico e a susceptibilidade a doenças complexas em seres humanos. A metilação é também essencial para a diferenciação e desenvolvimento dos tecidos de mamíferos (Jaenisch e Bird, 2003; Goren et al., 2006; Heard e Disteché, 2006; Illingworth et al., 2008; Pai et al., 2011).

Aumento de evidências aponta para as contribuições distintas da genética, do ambiente, e de fatores estocásticos para os níveis de metilação em regiões genômicas individuais (Bell et al., 2012). A metilação de DNA mostra uma plasticidade muito elevada intra- e inter-individualmente. Padrões de metilação de DNA diferem entre os tecidos e modificações epigenéticas são supostamente as principais determinantes do programa de expressão gênica celular tecido-específica. Por conseguinte, os padrões de metilação podem ser influenciados por fatores internos e externos que permitem a diferenciação celular e resposta a estímulos exógenos. Este último está diretamente ligado às diferenças interindividuais na metilação do DNA que tendem a aumentar com o envelhecimento (Martin, 2005; Poulsen et al., 2007;

Bocklandt et al., 2011; Christophersen e Helin, 2010; Hirabayashi e Gotoh, 2010; Eckmann-Scholz et al., 2012).

Um genoma típico de mamíferos possui aproximadamente 3 bilhões de pares de bases, sendo que cerca de 40% são pares de base G:C. A distribuição de dinucleotídeos CpG é desigual, com vários elementos curtos de DNA tendo uma densidade muito mais alta de dinucleotídeos CpG que outras regiões do genoma, formando as chamadas ilhas de CpG. A maioria destas ilhas está situada próxima a sítios de início de transcrição (Snustad e Simmons, 2001). No DNA de mamíferos, a metilação ocorre na posição C5 da citosina em alguns dinucleotídeos CpG (Figura 2) (Miranda e Jones, 2007; Frumkin et al., 2011). A metilação da citosina faz parte de um mecanismo que distingue os genes que estão ativos daqueles que não estão. A sua forma metilada, 5-metilcitosina (5-metil C), correlaciona-se com a citosina da mesma forma que a timina correlaciona-se com a uracila, não havendo efeito sobre o pareamento de bases (Alberts et al., 2004).



**Figura 2.** Metilação da citosina: o hidrogênio H5 é substituído por um grupo metil (CH<sub>3</sub>). (Adaptado de: [http://www.hgu.mrc.ac.uk/people/r.meehan\\_researchb.html](http://www.hgu.mrc.ac.uk/people/r.meehan_researchb.html))

Ainda que pouco se compreenda sobre o mecanismo pelo qual a metilação afeta a expressão do gene, sabe-se que a metilação é importante na diferenciação celular e que *loci* genômicos são diferencialmente metilados entre os tecidos. Também se sabe que o envelhecimento do organismo leva a diminuição nos níveis de metilação dos tecidos e que *loci* genômicos são diferencialmente metilados com o aumento da idade. Dessa forma, os diferentes padrões de metilação podem formar a base de diferentes tipos de ensaios: um ensaio para estimar a idade humana e um ensaio de identificação de tecido forense baseada em DNA. Os ensaios baseados na metilação do DNA oferecem especificidade de tecido comparável aos ensaios baseados em mRNA ou miRNA, a sensibilidade de detecção semelhante ao de perfis de DNA, e nenhum consumo adicional de amostra, já que o ensaio baseado em metilação pode ser multiplexado com os atuais protocolos de tipagem de STR (Frumkin et al., 2011; Lee et al., 2012).

## 2. Predição de idade

Ao longo do desenvolvimento, células e tecidos se diferenciam e mudam com o envelhecimento do organismo. Em termos biológicos, o envelhecimento pode ser definido como senescência celular, o que resulta numa diminuição da capacidade de responder ao estresse, em aumento do desequilíbrio homeostático e risco de doenças, e eventualmente a morte. Todos os tecidos do organismo são afetados pelo envelhecimento e as alterações que ocorrem nos níveis celular e molecular incluem encurtamento do telômero, acúmulo estocástico de mutações genéticas, estresse oxidativo, danos no DNA, deterioração das estruturas celulares e mudanças na expressão gênica (Rakyan et al., 2010; Bocklandt et al., 2011; Koch and Wagner, 2011).

Um dos grandes desafios encontrados pelos pesquisadores é descobrir um método eficaz e capaz de medir o envelhecimento humano, o que teria implicações práticas em muitos campos, incluindo a prevenção e tratamento de doenças, análises forenses e/ou extensão da vida (Hannum et al., 2013). Na ciência forense, essa mensuração do envelhecimento e, particularmente, a predição de idade representa um método chave nas investigações forenses, permitindo, por exemplo, a estimativa de idade do suspeito de um caso criminal, ou auxiliando na identificação de vítimas de desastres em massa onde a informação sobre a idade pode ser crucial para a identificação final.

Atualmente, a idade de um indivíduo pode ser estimada através de métodos morfológicos, como avaliação da morfologia dentária ou esquelética, ou por alguns métodos laboratoriais mais complexos, como racemização de ácido aspártico na dentina ou esmalte dos dentes ou datação por radiocarbono do esmalte dos dentes (Alkass et al., 2010). Entretanto, estes métodos são limitados a casos com a existência de esqueleto. Em muitas cenas de crime, o que se encontra é presença de tecidos e fluidos corporais, e estas serão as amostras utilizadas nas análises forenses durante o processo de investigação. Como a predição de idade é uma parte importante da ciência forense, seria ideal encontrar outros métodos viáveis para estimar a idade de amostras biológicas forenses.

Durante o processo de envelhecimento ocorrem alterações graduais de biomoléculas no nível molecular, principalmente na molécula de DNA. Além disso, a rotina de análise de DNA já é presente nos laboratórios forenses por essa ser a molécula usada para fins de identificação humana. Dessa maneira, encontrar biomarcadores baseados no DNA é ideal e de muita aplicação prática na predição de idade em análises forenses.

### 2.1. Biomarcadores de DNA previamente estudados e suas desvantagens

A predição da idade é uma questão importante na investigação forense e a comunidade científica tem feito esforços para pesquisar e desenvolver marcadores moleculares de DNA para estimar a idade humana. O processo natural de envelhecimento leva a alterações dos tecidos e órgãos no nível molecular ao longo da vida. Dentre as muitas alterações moleculares que são detectáveis no nível molecular, algumas foram foco de pesquisa para desenvolvimento de possíveis biomarcadores de idade, como as deleções de DNA mitocondrial e o encurtamento dos telômeros (Meissner e Ritz-Timme, 2010). Além dessas pesquisas, que foram desenvolvidas durante alguns anos, um grupo de cientistas também estudou e demonstrou que a idade de um indivíduo pode ser estimada a partir de células sanguíneas usando os rearranjos de DNA de células T (Zubakov et al., 2010). Entretanto, esses métodos propostos anteriormente revelam limitações, como uma baixa precisão e outros problemas técnicos, além de algumas vezes serem tecido-específicos, não sendo, portanto, adequados para aplicações práticas.

#### 2.1.1. Deleções de DNA mitocondrial

As mitocôndrias são organelas celulares que contêm seu próprio DNA (mtDNA) e sua própria maquinaria de síntese protéica. A maquinaria mitocondrial é composta por cinco complexos enzimáticos importantes para a respiração e fosforilação oxidativa. Durante este processo, 0,2% do oxigênio consumido é liberado como radicais livres, que podem danificar lipídios, proteínas e DNA, especialmente o DNA mitocondrial. O dano oxidativo contribui na mutagênese mitocondrial e pode levar a deleções de mtDNA (Mandavilli et al., 2002; St-Pierre et al., 2002; Meissner e Ritz-Timme, 2010).

Estudos mostram que o DNA mitocondrial de um indivíduo acumula deleções com o aumento da idade (Melov et al., 1995). Uma análise feita com mtDNA isolado de músculo esquelético de seres humanos de diferentes idades revelou que a quantidade de DNA mitocondrial de comprimento normal foi reduzida progressivamente com a idade, de modo que as células de indivíduos de terceira idade continham pequenas quantidades de mtDNA de comprimento normal (Kovalenko et al., 1997). Em um outro estudo realizado por Meissner e colaboradores (2006) foram analisados músculo esquelético, coração, núcleo caudado e cerebelo de 50 indivíduos para deleções em larga escala de DNA mitocondrial. Foram então detectados padrões tecido-específicos de deleções dependentes da idade no mtDNA. O padrão do mesmo tecido de diferentes indivíduos foi mais semelhante do que o padrão de diferentes tecidos dos mesmos indivíduos.

Dentre os vários rearranjos causados pelas deleções no mtDNA, a deleção 4977 bp (mtDNA4977) foi a mais estudada em diferentes tecidos humanos por diferentes métodos baseados em PCR, sendo considerado um candidato para predição de idade (Corral-Debrinski et al., 1992; Cortopassi et al., 1992; Meissner et al., 2000; Meissner et al., 2006; Meissner e Ritz-Timme, 2010). Entretanto, a determinação da quantidade de deleção 4977 pb no mtDNA apresenta alguns problemas, como por exemplo problema na

própria metodologia. Como todos os métodos baseados em PCR, a natureza exponencial do PCR em si pode levar a diferenças nos resultados da mesma amostra. Outro problema é a heterogeneidade na abundância de deleções mitocondriais em tecidos diferentes. Um outro grande problema, e talvez o mais importante, é que a idade biológica determinada pode ser bastante diferente da idade cronológica. Utilizando esse método, só seria possível diferenciar entre jovens e idosos, porque a margem de erro atribuída é de cerca de 40 anos (Meissner e Ritz-Timme, 2010). Os dados disponíveis são insuficientes para fazer uma previsão confiável e, dessa forma, usar a deleção 4977 bp como marcador para estimativa da idade para fins forenses.

### 2.1.2. Encurtamento dos telômeros

Os telômeros são estruturas de DNA-proteína localizados nas extremidades dos cromossomos e são fundamentais para manter a estabilidade cromossômica e para evitar a interrupção do ciclo celular. Sendo assim, eles são essenciais para a sobrevivência da célula e a capacidade replicativa de células somáticas (Meissner e Ritz-Timme, 2010; Mather et al., 2011). Os telômeros desempenham um papel central no destino celular e no envelhecimento, ajustando a resposta celular ao estresse e à estimulação do crescimento com base em divisões celulares anteriores e danos no DNA. Em células somáticas, o comprimento dos telômeros é muito heterogêneo, mas normalmente diminui com a idade, o que representa uma barreira para o crescimento do tumor e também contribui para a perda de células com a idade (Aubert e Lansdorp, 2008). Pelo fato de que o tamanho dos telômeros diminui com o aumento da idade, e que eles estão relacionados com o envelhecimento celular, vários pesquisadores propuseram que o comprimento dos telômeros seja usado como biomarcador de envelhecimento (Butler et al., 2004; Koppelstaetter et al., 2009; Mather et al., 2011).

A perda gradual do telômero em células de vários tecidos não é facilmente mensurável. Todos os métodos para medir o comprimento dos telômeros dependem da ligação de sondas de ácidos nucleicos ou de *primers* para sequências específicas de DNA repetitivo nos telômeros (Aubert e Lansdorp, 2008). Entretanto, os diferentes métodos apresentam alguns problemas e limitações como: necessitam de grandes quantidades de DNA, por vezes não detectam telômeros muito curtos, podem ser laboriosos, ou necessitam da presença de DNA intacto, que não está sempre disponível em casos forenses (Meissner e Ritz-Timme, 2010; Mather et al., 2011). Além disso, há uma heterogeneidade no comprimento dos telômeros, que pode variar entre 10% e 80% em uma população de células (Meissner e Ritz-Timme, 2010). Também, o comprimento médio dos telômeros mostra uma grande variação entre as espécies e entre indivíduos da mesma idade (Aubert e Lansdorp, 2008).

### 2.1.3. Rearranjos de DNA de células T

As células T desempenham um papel essencial no reconhecimento de invasores. Essa capacidade depende de uma diversidade de receptores de células T, cada um correspondente a moléculas específicas (antígenos). Essa diversidade de receptores ocorre devido a um rearranjo específico de DNA das células T, um processo que produz pequenas moléculas de DNA circulares (sjTRECs) como um subproduto. O número destas moléculas de sjTRECs diminui a com o aumento da idade humana. Dessa forma, foi proposto que este fenômeno biológico pode ser usado como biomarcador para estimativa de idade (Zubakov et al., 2010).

Zubakov e colaboradores (2010) usaram um método baseado em PCR em tempo real para quantificar os níveis de sjTREC. Em seguida, com os dados obtidos, foi feita uma análise utilizando modelo de regressão linear, o qual apresentou um erro padrão de estimativa de idade de  $\pm 8.9$  anos. Entretanto, uma desvantagem potencial do método proposto, e que foi apontada pelos próprios autores da pesquisa, é de que o estado de saúde do sistema imune pode ter efeito sobre os números de cópias de sjTRECs. Além disso, este método se limita a análise de células sanguíneas, não sendo possível ser aplicado a outros tipos celulares presentes nas cenas de crime.

## 2.2. Epigenética e a predição de idade

Há um aumento de evidências de que o envelhecimento se assemelha a um processo de desenvolvimento regulado, que está rigidamente controlado por meio de modificações epigenéticas específicas. Essas mudanças dos aspectos epigenéticos com o aumento da idade ocorrem de forma complexa e alteram as funções celulares, influenciando no desenvolvimento de doenças, como o câncer, e de vários fenótipos associados ao envelhecimento (Rakyan et al., 2010; Koch e Wagner, 2011; Haggarty, 2015).

Entre as modificações epigenéticas, a metilação do DNA é melhor caracterizada e desempenha um papel importante na senescência celular e do organismo (Fraga et al., 2005; Ben-Avraham et al., 2012). Diversos estudos investigaram o estado epigenético de diversos genes ou ilhas CpG em indivíduos de várias idades, e mediram as mudanças globais na metilação do DNA com o aumento da idade (Fraga et al., 2005; Boks et al., 2009; Bocklandt et al., 2011). Em geral, o nível global de metilação do genoma diminui com o envelhecimento em tecidos humanos. Entretanto, há estudos que mostram que várias ilhas CpG nas regiões promotoras são hipermetiladas durante o envelhecimento (Toyota et al., 1999; Tra et al., 2002; Kim et al., 2004; Almen et al., 2014; Yi et al., 2014).

Os mecanismos que influenciam as alterações do metiloma durante o envelhecimento não são bem compreendidos, mas pelo menos dois fatores podem ser atribuídos a esse processo: a exposição a fatores ambientais e as alterações espontâneas. Os fatores ambientais podem ativar programas celulares associados com alterações consistentes e previsíveis no epigenoma. Já as alterações epigenéticas espontâneas podem ser causadas por agentes químicos que atuam sobre os grupos metil ou por erros no momento da cópia dos padrões de metilação durante a replicação do DNA (Fraga et al., 2005; Vijg e Campisi, 2008; Hannum et al., 2013).

Embora a idade cronológica tenha sido associada a alterações na metilação do DNA, o metiloma ainda não foi muito explorado para quantificar e comparar as taxas de envelhecimento humano. Em um estudo feito por Hannum e colaboradores (2013) foi realizado um mapeamento dos perfis de metilação global do genoma de um grande grupo de indivíduos com uma ampla faixa etária. Neste estudo foi demonstrado que os padrões de metilação do genoma representam um biomarcador forte e reprodutível da taxa de envelhecimento biológico. Segundo os autores, esses padrões permitem o desenvolvimento de um modelo quantitativo de alta precisão do metiloma humano em envelhecimento.

Bocklandt et al. (2011) descreveram um preditor de idade para amostras de saliva que foi gerado a partir de dados obtidos em um estudo com 34 pares de gêmeos do sexo masculino. A predição da idade de cada indivíduo foi feita com base em três sítios CpGs associados aos genes NPTX2, EDARADD e TOM1L1. Mais recentemente, Yi et al. (2014) isolaram e identificaram oito fragmentos de genes, nos quais o grau de metilação estava correlacionado de forma significativa com a idade em amostras de sangue de 40 doadores. Além disso, eles validaram dois sítios CpGs de cada fragmento gênico e os resultados foram replicados em uma amostra de 40 homens e 25 mulheres com uma faixa etária de 11 a 72 anos de idade. A quantificação dos níveis de metilação dos marcadores estudados revelou uma tendência de hipermetilação ou hipometilação (de acordo com o gene) associada com o aumento da idade. Segundo todos estes autores, esses marcadores de metilação analisados podem ser considerados bons preditores de idade. O modelo de regressão usado apresentou uma alta precisão e os valores preditos foram altamente correlacionados com a idade observada na amostra.

As alterações na metilação de DNA associadas à idade são altamente reprodutíveis e, apesar do fato de que uma grande parte delas parece ser tecido-específica, algumas mudanças nos padrões de metilação não demonstram essa característica (Koch e Wagner, 2011). Teschendorff et al. (2010) identificaram 69 sítios CpGs, dos quais 10 apresentaram padrões similares reproduzidos por outros dois estudos em amostras de saliva e sangue (Rakyan et al., 2010; Bocklandt et al. 2011). Esse tipo de alteração associada à idade e que independe do tipo de tecido pode facilitar na predição de idade em preparações de células heterogêneas.

Com base em estudos realizados nos últimos anos, a idade cronológica mostrou associação com alterações nos níveis de metilação do DNA, e alguns marcadores de metilação foram relatados como bons

preditores de idade. Os dados obtidos a partir desses estudos têm implicações práticas, desde a avaliação da saúde e prevenção da doença, e principalmente para a análise forense. No cenário atual, é necessário mapear e identificar mais marcadores de metilação em diferentes tecidos, aumentando a quantidade de marcadores disponíveis e contribuindo para uma estimativa de idade mais precisa (Hannum et al., 2013; Yi et al., 2014).

### 3. Análise de fluidos corporais

Os fluidos corporais recuperados em cenas de crime são considerados um dos tipos de provas mais importantes em casos forenses. Eles contêm evidências de DNA que podem identificar um suspeito ou vítima, bem como exonerar uma pessoa inocente. Além disso, a determinação do tipo e origem do material biológico pode ajudar a reconstruir cenas de crime (Virkler e Lednev, 2009; Franscione et al., 2012; Lee et al., 2012). Às vezes, apenas conhecer a identidade de uma mancha pode ser suficiente para influenciar o resultado de um caso. Entretanto, isto nem sempre é uma tarefa fácil, uma vez que as manchas de fluidos corporais podem ser invisíveis a olho nu ou semelhante em aparência a outros tipos de fluidos ou substâncias (Virkler e Lednev, 2009).

Mesmo quando a identidade de uma mancha parece ser óbvia para um investigador forense, a confirmação absoluta é necessária para que as provas possam ser usadas no tribunal para provar ou refutar um fato em um caso. Isto é especialmente importante com a possível ocorrência de misturas. Uma mancha pode conter múltiplos fluidos corporais de mais de um doador. Testes físicos realizados nestas amostras permitem que os investigadores identifiquem um fluido ou confirmem a ausência de um. Idealmente, um teste para detectar fluidos corporais deve ser específico para humano, sensível e robusto. Por mais de um século exames presuntivos e de confirmação têm sido procurados e desenvolvidos para a identificação de fluidos corporais. Testes presuntivos são utilizados como testes de *screening*, mas tendem a ter limitações de especificidade. Testes de confirmação são utilizados para a identificação absoluta de tecidos e podem ser úteis na reconstrução dos acontecimentos de um crime (Gaensslen, 1983; Johnston et al., 2008; Virkler e Lednev, 2009; Frumkin et al., 2011).

Os fluidos corporais mais comuns encontrados em cenas de crime são sangue, sêmen e saliva, além de outros como fluido vaginal, urina e suor. Cada um destes fluidos tem um ou mais testes de *screening* que são testes presuntivos, e alguns deles têm testes de confirmação que irá identificar conclusivamente a sua presença. Existem também alguns testes que podem identificar as espécies de um fluido particular, e estes são também considerados de confirmação (Virkler e Lednev, 2009).

Cada fluido corporal tem uma composição única, bem como a presença de componentes específicos em relação a outro e essa diferença é a base da sua identificação. Entretanto, existem vários componentes que são comuns entre mais de um fluido, mas é a diferença na sua concentração que faz com



que os testes para estes componentes sejam eficazes. Um exemplo é a grande quantidade de amilase na saliva em comparação com as quantidades menores no fluido seminal e vaginal. Também, a uréia é um componente da urina, sêmen e suor, mas é utilizado como um indicador de urina com base na concentração muito mais elevada neste fluido (Virkler e Lednev, 2009).

O primeiro passo para a identificação de um fluido do corpo em particular é altamente importante uma vez que sua natureza é muito informativa para a investigação, e a natureza destrutiva de um teste de *screening* deve ser considerada quando apenas uma pequena quantidade de material estiver disponível. Muitas das técnicas comuns usadas para identificar fluidos são utilizadas há décadas. Algumas destas técnicas mudaram muito pouco, como o Luminol® e identificação microscópica dos espermatozoides para confirmar a presença de sêmen (Virkler e Lednev, 2009; Allery et al., 2001). Outros, como os testes presuntivos para identificar grupo heme no sangue, fosfatase ácida no sêmen, e amilase na saliva têm evoluído ao longo dos anos devido aos avanços na tecnologia, na melhor compreensão da natureza dos fluidos, ou até mesmo para evitar a exposição a produtos químicos perigosos. Alguns métodos foram descobertos, e a maioria deles envolvem a detecção de ácido ribonucléico mensageiro específico (mRNA) para identificar fluidos corporais diferentes (Nussbaumer et al., 2006; Juusola e Ballantyne, 2007; Haas et al., 2008, Virkler e Lednev, 2009). A análise sistemática destes novos métodos é vital para os investigadores forenses para serem continuamente informados sobre técnicas superiores em potencial.

### 3.1. Testes presuntivos e de confirmação

#### 3.1.1. Sangue

O sangue é um fluido corporal muito comum de ser encontrado em locais de crime. Existem vários testes presuntivos que são utilizados por investigadores forenses para detectar quantidades vestigiais de sangue ou para investigar manchas suspeitas. Esses tipos de teste são geralmente considerados como indicadores preliminares da presença de sangue, sendo geralmente seguidos por uma confirmação adicional (Bevel e Gardner, 1997; Ponce e Pascual, 1999; Castelló et al., 2002; Webb et al., 2006; Virkler e Lednev, 2009).

O teste mais simples para detectar manchas de sangue que não são claramente visíveis é uma fonte de luz alternativa (ALS), tal como luz ultravioleta. Tal fonte de luz geralmente permite a possibilidade de identificar manchas de sangue pela luz refletida ou pela fluorescência emitida quando comprimentos de onda ultravioleta são utilizados para iluminar a amostra forense. Uma ALS pode direcionar a atenção para uma mancha latente na cena do crime, e depois mais testes presuntivos podem ser utilizados para resultados mais conclusivos (Shaler, 2002; Webb et al., 2006; Virkler e Lednev, 2009).

Uma fonte de luz conhecida como Polilight® contém uma gama de comprimentos de onda e pode até mesmo revelar manchas cobertas por pintura. Entretanto, estas fontes de luz devem ser utilizadas com precaução, uma vez que certos comprimentos de onda de luz ultravioleta podem danificar o DNA de uma amostra. O teste com Luminol® é utilizado por investigadores na cena do crime há mais de 40 anos. Este teste baseia-se na capacidade da hemoglobina e de derivados de sangue para aumentar a oxidação do Luminol® na presença de uma solução alcalina e envolve a pulverização de uma zona suspeita com uma solução aquosa de Luminol® e um oxidante. Há várias formulações disponíveis, que têm vantagens e desvantagens quanto a sensibilidade, a duração de iluminação, e os efeitos sobre a análise de DNA subsequente. Ele pode até mesmo ser usado em uma área que tenha sido previamente limpa por um suspeito. No entanto, é limitada à utilização em ambientes escuros. Outra técnica baseada na quimiluminescência que dá resultados positivos sem danificar o DNA numa amostra é o Bluestar®. Estudos têm mostrado que o Bluestar® é mais sensível e estável quando comparado ao Luminol® (Gaensslen, 1983; Shaler, 2002; Spalding, 2003; Blum et al., 2006; Luczak et al., 2006; Vandenberg e Oorshot, 2006; Barni et al., 2007; Quinones et al., 2007; Li, 2008; Virkler e Lednev, 2009).

Existem vários tipos de testes catalíticos comumente usados para identificar sangue com base no grupo heme. O mais utilizado é o teste da benzidina. Um resultado positivo produz uma cor azul quando o sangue reage com a solução de etanol/ácido acético. Existem vários falsos positivos para este teste, tais como oxidantes químicos e peroxidases de frutas/vegetais, mas a sua principal desvantagem é que benzidina é um conhecido agente cancerígeno, e isso levou a sua substituição como um reagente presuntivo no laboratório forense. Outro método é o teste de fenolftaleína, também conhecido como teste Kastle-Meyer. A fenolftaleína faz com que uma solução alcalina apresente uma cor rosa após a sua oxidação por peróxido quando o sangue está presente. Ele também pode ter falsos positivos semelhantes à benzidina, mas testes em outros fluidos corporais não produzem um resultado positivo, além de não apresentar substância carcinogênica (Sensabaugh, 1982; Gaensslen, 1983; Shaler, 2002; Spalding, 2003; Johnston et al., 2008; Virkler e Lednev, 2009).

Um teste rápido utilizado para detectar evidências forenses, que foi originalmente concebido para fins clínicos (detecção de sangue oculto nas fezes), é o teste Hexagon-OBTI. Este teste baseia-se em uma reação de anticorpo para a hemoglobina humana. Entretanto, Hochmeister et al. (1999) mostraram que o Hexagon-OBTI não só reagiu positivamente para o sangue, mas também para vários outros fluidos humanos, como saliva, urina, fezes, secreções vaginais e esperma (Ramsthaller et al., 2011).

### 3.1.2. Sêmen

Tal como com o sangue, o sêmen também pode ser detectado usando uma ALS. A Lâmpada de Wood (WL) é um dispositivo específico que emite comprimentos de onda entre cerca de 320-400 nm, e é

pequeno, de baixo custo, seguro e fácil de usar. No entanto, quando o WL foi testado para outros fluidos, ele mostrou não ser muito específico e, em alguns testes, não foi capaz de detectar manchas de sêmen, além de apresentar resultados falsos positivos com pomadas e cremes. Outra ALS que tem sido utilizada é a Polilight®, que tem uma gama de comprimento de onda de 415-650 nm, bem como a luz branca e a ultravioleta. Essas fontes de luz alternativa proporcionam uma técnica simples e não destrutiva para a detecção de manchas de sêmen. No entanto, elas são apenas adequadas para a localização de manchas suspeitas (Santucci et al., 1999; Vandenberg e Van Oorshot, 2006; Seidl et al., 2008; Virkler and Lednev, 2009; Laffan et al., 2011).

O teste mais popular de confirmação para o sêmen, além da análise de células de esperma no microscópio, é o teste para antígeno prostático específico (PSA). O PSA é uma glicoproteína produzida por células epiteliais prostáticas. Apesar de estar presente em vários fluidos corporais, incluindo o leite materno, urina, soro e fluido amniótico, o PSA é encontrado em concentrações significativamente mais elevadas no fluido seminal, sendo frequentemente utilizado como um marcador para o sêmen em casos forenses. O sêmen de homens azoospermicos ainda conterá este antígeno, já que ele está presente no plasma seminal. Um aspecto importante da detecção de PSA envolve a capacidade de detectá-lo em amostras contaminadas ou escassas, incluindo tecidos lavados e cadáveres em decomposição (Breul et al., 1994; Mannello et al., 1996; Lawson et al., 1998; Sato et al., 2002; Greenfield e Sloan, 2003; Healy et al., 2007; Pang e Cheung, 2007; Virkler and Lednev, 2009; Laffan et al., 2011).

O exame microscópico de células de esperma é o teste mais definitivo disponível para a detecção de sêmen. Embora seja um método popular, a microscopia não é capaz de apresentar resultados conclusivos nos casos que envolvem azoospermia. Além disso, pode ser difícil visualizar espermatozoides intactos em amostras de manchas, principalmente nos casos em que o sêmen adere a roupas. Também, o esperma pode desintegrar-se se a mancha é lavada ou entrar em contato com outro objeto. Estes aspectos ressaltam os problemas associados com a microscopia e enfatizam a necessidade de um método de identificação de sêmen independente da presença de esperma (Sato et al., 2001; Saferstein, 2004; Laffan et al., 2011).

### 3.1.3. Saliva

A saliva é uma das fontes de DNA mais comum em cenas de crime, e pode ser recuperada a partir de uma gama de objetos utilizando cotonetes umedecidos. Assim como o sangue e o sêmen, a saliva também pode ser localizada através de uma ALS. Manchas de saliva aparecerão branco-azuladas ao serem vistas sob uma luz ultravioleta, embora isso não irá distingui-la de outra mancha de fluido corporal (Gaensslen, 1983; Sweet e Hildebrand, 1999; Abaz et al., 2002; Virkler and Lednev, 2009; Hedman et al., 2011).

A técnica mais popular e amplamente aceita para detectar saliva é baseada na atividade da amilase. O teste de amilase tem sido usado como um teste presuntivo por mais de três décadas. Duas formas diferentes de amilase são encontradas no corpo humano. A amilase presente na saliva, leite materno e transpiração é codificada pelo *locus* AMY1 no cromossomo 1, enquanto que a amilase encontrada no pâncreas, sêmen e secreções vaginais é codificada pelo *locus* AMY2. Embora a AMY1 seja mais encontrada na saliva do que em qualquer outro fluido, sua presença pode fornecer apenas informações presuntivas, uma vez que não é exclusiva da saliva. Para detectar a presença da amilase, é realizado o teste de amido-iodo. Este teste é baseado no fato de que o amido aparece azul quando na presença de iodo, e a amilase salivar irá quebrar o amido e então causar uma mudança de cor. No entanto, outras proteínas, tais como albumina e gama-globulina no sangue e sêmen, também quebram iodo, apresentando um resultado falso positivo (Sensabaugh, 1982; Greenfield e Sloan, 2003; Virkler and Lednev, 2009; Hedman et al., 2011).

#### 3.1.4. Desvantagens do uso dos atuais testes presuntivos e de confirmação

Amostras encontradas em cenas de crime são muitas vezes limitadas nas suas dimensões e qualidade, e tem havido uma tendência de ignorar o passo de identificação de fluido para proceder diretamente à análise de DNA (Franscione et al., 2012). Um dos principais problemas com estes testes é a destruição da amostra. A razão mais importante para esses testes serem não-destrutivos é a preservação da prova de DNA. Outra desvantagem da maioria destes métodos atuais é que eles são concebidos para detectar um fluido corporal específico, de modo que o investigador tem de decidir qual teste para executar com base no fluido que é mais provável estar presente. Existe uma necessidade de um teste de confirmação universal que pode ser aplicado a uma mancha desconhecida que será capaz de identificar qualquer dos fluidos corporais que possam estar presentes (Virkler and Lednev, 2009).

Além disso, os conjuntos de testes presuntivos e de confirmação baseiam-se em ensaios enzimáticos ou imunológicos (bem como a visualização para a identificação de esperma), e dependem, assim, da estabilidade das moléculas alvo para detecção da atividade ou presença de uma proteína que é específica para os tecidos do interesse. Assim, métodos baseados em proteínas sofrem de diversas limitações, já que as proteínas tendem a ser menos estáveis do que o DNA. Da mesma forma, estes ensaios exigem a presença da proteína intacta e pode não funcionar em amostras degradadas ou ambientalmente danificadas. A baixa especificidade é outra limitação associada a tais testes presuntivos e de confirmação, devido à reação cruzada com outras espécies moleculares ou tecidos (Zubakov et al., 2008; Haas et al., 2009; Frumkin et al., 2011).

A maioria dos kits comerciais fornece resultados não quantitativos, apenas indicando a presença ou ausência do material testado na amostra. Dessa forma, os ensaios podem sofrer de resultados subjetivos, além de serem incapazes de quantificar as contribuições a partir de múltiplas fontes de tecidos. Outra

consequência de um ensaio não quantitativo é que não há confiança estatística associada com qualquer resultado, positivo ou negativo. Mais importante ainda é o fato de que a maioria dos ensaios baseados em proteínas consome amostra, que por sua vez reduz a quantidade disponível de amostras de DNA (Frumkin et al., 2011).

A identificação de fluidos corporais e tecidos biológicos deixados no local do crime por meio de marcadores genéticos tornou-se uma área de interesse de pesquisa no campo da genética forense (Gomes et al., 2011). Uma abordagem alternativa para os ensaios a base de proteína é a análise de espécies de mRNA tecido específicos. Cada tipo de tecido é composto por células que têm uma transcriptoma único, apresentando um perfil único de mRNA. As moléculas de mRNA estão presentes em quantidades diferentes, dependendo da espécie particular de mRNA e do tipo de célula. Assim, é possível identificar o fluido biológico com base no tipo e na quantidade de mRNAs determinados em uma amostra recuperada da cena do crime (Juusola e Ballantyne, 2005). Os autores Juusola e Ballantyne publicaram duas pesquisas (2005 e 2007) relatando o desenvolvimento de ensaios *multiplex* para a identificação de sangue, saliva, sêmen, secreção vaginal e sangue menstrual. Esses ensaios eram baseados na metodologia de PCR em tempo real, e cada ensaio detectou transcritos de dois genes específicos de cada fluido corporal. Mais recentemente, Hanson e Ballantyne (2014) desenvolveram ensaios *single* e *multiplex*, baseados na metodologia *High Resolution Melt* (HRM), para a identificação de fluidos biológicos relevantes na área forense. Os biomarcadores são baseados em diferentes genes, incluindo: IL19 (secreções vaginais), IL1F7 (pele), ALAS2 (sangue), MMP10 (sangue menstrual), HTN3 (saliva) e TGM4 (sêmen). Xu e colaboradores (2014) desenvolveram uma nova pesquisa com objetivos de avaliar a eficácia dos marcadores de mRNA para a identificação de tecidos humanos e desenvolver um sistema *multiplex* de mRNA altamente sensível e específico. Dez fluidos biológicos mais comumente encontrados em casos forenses foram utilizados na avaliação do perfil de mRNA para identificação de fluidos corporais. Por fim, com base no estudo de avaliação, foi desenvolvido um ensaio *multiplex* para detectar sangue circulatório, saliva, sêmen, sangue menstrual, secreção vaginal, secreção nasal, mucosa oral, e amostras de suor e urina.

No entanto, os ensaios baseados em RNA ainda sofrem do fato de que o RNA é menos estável que o DNA por causa das RNases presentes, e requerem consumo adicional de amostras, a menos que o RNA seja co-extraído com o DNA (Haas et al., 2009; Frumkin et al., 2011).

Um ensaio de identificação do tecido mais desejável é um que não tenha necessariamente que consumir amostra adicional, que possa ser mais diretamente relacionado com a quantidade e persistência de DNA, e que tenha limites semelhantes de detecção. Uma vez que o DNA é mais fácil de manusear do que o RNA e é utilizado para a identificação individual, um método de identificação de fluido utilizando o DNA por si só seria benéfico para tratamento de casos forense (Frumkin et al., 2011; Lee et al., 2012).

### 3.2. Análise genética (sequências de DNA)

As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, denominados marcadores moleculares (Borba, 2009). Dentre os marcadores forenses estão os STRs (*Short Tandem Repeats*), que são sequências curtas repetidas em *tandem* num padrão de dois a seis nucleotídeos. O uso desses marcadores STRs nas análises forenses tornou-se prevalente para determinação de perfis genéticos, sendo atualmente os marcadores que auxiliam na formação do centro de identificação *Combined DNA Index System (CODIS)* do *Federal Bureau Investigation (FBI)* dos Estados Unidos da América (Butler, 2005).

Esses marcadores são fragmentos específicos de DNA, herdados geneticamente, que permitem a identificação individual e a diferenciação entre os sujeitos (Yamane, 2009). Seu poder de discriminação é tão elevado, que variedades tão proximamente relacionadas podem ser diferenciadas (Shaw et al, 2009). Dessa maneira, tais marcadores podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, como a identificação humana em casos forenses, sejam eles cívicos ou criminais.

Entretanto, apesar da sua eficácia na geração de perfis genéticos e na identificação de indivíduos, esses marcadores não são capazes de distinguir os diferentes tipos de fluidos presentes em uma cena de crime. Dessa forma, a identificação de novos marcadores genéticos para análise de amostras biológicas é de grande importância e utilidade para o meio forense.

### 3.3. Origem embrionária dos tecidos e diferenciação celular (metilação de DNA)

A arquitetura corporal dos animais, incluindo os seres humanos, é elaborada durante o desenvolvimento embrionário. Um aspecto da embriogênese é a padronização e diversificação do destino das células ao longo dos eixos embrionários (Solnica-Krezel e Sepich, 2012). A formação de padrão é o processo pelo qual um padrão espacial e temporal de atividades celulares é organizado dentro do embrião. Um dos estágios na formação do padrão em embriões de animais é o posicionamento de células em diferentes camadas germinativas, a ectoderme, a mesoderme e a endoderme (Wolpert et al., 2008).

Cada uma das três camadas germinativas dá origem a tecidos e órgãos específicos. As células de cada folheto germinativo se dividem, migram, se agregam e diferenciam em padrões bastante precisos ao formarem os vários sistemas de órgãos (organogênese) (Moore e Persaud, 2008).

A ectoderme dá origem ao sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal), ao sistema nervoso periférico, ao epitélio sensorial do olho, da orelha e do nariz, à epiderme e anexos (pelos e unhas), às glândulas mamárias, às glândulas salivares, às glândulas subcutâneas e ao esmalte dos dentes (Fitzgerald, 1980; Moore e Persaud, 2008).

A mesoderme dá origem ao tecido conjuntivo, cartilagem, osso, músculos estriados e lisos, coração, vasos sanguíneos e linfáticos, rins, ovários e testículos, ductos genitais, membranas serosas que revestem as cavidades do corpo (pericárdica, pleural e peritoneal), baço e córtex das adrenais (suprarrenal) (Moore e Persaud, 2008).

A endoderme dá origem ao revestimento epitelial dos tratos gastrintestinal e respiratório, ao parênquima das tonsilas, às glândulas tireóide e paratireoides, timo, fígado e pâncreas, ao revestimento epitelial da bexiga urinária e à maior parte da uretra, e ao revestimento epitelial da cavidade do tímpano, do antro timpânico e da tuba faringotimpânica ou auditiva (Moore e Persaud, 2008).

Durante as etapas restantes da formação de padrão, as células dessas camadas germinativas adquirem diferentes identidades, de modo que surgem padrões espaciais organizados de diferenciação celular. Nos estágios do padrão de formação, as diferenças entre as células consistem de diferenças químicas, causadas por mudanças nas atividades de diferentes genes. A expressão gênica no interior das células é traduzida em desenvolvimento embrionário, e os genes controlam o desenvolvimento principalmente determinando quais proteínas serão produzidas, em que células o são e quando (Wolpert et al., 2008).

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético que desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica e do desenvolvimento. A metilação do DNA em dinucleotídeos CpG em mamíferos desempenha papéis importantes numa variedade de processos biológicos durante a embriogênese e em tecidos adultos, tais como expressão gênica tecido-específico, diferenciação celular, *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X (Kim et al., 2004; Bell et al., 2012). Em um estágio posterior do desenvolvimento, quando cada grupo de células já está especificado, observam-se padrões de metilação distintos e expressão gênica específica de cada tecido (Wolpert et al., 2008).

#### 3.4. Marcadores de metilação de DNA para análise de fluidos corporais

As amostras celulares oriundas de diferentes fluidos corporais encontrados na cena do crime fornecem informações cruciais para vincular evidências e o crime. O DNA obtido a partir de fluidos corporais, tais como sangue, saliva e sêmen, pode ser usado para identificar o doador do material biológico, e a determinação do tipo e origem do material biológico pode ajudar a reconstruir cenas de crime. No entanto, muitos dos métodos atuais de identificação de fluidos corporais utilizam testes químicos presuntivos e destrutivos para identificar certos componentes em cada fluido, além de haver consumo de amostra, quando em muitos casos forenses a amostra disponível para análise é escassa. Portanto, um método de confirmação que permita a identificação da fonte de celular, como o teste de metilação de DNA, seria um instrumento valioso na reconstrução cenas de crime e identificação de suspeito e/ou vítima.

Em duas pesquisas publicadas anteriormente, foram descritos um conjunto de marcadores epigenéticos, ZC3H12D, BCAS4 e cg-06379435, capazes de produzir padrões únicos e específicos de metilação de DNA que podem ser utilizados para identificar sêmen, saliva e sangue, respectivamente.

Os marcadores ZC3H12D e BCAS4 foram descritos por Madi et al. (2012) e ambos tem como alvo cinco sítios CpG na sequência a ser analisada. Estes loci foram selecionados com base na literatura e os dados obtidos experimentalmente mostraram que o locus BCAS4 é hipermetilado em amostras de saliva quando comparadas a outras amostras de fluidos biológicos. Já o *loci* ZC3H12D mostrou-se hipometilado em amostras de sêmen quando comparadas a outras amostras de fluidos biológicos.

O marcador cg-06379435 foi descrito por Park et al. (2014) e tem como alvo apenas um sítio CpG na sequência a ser analisada. Inicialmente, usando dados do metiloma de 16 amostras de sangue, saliva, sêmen e secreções vaginais, foram selecionadas 2986 regiões hipermetiladas ou hipometiladas que eram específicas para cada tipo de fluido corporal. Depois, foram selecionados oito sítios CpG considerados como marcadores de metilação de DNA com relevância forense. Dentre estes oito, está incluído o marcador cg-06379435, o qual se mostrou como hipermetilado em amostras de sangue quando comparadas a outras amostras de fluidos biológicos.

Ambas as pesquisas demonstraram a aplicabilidade desses marcadores epigenéticos como um ensaio para a identificação de fluidos corporais. No entanto, para assegurar a eficácia desses marcadores, estudos de validação precisam ser realizados para determinar as condições e limitações desta nova ferramenta para análise forense.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Estudar *loci* genômicos com diferentes padrões de metilação de DNA para estimar a idade humana e para identificar diferentes fluidos biológicos encontrados em locais de crime.

### **Objetivos Específicos**

- I. Selecionar, com base na literatura, *loci* genômicos que são diferencialmente metilados com o aumento da idade.
- II. Identificar sítios CpGs dentro dos *loci* genômicos selecionados e analisar sua aplicação como marcadores epigenéticos de predição de idade.
- III. Validar marcadores de metilação de DNA para identificação de fluidos biológicos.

## **CAPÍTULO 2 - Evaluation of DNA methylation markers and their potential to predict human aging**

Silva DSBS, Antunes J, Balamurugan K, Duncan G, Alho CS, McCord B. Evaluation of DNA methylation markers and their potential to predict human aging. *Electrophoresis* (2015) doi: 10.1002/elps.201500137.

Deborah Soares Bispo  
Santos Silva<sup>1,2</sup>  
Joana Antunes<sup>1</sup>  
Kuppareddi Balamurugan<sup>3</sup>  
George Duncan<sup>4</sup>  
Clarice Sampaio Alho<sup>2</sup>  
Bruce McCord<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University, Miami, FL, USA

<sup>2</sup>Faculty of Biosciences, Laboratory of Human and Molecular Genetics, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>School of Criminal Justice, University of Southern Mississippi, Hattiesburg, MS, USA

<sup>4</sup>DNA Laboratory, Broward County Sheriff's Office, Fort Lauderdale, FL, USA

Received March 16, 2015

Revised April 14, 2015

Accepted April 15, 2015

## Research Article

# Evaluation of DNA methylation markers and their potential to predict human aging

We present epigenetic methylation data for two genetic loci, GRIA2, and NPTX2, which were tested for prediction of age from different donors of biofluids. We analyzed 44 saliva samples and 23 blood samples from volunteers with ages ranging from 5 to 72 years. DNA was extracted and bisulfite modified using commercial kits. Specific primers were used for amplification and methylation profiles were determined by pyrosequencing. Methylation data from both markers and their relationship with age were determined using linear regression analysis, which indicates a positive correlation between methylation and age. Older individuals tend to have increased methylation in both markers compared to younger individuals and this trend was more pronounced in the GRIA2 locus when compared to NPTX2. The epigenetic predicted age, calculated using a GRIA2 regression analysis model, was strongly correlated to chronological age ( $R^2 = 0.801$ ), with an average difference of 6.9 years between estimated and observed ages. When using a NPTX2 regression model, we observed a lower correlation between predicted and chronological age ( $R^2 = 0.654$ ), with an average difference of 9.2 years. These data indicate these loci can be used as a novel tool for age prediction with potential applications in many areas, including clinical and forensic investigations.

### Keywords:

Age prediction / Biofluids / DNA methylation / Pyrosequencing  
DOI 10.1002/elps.201500137

## 1 Introduction

The process of aging affects an organism and the changes that occur in cells and tissues, including modifications in gene regulation, telomeres, cellular structures, and an accumulation of DNA mutations. The effects caused by aging are usually due to chemical modifications of the genome when the organism is affected by diseases, lifestyle, and its genetic makeup [1–4].

Human aging is associated with epigenetic modifications such as DNA methylation, which is a modification involved in transcriptional regulation. A typical mammalian genome has approximately 3 billion base pairs, of which about 40% are G:C basepairs. In a DNA linear sequence, when a cytosine is followed by a guanine, it is commonly referred to as a CpG site. The CpG dinucleotide distribution is uneven, with several short DNA elements having a much higher density of CpG dinucleotides than other regions of the genome, forming the so-called CpG islands. Most of these islands are located near transcription start sites. In mammalian DNA, methylation occurs at position C5 of the cytosine in some CpG

dinucleotides [5–8]. With the increasing age, some gene-specific CpG dinucleotides can become hypermethylated or hypomethylated. Two main factors have been pointed out as responsible for driving change in the aging methylome: environmental exposure and spontaneous epigenetic changes [9].

Several studies have investigated biomarkers for aging that could be used to track donor age. When compared to messengerRNA or proteins, the methylation of DNA is considered more chemically and biologically stable, making it an ideal biomarker for human age. It is particularly useful in situations such as forensic casework where evidentiary material could easily become degraded or inhibited through contact with exogenous materials [10]. The potential to assess human aging by evaluating the level of DNA methylation has practical implications, including prevention and treatment of diseases, health assessment in addition to forensic analysis [9].

Fraga et al. [11] were among the first to study DNA methylation and its association with age. They performed analysis in samples from monozygotic twin pairs and observed an increased difference in DNA methylation when they compared older twins with younger ones. Other studies [12, 13] looked at specific regions of the genome and observed that specific genome locations can either increase or decrease the methylation level with age, most likely due to differences in gene expression in each cell type. Yi et al. [14] listed the

**Correspondence:** Dr. Bruce McCord, Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University, 11200 SW 8th St, Miami, FL 33199, USA  
E-mail: mccordb@fiu.edu

**Abbreviation:** CpG, cytosine followed by guanine in a DNA linear sequence

**Colour Online:** See the article online to view Figs. 1 and 2 in colour.

**Table 1.** Panel of loci used in this study

locus	Chr	Gene ID	PCR and sequencing primers	CpG sites analyzed in the nucleotide dispensation order (bold)
GRIA2	4	2891	Forward primer-GTATGGGAGGGTGTGAATATT Reverse primer- AAAAAATCCCTATTTCCCAATCCTACT Seq. primer-ATATTTAGAGATATGGGATTATAG	<b>CGGTAGTTTCGTTGAAAATTGATTTAGTTATTTTTTCGG</b> ATTTTTGGAGCGGGGATAGGGCG
NPTX2	7	4885	Forward primer-GGTTGTGAGAAGGTAGGAGATTT Reverse primer-ACCAACAACCCCAACATCCC Seq. primer-AGAAGGTAGGAGATTTTTTGT	<b>TCGCGGTGTACGCGATTTTCGAGACGATAGCGCGTT</b> ATTGTTAGTAGCGAAGGCGTTTTTCGCG

Chr, chromosome.

sequence for eight genome locations in which the methylation levels are significantly correlated with age. Most recently, Zbiec-Piekarska et al. [15] identified CpG sites located in the *ELOVL2* gene that may be useful as predictors for human aging.

Koch and Wagner have examined sets of previously published DNA-methylation data and performed bioinformatics data analysis to identify Epigenetic-Aging-Signatures [2]. The predicted age using this technique showed an average difference of about 11 years when compared to the chronological age. Bocklandt and coworkers identified 88 sites in the genome correlated with age in 34 male twin pairs [1]. They validated sites in three genes and described a predictor of age with an average accuracy of 5.2 years. Based on these published data, we decided to study two age-related markers, GRIA2 (glutamate receptor ionotropic AMPA 2) and NPTX2 (neuronal pentraxin II), using quantitative pyrosequencing. Here, we examine a series of CpG sites for application of these loci for use as age-specific epigenetic markers.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Sample collection

Biological samples were obtained from 44 donors with age ranging from 5 to 72 years. Buccal cells were collected using cotton swabs. Blood was obtained by finger prick and blood was collected using cotton swabs. All participants signed informed consent statements prior to sample collection. All samples were collected after obtaining appropriate Institutional Review Board approvals from Florida International University (IRB-13-0555), The University of Southern Mississippi (protocol #12010303) and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CONEP #723.619/ CEP #845.747).

### 2.2 DNA extraction and modification

DNA extraction was performed using the BioRobot<sup>®</sup> EZ1 automated purification workstation (Qiagen Inc., CA) and the EZ1<sup>®</sup> DNA Investigator kit according to manufacturer's protocol. DNA was recovered in a final volume of 50  $\mu$ L and

quantified using an Alu-based real-time PCR method [16] with a Corbett Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia, now Qiagen Inc., CA).

Because standard PCR amplification does not preserve DNA methylation sites, genomic DNA extracts were treated with sodium bisulfite in order to convert unmethylated cytosines to uracil using the EpiTect<sup>®</sup> Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen Inc., CA). The standard manufacturer's protocol for the conversion of 1–500 ng DNA in a maximum volume of 40  $\mu$ L was used. The converted uracils are then replaced by thymine during the PCR amplification process. The bisulfite-modified DNA was amplified by site-specific PCR primers designed to amplify the bisulfite-modified target regions [17].

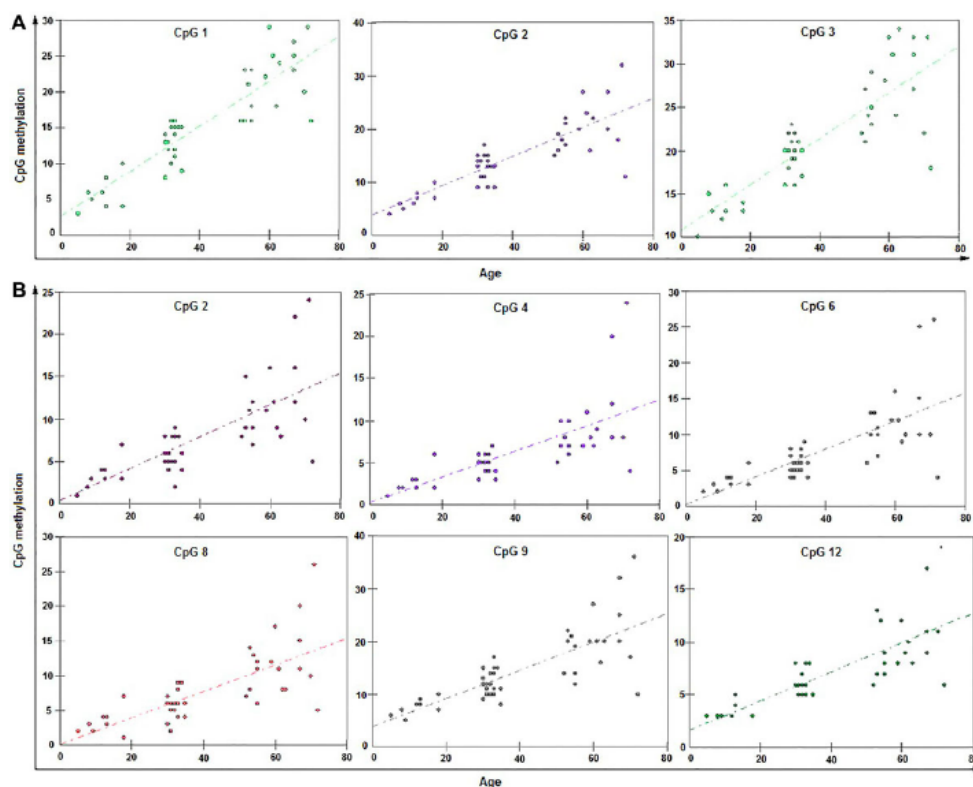
### 2.3 Assay design

Genetic loci GRIA2 and NPTX2 were reported to present age-related methylation levels [1, 2]. In these studies, only one or two CpG sites were analyzed per locus. We decided to investigate these loci further by examining a range of different CpG sites in each genetic locus using bisulfite conversion followed by pyrosequencing. GRIA2 and NPTX2 PyroMark<sup>®</sup> CpG assays were custom designed in house using the Pyromark assay design software (Qiagen) and targeted three and six CpG sites in the sequence, respectively (Table 1). The reverse primers were biotin labeled allowing for the production of biotinylated PCR products necessary for the pyrosequencing reaction [17].

### 2.4 PCR and pyrosequencing reactions

Singleplex PCR reactions were performed using the PyroMark<sup>®</sup> PCR Kit (Qiagen) in a GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). For all samples, 1.2  $\mu$ L of modified DNA template was added to the PCR mixture in a total reaction volume of 15  $\mu$ L. The complete PCR protocol outlined by the manufacturer was followed [17].

Pyrosequencing was performed following completion of the PCR reactions using a Pyromark<sup>®</sup> Q24 pyrosequencer (Qiagen) following protocols recommended by the manufacturer. Once the pyrosequencing is complete, the percent



**Figure 1.** Correlation between CpG site methylation levels and age. (A) Marker GRIA2: CpG 1 ( $R^2 = 0.795$ ), CpG 2 ( $R^2 = 0.701$ ), and CpG 3 ( $R^2 = 0.700$ ). (B) Marker NPTX2: CpG 2 ( $R^2 = 0.554$ ), CpG 4 ( $R^2 = 0.485$ ), CpG 6 ( $R^2 = 0.526$ ), CpG 8 ( $R^2 = 0.533$ ), CpG 9 ( $R^2 = 0.596$ ), and CpG 12 ( $R^2 = 0.597$ ).

methylation was calculated automatically by the Pyromark<sup>®</sup> Q24 software and was displayed as a pyrogram [17].

### 2.5 Data analysis

For each locus, the percent methylation values were obtained at each CpG site from the pyrograms. Linear regression analysis was used to calculate a correlation between age and DNA methylation. A single regression analysis was performed to examine each CpG site one at a time. Next, a simultaneous analysis of all tested cytosines was performed using multivariate linear regression.

For the estimation of predicted age, a multivariate regression model was developed with the analysis of the data. A leave-one-out analysis was performed, where the multivariate model was fit on all but one subject and its prediction could be related to the truly observed age of the left-out subject. This analysis is a validation technique to assess the predictive ability of the model when tested in a dataset not used in the estimation [1, 14, 15]. All calculations were done using

SPSS statistics v. 17.0. A  $p$ -value of  $<0.05$  was assumed as significant for all tests conducted.

### 3 Results

We examined the methylation level of two age markers, GRIA2 and NPTX2, in saliva samples from 44 donors with ages ranging from 5 to 72 years. Three CpG sites were analyzed for GRIA2 and six out of the 12 sites were analyzed for NPTX2. We considered only six of these sites due to the lack of significant differences in methylation values between individuals of various ages in the remaining CpG sites. The methylation status of all tested cytosines was analyzed and linear regression was used to examine the relationship between age and the methylation profile of the tested loci.

The three CpG sites in GRIA2 locus and the six analyzed CpG sites in NPTX2 locus were hypermethylated with the increase of age (regression coefficients values  $> 0$ ) and the methylation values of each CpG site presented an age-related association (simple linear regression. For all correlations,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 1).

**Table 2.** Multivariate analysis of CpG sites in GRIA2 and NPTX2 and their association with age

Marker	Number of CpG sites	$R^2$	Standard error (%)	$p$ -value
GRIA2	3	0.801	9.0	0.0001
NPTX2	6	0.654	12	0.0001

After performing linear regression analysis, coefficients of determination ( $R^2$ ) values were determined. This value is a statistical measure that represents how much of the variability of the dependent variable is explained by the predictor variable. The correlation between methylation values and age was shown to be greater in GRIA2. A multivariate regression analysis showed that the GRIA2 marker represents 80.1% (or  $R^2 = 0.801$ ) of the variance in age. The NPTX2 marker presented a lower percent value of 65.4% (or  $R^2 = 0.654$ ). Detailed results of the multivariate analysis are presented on Table 2. Also,  $\beta$  values showed that CpG 1 ( $\beta = 3.13$ ,  $p = 0.0002$ ) from GRIA2 and CpG 12 ( $\beta = 3.53$ ,  $p = 0.03$ ) from NPTX2 had a stronger correlation with age variation. The beta ( $\beta$ ) regression coefficients are important to assess the influence of each predictor variable on the dependent variable in a multiple regression analysis.

### 3.1 Prediction of age

A multivariate regression model was used to estimate the age of analyzed samples. The epigenetic predicted age, calculated using GRIA2 regression analysis, was strongly correlated to the chronological age ( $R^2 = 0.801$ ,  $p < 0.0001$ ) (Fig. 2A). The estimated values showed an average difference of 6.9 years when compared to the observed ones. When using NPTX2 regression analysis, we observed a lower correlation between predicted and chronological age ( $R^2 = 0.654$ ,  $p < 0.0001$ )

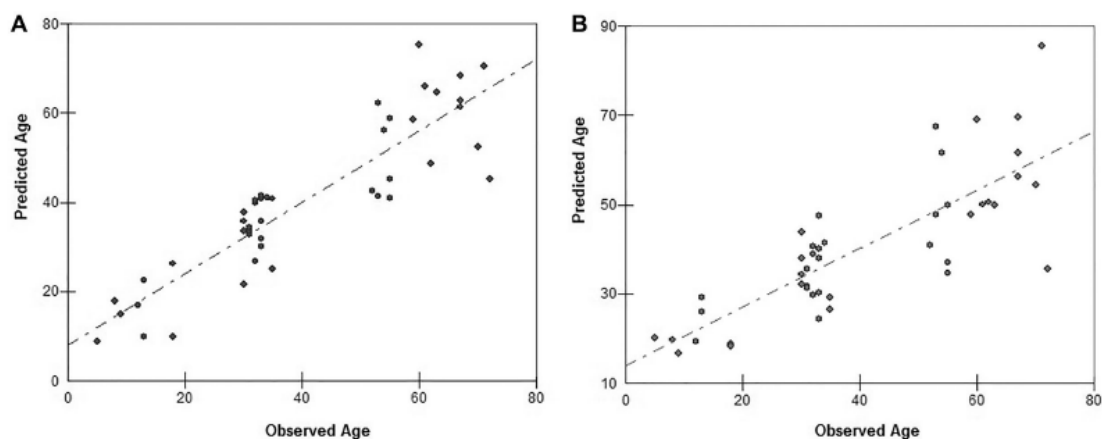
(Fig. 2B). This model shows an average difference of 9.2 years.

### 3.2 Analysis of blood samples

To analyze if the age-associated DNA methylation results can be reproduced in other tissues, we screened 23 blood samples from the same saliva donors for both GRIA2 and NPTX2. A multivariate regression analysis showed that GRIA2 represents 55.4% (or  $R^2 = 0.5542$ ) of the age variation in blood cells, which is a lower correlation percentage when compared to the saliva sample results. On the other hand, NPTX2 presented a percentage (55.4% or  $R^2 = 0.5542$ ) more similar to the one observed in saliva samples. Also, when trying to apply the same saliva multivariate regression model to predict donor age in blood cells, a low correlation was found between predicted and chronological age for both loci. We could also observe a low correlation when comparing predicted age for blood samples and predicted age for saliva samples (Table 3).

## 4 Discussion

Aging is a process that occurs in all organisms. It can be considered as a complex phenomenon that is associated with alterations in different organs, tissues, and cells, and changes at the molecular level. The process of aging is characterized by the decline of normal cellular functions and the accumulation of genomic changes, and its affects can be caused by epigenetic modifications in the genome [1, 18]. It is known that epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, are important in gene expression and the level of methylated cytosines in the genome is subjected to variation with aging. Several studies have reported the presence of different



**Figure 2.** Predicted versus observed age. (A) Results obtained with GRIA2 multivariate regression model ( $R^2 = 0.801$ ). (B) Results obtained with NPTX2 multivariate regression model ( $R^2 = 0.654$ ).

**Table 3.** Analysis of age-associated DNA methylation in blood cells

Marker	Predicted age (blood samples) versus chronological age	Predicted age (blood samples) versus predicted age (saliva samples)
GRIA2	$R^2 = 0.322$	$R^2 = 0.313$
NPTX2	$R^2 = 0.276$	$R^2 = 0.226$

methylation patterns at CpG islands of various genes in individuals with different ages [1, 10, 14, 15, 18], and have also investigated DNA methylation as a biomarker and a tool for age estimation.

CpG sites in genes GRIA2 and NPTX2 have been associated with aging [1, 2]. Gene GRIA2 (glutamate receptor ionotropic AMPA 2) products function as neurotransmitter receptors in the brain and it has been shown to be associated with Alzheimer's disease [19]. Gene NPTX2 (neuronal pentraxin II) products are involved in synapse formation and it has been associated with Parkinson's disease [20] and pancreatic cancer [21, 22]. Although both genes have been analyzed for their correlation with age, we decided to investigate different CpG sites in GRIA2 and NPTX2 using pyrosequencing as an alternative analysis method. Previous works investigating both genes mostly performed data analysis from array studies. Therefore, applying a methodology that uses bisulfite modification of DNA combined with pyrosequencing is more likely to be useful in a forensic routine.

Observing the results obtained from the multivariate analysis, the beta ( $\beta$ ) regression coefficients showed that CpG 1 from GRIA2 and CpG 12 from NPTX2 have the strongest correlation with age. This result is important in assessing the influence of each CpG site in a multivariate analysis. It is also important to consider the analysis of the  $R^2$  values obtained in both simple and multivariate linear regression analysis. When analyzing multiple markers, it is common to combine all data and develop a regression model to predict age based on the methylation levels of all markers. GRIA2 showed a stronger correlation with age variation and prediction when compared to NPTX2 (multivariate regression analysis, GRIA2:  $R^2 = 0.801$  versus NPTX2:  $R^2 = 0.654$ ). Also, all CpG sites from GRIA2 produced a higher  $R^2$  value than all CpG sites from NPTX2 when they were analyzed independently (simple regression analysis). Based on these differences, a noncombined analysis of the two loci was performed.

A higher age average difference was observed in the noncombined analysis for each when compared to those found by Bocklandt et al. 2011 [1]. However, it is important to observe that their prediction of age was done using a model based on combined analysis. Surprisingly when comparing results from this study with those obtained by Koch and Wagner [2], our analysis presented a lower age average difference, even though that study also performed a combined analysis with multiple age markers. This latter result highlights the importance of investigating multiple CpG sites in the same locus since a single marker may possess enough prediction power and turn out to be an easy tool for use in age analysis.

Another important question related to age markers is how reproducible the results are when the analysis is done with different cell types. It has been noted that many age-associated DNA methylation changes are tissue-specific [2, 10, 23]. It was observed that a correlation between methylation values and age was found when analyzing both saliva and blood samples. However, the results in saliva were more accurate than those found in blood samples. Also we determined that the age prediction regression model from one group of samples cannot be applied to another. Blood and saliva samples present differences in their composition and therefore differences in their gene expression, and methylation pattern should be expected. Primarily, they can differ in which cell types they contain and their different function, half-life, and viability. The extracted DNA from saliva samples mostly originates from exfoliated epithelial cells, while extracted DNA from blood samples originates from leucocytes [24]. This highlights the need to not only analyze the association between age and methylation, but to also perform cross-correlations between multiple cell types. Knowing the appropriate epigenetic loci for a given body fluid (blood versus saliva) would be particularly critical in forensic applications in which epigenetic age determination might be used in an attempt to identify or discriminate between potential suspects in criminal casework.

Human chronological age can be different from a predicted age group based on a biological sample [15] and this is reflected in the results found in this study. At a biological level, the sample can be affected by many factors, such as genetic and environmental, and the effect of these different variables makes it a challenge to find age biomarkers to predict human aging. Studies of epigenetic age markers can provide the community with new and improved methods to be applied in different investigation areas, whether it is clinical or forensic. The use of this new tool can help in the assessment of health and many clinical conditions, being useful to predict the risk of age-related diseases and to help in cancer treatments, for example. These epigenetic markers may also prove to be an important tool in forensic investigations. The estimation of a suspect's age from recovered DNA can provide important information to police and trayers of fact in situations in which a suspect's identity is unknown.

*The authors would like to thank all the volunteers who participated in this study. The authors would like to acknowledge the generous support from Qiagen Inc. with bisulfite modification, PCR, and pyrosequencing and the expertise of all the Qiagen staff, especially Mark Guilliano. Deborah S. B. S. Silva is supported by FAPERGS/CAPES and CNPq (Conselho Nacional de*

*Desenvolvimento Científico e Tecnológico – modalidade Doutorado Sanduíche). This study was supported by funding provided by the National Institute of Justice, Department of Justice, USA, under award number 2012-D1-BX-K018. Points of view in the document are those of the authors and do not necessarily represent the official view of the U.S. Department of Justice.*

*The authors declare the following potential conflict of interest: They acknowledge the financial support for this project from Qiagen.*

## 5 References

- [1] Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M. E., Sanchez, F. J., Sinheimer, J. S., Horvath, S., Vilain, E., *PLoS One* 2011, **6**, e14821.
- [2] Koch, C. M., Wagner, W., *Ageing* 2011, **3**, 1–10.
- [3] Goyns, M. H., *Mech. Ageing Dev.* 2002, **123**, 791–799.
- [4] Weidner, C. I., Lin, Q., Koch, C. M., Eisele, L., Beier, F., Ziegler, P., Bauerschlag, D. O., Jöckel, K. H., Erbel, R., Mühleisen, T. W., Zenke, M., Brümmendorf, T. H., Wagner, W., *Genome Biol.* 2014, **15**, R24.
- [5] Snustad, D. P., Simmons, M. J., *Fundamentos de Genética*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2001.
- [6] Alberts, B., Johnson, A., Walter, P., *Biologia Molecular da Célula*, Artmed, Porto Alegre 2004.
- [7] Miranda, T. B., Jones, P. A., *J. Cell. Physiol.* 2007, **213**, 384–390.
- [8] Frumkin, D., Wasserstrom, A., Budowle, B., Davidson, A., *Forensic Sci. Int. Genet.* 2011, **5**, 517–524.
- [9] Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J. B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., Zhang, K., *Mol. Cell.* 2013, **49**, 359–367.
- [10] Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H. S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, N., Liang, S., Donehower, L. A., Issa, J. P., *Genome Res.* 2010, **20**, 332–340.
- [11] Fraga, M., Ballestar, E., Paz, M., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M., Heine-Suner, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y. Z., Plass, C., Esteller, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, **102**, 10604–10609.
- [12] Boyd-Kirkup, J. D., Green, C. D., Wu, G., Wang, D., Han, J. J., *Epigenomics* 2013, **5**, 205–227.
- [13] Teschendorff, A. E., West, J., Beck, S., *Hum. Mol. Genet.* 2013, **22**, R7–R15.
- [14] Yi, S. H., Xu, L. C., Mei, K., Yang, R. Z., Huang, D. X., *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014, **11**, 117–125.
- [15] Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Makowska, Z., Spas, A., Parys-Proszek, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., Branicki, W., *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015, **14**, 161–167.
- [16] Nicklas, J. A., Buel, E., *J. Forensic Sci.* 2003, **48**, 936–944.
- [17] Madi, T., Balamurugan, K., Bombardi, R., Duncan, G., McCord, B., *Electrophoresis* 2012, **33**, 1736–1745.
- [18] Thompson, R. F., Atzmon, G., Gheorghie, C., Liang, H. Q., Lowes, C., Greally, J. M., Barzilai, N., *Ageing Cell* 2010, **9**, 506–518.
- [19] Gaisler-Salomon, I., Kravitz, E., Feiler, Y., Safran, M., Biegon, A., Amariglio, N., Rechavi, G., *Neurobiol. Aging* 2014, **35**, 1785–1791.
- [20] Moran, L. B., Hickey, L., Michael, G. J., Derkacs, M., Christian, L. M., Kalaitzakis, M. E., Pearce, R. K., Graeber, M. B., *Acta Neuropathol.* 2008, **115**, 471–478.
- [21] Zhang, L., Gao, J., Li, Z., Gong, Y., *Dig. Dis. Sci.* 2012, **57**, 2608–2614.
- [22] Yao, F., Sun, M., Dong, M., Jing, F., Chen, B., Xu, H., Wang, S., *Am. J. Med. Sci.* 2013, **346**, 175–180.
- [23] Laird, P. W., *Nat. Rev. Genet.* 2010, **11**, 191–203.
- [24] Godderis, L., Schouteden, C., Tabish, A., Poels, K., Hoet, P., Baccarelli, A., Van Landuyt, K., *Biomed. Res. Int.* 2015, **2015**, 845041.



### **CAPÍTULO 3 - Developmental validation studies of epigenetic DNA methylation markers for the detection of blood, semen and saliva samples**

(Manuscrito submetido ao periódico "Forensic Science International: Genetics")

Deborah S.B.S. Silva<sup>1,2</sup>, Joana Antunes<sup>1</sup>, Kuppareddi Balamurugan<sup>3</sup>; George Duncan<sup>4</sup>, Clarice S. Alho<sup>2</sup>, Bruce McCord<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Florida International University, Miami, FL, USA

<sup>2</sup>Faculty of Biosciences, Laboratory of Human and Molecular Genetics, PUCRS, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>School of Criminal Justice, University of Southern Mississippi, Hattiesburg, MS, USA

<sup>4</sup>DNA Laboratory, Broward County Sheriff's Office, Fort Lauderdale, FL, USA

#### **Abstract**

Determining the type and origin of body fluids in a forensic investigation can provide important assistance in reconstructing crime scenes. A set of epigenetic markers, ZC3H12D, BCAS4, and cg-06379435 have been developed to produce unique and specific patterns of DNA methylation that can be used to identify blood, semen and saliva. To ensure the efficacy of these markers, developmental validation studies were performed to determine the conditions and limitations of this new tool for forensic analysis. DNA was extracted from human samples and was bisulfite modified using commercial bisulfite kits. Specific primers were used to amplify the region of interest and the methylation profile of the CpG sites were determined by pyrosequencing. The percent methylation values at each CpG site were determined in multiple samples and averaged for each tissue type. The versatility of these new markers is presented by showing the results of validation studies on sensitivity, human specificity, stability and mixture resolution. When testing the markers using different organisms, we did obtain positive results for certain primate samples, however all other tested species were negative. The lowest concentration consistently detected varied from 0.1 to 10ng, depending on the locus, indicating the importance of primer design and sequence in the assay. The method also proved to be effective when inhibitors were present in the samples or when samples were degraded by heat. Simulated case-type samples were also tested. In the case of mixtures of different cell types, the overall methylation values varied in a consistent and predictable manner when multiple cell types are present in the same sample. Overall, the validation studies demonstrate the robustness and effectiveness of this new tool for body fluid identification.

Key words: DNA methylation; body fluid; pyrosequencing; developmental validation

## 1. Introduction

Body fluids recovered from crime scenes are considered among the most important types of evidence in forensic cases. They contain DNA evidence that may identify a suspect or victim and exonerate an innocent person. Moreover, determining the type and origin of a biological material can help reconstruct crime scenes [1-3]. Identifying body fluids can be a critical factor in criminal investigations as the presence of skin cells may indicate innocent transfers of DNA while blood or other body fluids can indicate that a criminal act has taken place. However, many times it can be difficult to identify a forensic stain due to its similarities with other fluids or substances. Additionally, when trace levels of body fluids are present, visualization may be impossible and serological tests can fail to produce a result [1].

Recent efforts in researching new assays to identify body fluids have focused on epigenetic DNA based markers. While RNA and protein markers may be used for body fluid identification, DNA methylation presents the ideal source since it provides quantitative results, is less prone to variations in expression, and has greater long term stability. In addition, as the extracted DNA target is already present in the laboratory, only minor sample processing is needed. This is important, since in many cases the forensic sample available for analysis is limited.

DNA methylation is an epigenetic modification that is involved in transcriptional regulation. A typical mammalian genome has approximately 3 billion base pairs, with a G/C content of about 40%. Methylated cytosines typically occur as CpG dinucleotides and the presence of a methyl group at the C-5 position of the molecule tends to reduce gene expression. The CpG dinucleotides distribution is uneven, with several short DNA elements having a much higher density of CpG dinucleotides than other regions of the genome, forming so-called CpG islands. Most of these islands are located near transcription start sites. The methylated form, 5-methylcytosine (5-methyl C) correlates with cytosine in the same way that thymine correlates with uracil, with no effect on the base pairing [4-7]. Although much is still to be understood about the mechanisms by which methylation affects gene expression, it is known that methylation is important in cell differentiation and genomic loci are differentially methylated between tissues. Because of this, different methylation patterns between tissues and cells can provide the basis of an assay for body fluid identification.

The most common body fluids found at crime scenes are blood, semen and saliva. A set of epigenetic markers have been developed, ZC3H12D, BCAS4, and cg-06379435, which produce unique and specific patterns of DNA methylation that can be used to identify these body fluid types [8-9]. The process involves bisulfite modification, followed by PCR, and pyrosequencing. The results permit quantitative determination of methylation patterns at each loci for each body fluid type. The data demonstrate the applicability of epigenetic markers as an assay for trace body fluid identification. However, to ensure the

efficiency of these epigenetic markers, developmental validation studies need to be performed to determine the conditions and limitations of this new tool for forensic analysis.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Sample collection*

Biological samples (semen, blood and saliva) were obtained from volunteer donors. Buccal cells were collected using cotton swabs. Blood was obtained by finger pricking and blood cells were collected using cotton swabs. Male volunteers were given a specimen jar and requested to donate a semen sample. All participants signed informed consent statements prior to sample collection. All samples were collected after obtaining appropriate Institutional Review Board approvals from Florida International University (IRB-13-0555), The University of Southern Mississippi (protocol #12010303) and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CONEP #723.619/ CEP #845.747).

### *2.2. DNA extraction and modification*

DNA extraction was performed using the BioRobot<sup>®</sup> EZ1 automated purification workstation (Qiagen, CA) and the EZ1<sup>®</sup> DNA Investigator kit according to manufacturer's protocol. DNA was recovered in a final volume of 50 µl and quantified using the PicoGreen<sup>®</sup> method (Life Technologies, CA) [10].

Because standard PCR amplification does not preserve DNA methylation sites, genomic DNA extracts were treated with sodium bisulfite in order to convert unmethylated cytosines to uracil using the EpiTect<sup>®</sup> Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen Inc, CA). For all tests conducted in this research, the standard manufacturer's protocol for the conversion of 1-500 ng DNA in a maximum volume of 40 µl was used. The converted uracils are then replaced by thymine during the PCR amplification process. The bisulfite modified DNA was amplified by site specific PCR primers designed to amplify the bisulfite modified target regions [8].

### *2.3. Markers*

As previously described [8-9], a set of epigenetic markers, ZC3H12D, BCAS4, and cg-06379435 have been developed to produce unique and specific patterns of DNA methylation that can be used to identify semen, saliva and blood, respectively.

Markers ZC3H12D and BCAS4 were described by Madi et al [8] and both targeted 5 CpG sites in the sequence to be analyzed. Marker cg-06379435 was described by Park et al [9] and targeted only one CpG site. We have investigated this locus and added 4 additional CpG sites in this targeted region.

BCAS4 and cg-06379435 PyroMark<sup>®</sup> CpG assays were custom designed in house using the Pyromark<sup>®</sup> assay design software (Qiagen). A predesigned ZC3H12D PyroMark<sup>®</sup> CpG assay was available from the Qiagen GeneGlobe Web Portal (Table 1). The reverse primers were biotin labeled allowing for the production of biotinylated PCR products necessary for the pyrosequencing reaction [8].

**Table 1.** Panel of markers used in this study.

Marker	PCR and sequencing primers	Amplicon size (bp)	CpG sites to be analyzed in the nucleotide dispensation order (underlined)
BCAS4	Forward primer- AGTGGGTGAGGTTGTGAAATGT Reverse primer- CCCATCCTACTAAAACATCTAATT Seq. primer- AGTTTTTTGGTGAAGTTTAT	158	TAT <u>CG</u> TATCGAGAGAGATCGAGAT <u>CG</u> TATAT <u>CG</u> TATAGAT <u>CG</u> <u>CG</u> AT
cg-06379435 <sup>a</sup>	Forward primer- AGTAGAGGTGGGGGTTAATAATT Reverse primer- ACCACACAACAAAACAACTATCTC Seq. primer- GTTAGGAAAGAAAAATGTAATTTA	262	<u>T</u> <u>CG</u> GGATAAT <u>CG</u> GTGGAATTTTAGG <u>CG</u> TGGG <u>AC</u> GGTTGT <u>CG</u> GA
ZC3H12D	Proprietary <sup>b</sup>	181	<u>T</u> <u>CG</u> <u>T</u> <u>CG</u> AGTAT <u>CG</u> <u>T</u> <u>CG</u> <u>T</u> <u>CG</u>

<sup>a</sup> TargetID is a unique ID in the Illumina Human Methylation 450K bead array; 4th CpG site in the sequence provided is the target in Park et al [9].

<sup>b</sup> Primer sequences are proprietary (Qiagen Inc.) and not available.

#### 2.4. PCR and pyrosequencing reactions

Singleplex PCR reactions were performed using the PyroMark<sup>®</sup> PCR Kit (Qiagen) in a GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). For all samples, 1.2 µl of modified DNA template was added to the PCR mixture in a total reaction volume of 15 µl. The complete PCR protocol outlined by the manufacturer was followed [8].

Pyrosequencing was performed following completion of the PCR reactions using a Pyromark<sup>®</sup> Q24 pyrosequencer (Qiagen) following the protocols recommended by the manufacturer. Once the pyrosequencing was complete, the percent methylation was calculated automatically by the Pyromark<sup>®</sup> Q24 software and was displayed as a pyrogram [8].

#### 2.5. Validation studies

We tested 15 samples of each cell type (blood, saliva and semen) to be used as controls. The pyrosequencing data generated for each marker was analyzed and compared to some samples in the validation studies performed to ensure they do not differ statistically.

#### Species specificity

Species specificity studies were performed with non-human DNA samples of dog, cat, mouse, chicken, cow, horse, pig, mouse, chimpanzee, orangutan, gorilla and a microbial pool (*Escherichia coli*,

*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecali* and *Pseudomonas aeruginosa*). A human blood sample was used as positive control.

### Sensitivity studies

According to the SWGDAM guidelines, it is important to evaluate the limits of DNA quantities to be used in the reaction in order to obtain reliable results. Madi et al [8] processed a saliva sample five separate times and, for each replicate, the concentration of DNA subjected to bisulfite modification was varied (385, 100, 50, 10 and 5ng). The samples were amplified with the ZC3H12D PyroMark® CpG Assay. All replicates showed no significant differences in the methylation levels observed at each CpG site. Park et al [9] tested marker cg-06379435 and were able to obtain successful pyrosequencing results when using 500 to 10ng of premodified DNA. However, in the case of working with forensic samples, it is important to test the assay for its sensitivity limits and try to use the lowest amount of DNA as possible while maintaining the reliability in the results. For this validation study we therefore decided to test the following concentrations: 10, 5 and 1ng. Three distinct samples for each body fluid were processed for each DNA amount tested.

### Stability studies and case-type samples

Forensic samples are often exposed to environmental and chemical insults, and may contain impurities which can act as PCR inhibitors. In this study, we simulated casework samples to evaluate the robustness and stability of the markers.

To assess the effect of the inhibitors on PCR, we tested 2 different solutions: hematin (100 mM in 0.1 N sodium hydroxide) and humic acid (1 mg/mL in water). From these stock solutions, we prepared subsequent dilutions in water in a final concentration of 0.08 mM (hematin) and 0.24 mg/mL (humic acid) [11]. Aliquots of 2µl of the inhibitors were added before or after bisulfite conversion. For this study, we tested three distinct samples for each body fluid.

To test the stability of the markers under degraded conditions, samples with genomic DNA extracts were heated in deionized water at 95°C for 10, 15, 20, and 25 min to simulate natural DNA fragmentation [11]. For this study, we tested three distinct samples for each body fluid.

Also, DNA from the following simulated case-type samples was extracted and evaluated for all tested markers:

- i) 200µl of blood in 100% cotton fabric;
- ii) 200µl of semen in 100% cotton fabric;
- iii) Saliva swab of lid of a coffee drink.

## Mixture studies

DNA mixtures were prepared in order to determine if there are differences in methylation values when multiple cell types are present in the same sample. DNA from blood, saliva and semen were tested in different ratios of mixtures:

- i) Blood + Saliva: ratios of 75% blood: 25% saliva – 50% blood: 50% saliva – 25% blood: 75% saliva
- ii) Blood + Semen: ratios of 75% blood: 25% semen – 50% blood: 50% semen – 25% blood: 75% semen
- iii) Saliva + Semen: ratios of 75% saliva: 25% semen – 50% saliva: 50% semen – 25% saliva: 75% semen
- iv) Blood + Saliva + Semen: ratios of 75% blood: 12.5% saliva: 12.5% semen – 50% blood: 25% saliva: 25% semen – 75% saliva: 12.5% blood: 12.5% semen – 50% saliva: 25% blood: 25% semen – 75% semen: 12.5% blood: 12.5% saliva – 50% semen: 25% blood: 25% saliva

Also, the sequencing of each sample by itself was included as a positive control.

## Reproducibility

This study was performed by testing 24 samples (saliva n=8, blood n=8, semen n=8). The pyrosequencing data generated by our laboratory (Florida International University) and an independent laboratory (University of Southern Mississippi) was analyzed and compared to assess the reliability and the production of concordant results between different laboratories [12].

### 2.6. Data analysis

The CpG sites were examined and, for each marker, the methylation values were averaged and listed for each cell type along with standard deviations. Using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test., the methylation values were compared across CpG sites of each marker between controls and other samples to determine if they differed significantly. A t test was used to compare results obtained by the two different laboratories in the reproducibility study. A  $p$ -value of  $<0.05$  was assumed as significant for all tests conducted.

## 3. Results and Discussion

### 3.1. Control samples

A set of 15 samples of each cell type (blood, saliva and semen) were analyzed and methylation profiles of each loci were obtained to be used as controls. Table 2 presents the pyrosequencing data generated for each marker.

**Table 2.** Methylation profiles of the three markers investigated in this study.

Marker	Body fluid	CpG (Mean % Methylation $\pm$ SD)				
		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5
ZC3H12D	Semen	5.4 $\pm$ 4.0	5.3 $\pm$ 3.9	6.7 $\pm$ 4.3	6.3 $\pm$ 4.0	5.1 $\pm$ 3.7
	Blood	94.0 $\pm$ 1.6	94.1 $\pm$ 2.7	100.0 $\pm$ 0.0	97 $\pm$ 7.9	85.9 $\pm$ 3.5
	Saliva	81.5 $\pm$ 4.1	78.0 $\pm$ 4.5	98.8 $\pm$ 2.1	79.2 $\pm$ 4.9	82.3 $\pm$ 3.4
cg-06379435	Semen	3.4 $\pm$ 1.7	2.4 $\pm$ 1.8	2.7 $\pm$ 1.1	1.8 $\pm$ 1.3	3.13 $\pm$ 1.2
	Blood	23.8 $\pm$ 7.8	21.8 $\pm$ 6.7	33.2 $\pm$ 7.4	30.4 $\pm$ 8.2	49.1 $\pm$ 12.2
	Saliva	8.7 $\pm$ 7.0	2.6 $\pm$ 1.4	6.0 $\pm$ 3.9	3.5 $\pm$ 2.6	7.7 $\pm$ 4.7
BCAS4	Semen	CpG1 3.9 $\pm$ 1.6	CpG4 2.5 $\pm$ 1.1	CpG5 3.0 $\pm$ 1.1	CpG6 5.6 $\pm$ 1.6	CpG7 2.3 $\pm$ 0.9
	Blood	6.1 $\pm$ 1.4	3.2 $\pm$ 2.8	2.7 $\pm$ 1.3	6.4 $\pm$ 1.9	2.4 $\pm$ 1.6
	Saliva	63.6 $\pm$ 7.1	27.5 $\pm$ 5.6	16.3 $\pm$ 4.5	44.5 $\pm$ 6.7	11.5 $\pm$ 2.7

### 3.2. Species specificity

Several non-human DNA samples were tested to assess the specificity of the markers. Non-human primate samples presented amplification of the targeted regions but not all showed pyrosequencing results. For marker cg-0679435, an error occurred as the surrounding reference sequence was not recognized in all primate samples tested. Also, the orangutan sample did not sequence for marker ZC3H12D. All other primate samples presented pyrograms similar to those obtained when testing a human sample. These results are expected since there is a close evolutionary relationship between these animals and humans [12]. In contrast, the other species used in this validation study, which are more evolutionarily distant to humans, failed to show peaks and presented a pyrogram similar to the negative control. The specificity results obtained here are sufficient to enable the application of these markers in forensic caseworks.

### 3.3. Sensitivity studies

The sensitivity was assessed to determine the minimum concentration of DNA with which accurate and reliable results could be obtained. For both markers BCAS4 and cg-06379435, we were able to obtain successful pyrosequencing results when using 10ng of premodified DNA. When the samples were amplified with the ZC3H12D PyroMark® CpG Assay, we obtained good results using 1ng of premodified DNA. We then

decided to lower the amount of input DNA to 0.1ng and still were able to maintain the quality in the methylation profiles obtained (Table 3). All low template samples were compared with the control samples and no significant differences were found.

**Table 3.** Methylation profiles of the three investigated loci when using low amounts of premodified DNA.

Marker	Samples	CpG (Mean % Methylation $\pm$ SD)				
ZC3H12D						
(semen marker)		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5
	Semen control samples <sup>a</sup>	5.4 $\pm$ 4.0	5.3 $\pm$ 3.9	6.7 $\pm$ 4.3	6.3 $\pm$ 4.0	5.1 $\pm$ 3.7
	Semen samples (DNA input=0.1ng)	4.7 $\pm$ 4.0	4.7 $\pm$ 3.8	4.3 $\pm$ 3.5	3.7 $\pm$ 2.1	3.0 $\pm$ 4.4
cg-06379435						
(blood marker)		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5
	Blood control samples <sup>a</sup>	23.8 $\pm$ 7.8	21.8 $\pm$ 6.7	33.2 $\pm$ 7.4	30.4 $\pm$ 8.2	49.1 $\pm$ 12.2
	Blood samples (DNA input=10ng)	23 $\pm$ 8.7	22.3 $\pm$ 10.1	26.3 $\pm$ 8.3	23 $\pm$ 9.5	36.3 $\pm$ 7.5
BCAS4						
(saliva marker)		CpG1	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7
	Saliva control samples <sup>a</sup>	63.6 $\pm$ 7.1	27.5 $\pm$ 5.6	16.3 $\pm$ 4.5	44.5 $\pm$ 6.7	11.5 $\pm$ 2.7
	Saliva samples (DNA input=10ng)	65.7 $\pm$ 6.0	29.3 $\pm$ 4.9	16.0 $\pm$ 1.0	44.0 $\pm$ 9.5	10.3 $\pm$ 6.5

<sup>a</sup>DNA input of control samples ranged from 100 to 500ng.

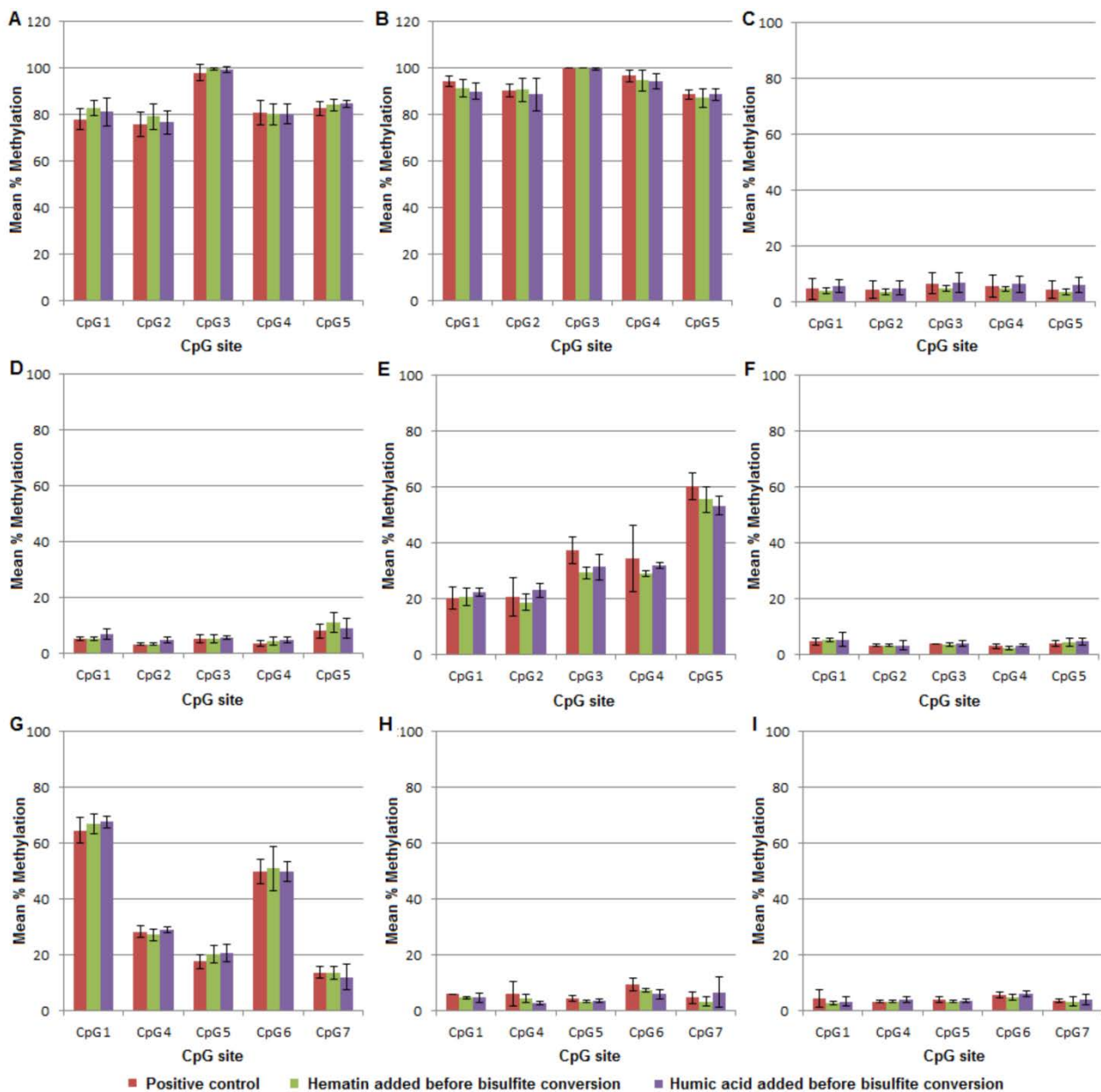
For most of the tested samples, the amplification with the markers BCAS4 and cg-06379435 was a success, and we were able to see bands with the correct size on a 2% agarose gel. However, after performing pyrosequencing, the percent methylation of samples with DNA inputs lower than 10 ng differed from the values presented by the control samples. When working with bisulfite-treated DNA, this so-called PCR-bias is often observed in the amplification step. When using low concentrations of DNA, a more efficient amplification can occur with unmethylated alleles when compared to those which are methylated. Alternatively, in some cases, an inverse bias can occur with a deviation toward the methylated alleles [13]. With regard to the samples amplified with the ZC3H12D marker, it was possible to keep the consistency in the results even when using low DNA templates. According to Moskalev et al [12] the primer design of some markers may lead to a more unbiased amplification of bisulfite-treated DNA. However we cannot prove this assumption for the ZC3H12D PyroMark<sup>®</sup> CpG assay, since its sequence is proprietary and not provided by the manufacturer of the assay (Qiagen, CA).

#### 3.4. Stability study and case-type samples

When dealing with forensic casework samples, it is common to encounter degraded and contaminated samples. Therefore, we have investigated the effects of PCR inhibitors on the methylation levels. The final inhibitors concentrations tested were: hematin (0.08 mM) and humic acid (0.24 mg/mL).

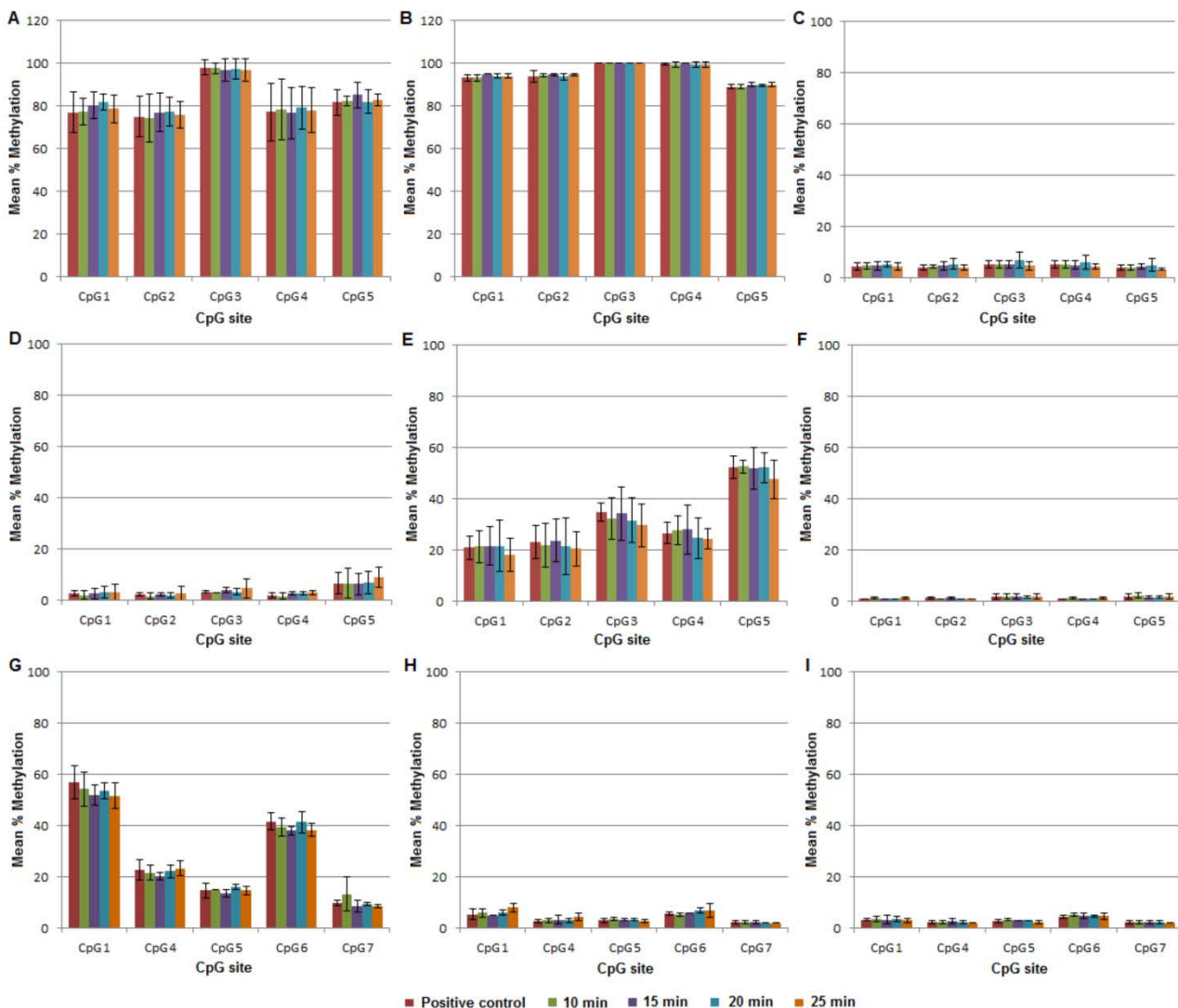


We could observe that when these inhibitors were added prior to bisulfite modification, all samples were amplified and there was no significant difference between the methylation values of the control and the other tested samples (Figure 1). However, when inhibitors were added after bisulfite modification, the amplification process failed and the pyrosequencing results were similar to those obtained when testing a no template control (water). According to the data provided by the manufacturer (Qiagen, CA), the bisulfite modification kit provides complete bisulfite conversion as well as cleanup of the modified DNA for subsequent methylation analysis. The cleanup step is likely the reason that PCR inhibitors had no discernable effect on the PCR amplification that followed bisulfite modification.



**Figure 1.** Mean methylation levels of samples in which PCR inhibitors were added before bisulfite modification. There were no significance differences between the control and the tested samples. A) Marker ZC3H12D: saliva samples. B) Marker ZC3H12D: blood samples. C) Marker ZC3H12D: semen samples. D) Marker cg-06379435: saliva samples. E) Marker cg-06379435: blood samples. F) Marker cg-06379435: semen samples. G) Marker BCAS4: saliva samples. H) Marker BCAS4: blood samples. I) Marker BCAS4: semen samples.

When testing the stability of the markers under degraded conditions, we noticed that all primers were still able to amplify the target sequence. There were no significant differences in the methylation values for the degraded samples *versus* intact DNA (positive control) (Figure 2).



**Figure 2.** Mean methylation levels of samples degraded by heat with different time points. There were no significance differences between the control and the degraded samples. A) Marker ZC3H12D: saliva samples. B) Marker ZC3H12D: blood samples. C) Marker ZC3H12D: semen samples. D) Marker cg-06379435:

saliva samples. E) Marker cg-06379435: blood samples. F) Marker cg-06379435: semen samples. G) Marker BCAS4: saliva samples. H) Marker BCAS4: blood samples. I) Marker BCAS4: semen samples.

Also, all three simulated case-type samples were successfully modified, amplified and pyrosequenced. Table 4 presents the pyrosequencing data obtained for each tested sample.

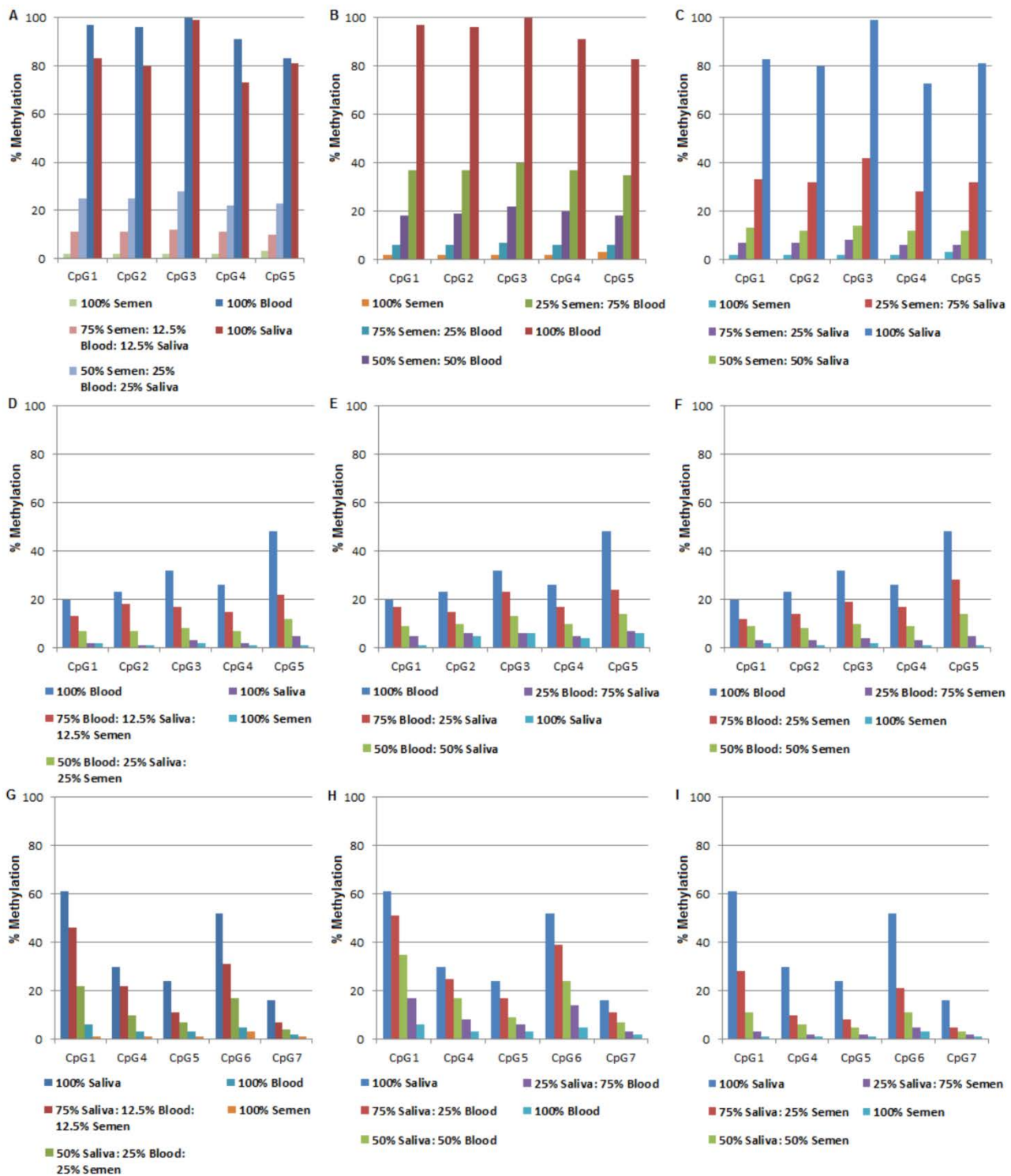
**Table 4.** Methylation levels of simulated case-type samples.

Marker	Samples	CpG (% Methylation)				
		CpG 1	CpG 2	CpG 3	CpG 4	CpG 5
ZC3H12D	200µl of semen in 100% cotton fabric	15	10	16	14	13
	200ul of blood in 100% cotton fabric	93	96	100	99	85
	Saliva swab of lid of a coffee drink	72	73	100	79	85
cg-06379435	200µl of semen in 100% cotton fabric	10	7	9	5	15
	200µl of blood in 100% cotton fabric	23	20	36	33	49
	Saliva swab of lid of a coffee drink	5	6	10	7	17
BCAS4	200µl of semen in 100% cotton fabric	5	5	5	11	3
	200µl of blood in 100% cotton fabric	6	7	6	7	6
	Saliva swab of lid of a coffee drink	50	19	17	70	24

### 3.5. Mixtures

Determining the presence of a mixture is considered a difficult task, even in a case of human identification using short tandem repeats. To determine which body fluids are present in a mixture containing multiple tissue sources is even more arduous. In this study, we prepared different ratios of DNA mixtures to analyze if there were differences in the methylation values when multiple cell types are present in the same sample.

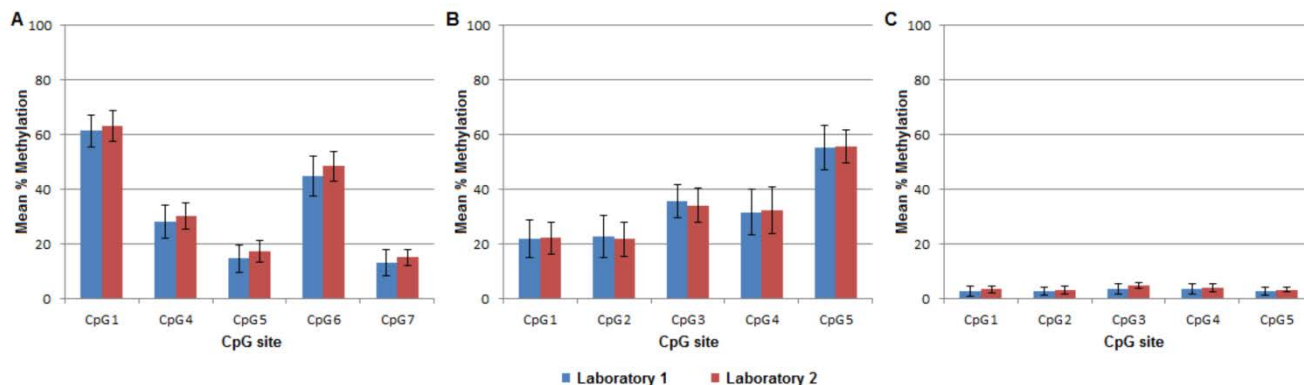
For all markers, regardless of whether a mix of two or three body fluids are present (semen, blood and saliva) in one sample, it is possible to recognize that a mixture is present. The methylation levels for mixtures show intermediate percentages when compared to pure samples (Figure 3).



**Figure 3.** Mean methylation levels of different ratios of DNA mixtures. A) Marker ZC3H12D: semen + blood+ saliva. B) Marker ZC3H12D: semen + blood. C) Marker ZC3H12D: semen + saliva. D) Marker cg-06379435: blood + saliva+ semen. E) Marker cg-06379435: blood + saliva. F) Marker cg-06379435: blood + semen. G) Marker BCAS4: saliva + blood+ semen. H) Marker BCAS4: saliva + blood. I) Marker BCAS4: saliva + semen.

### 3.6. Reproducibility

This concordance study was performed in two independent laboratories by operators with different experience levels. No significant difference was found when we compared the methylation values for each CpG site obtained by both laboratories (t test,  $p > 0.05$ ) (Figure 4).



**Figure 4.** Comparison between pyrosequencing data generated by two independent laboratories: Laboratory 1 (Florida International University) and Laboratory 2 (University of Southern Mississippi). A) Methylation data of marker BCAS4 (saliva samples  $n=8$ ). B) Methylation data of marker cg-06379435 (blood samples  $n=8$ ). C) Methylation data of marker ZC3H12D (semen samples  $n=8$ ).

## 4. Conclusion

Epigenetic markers have a promising application in forensic casework and the ability to identify the biological sample using DNA is a powerful tool. Body fluids recovered from crime scenes can provide crucial information for an investigation. Overall, the validation studies presented here demonstrate robustness and reliability of the tested markers and how important it is to know the limitations of this new assay for forensic analysis. Forensic markers for the identification of cell type will provide the community with new and improved methods to interpret the crime scene.

## Acknowledgments

The authors would like to thank all the volunteers who participated in this study. The authors would like to acknowledge the generous support from Qiagen Inc. with bisulfite modification, PCR, and pyrosequencing and the expertise of all the Qiagen staff, especially Mark Guilliano. Deborah S. B. S. Silva is supported by FAPERGS/CAPES and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – modalidade Doutorado Sanduíche), Brazil. This study was supported by funding provided by the National Institute of Justice, Department of Justice, USA, under award number 2012-D1-BX-K018. Points of view in

the document are those of the authors and do not necessarily represent the official view of the U.S. Department of Justice.

### **Conflict of interest statement**

The authors have declared the following potential conflict of interest: They acknowledge the financial support for this project from Qiagen.

### **References**

- [1] K.Virkler, I.K. Lednev, Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Sci. Int.* 188 (2009) 1–17.
- [2] N. Frascione, R. Thorogate, B. Daniel, S. Jickells, Detection and identification of body fluid stains using antibody-nanoparticle Conjugates, *Analyst.* 137 (2012) 508–512.
- [3] H.Y. Lee, M.J. Park, A. Choi, J.H. An, W.I. Yang, K. Shin, Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification, *Int. J. Legal Med.* 126 (2012) 55–62.
- [4] D.P. Snustad, M.J. Simmons, *Fundamentos de Genética*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
- [5] B. Alberts, A. Johnson, P. Walter, *Biologia Molecular da Célula*, Artmed, Porto Alegre, 2004.
- [6] T.B. Miranda, P.A. Jones, DNA methylation: the nuts and bolts of repression, *J. Cell Physiol.* 213 (2007) 384–390.
- [7] D. Frumkin, A. Wasserstrom, B. Budowle, A. Davidson, DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 5 (2011) 517–524.
- [8] T. Madi, K. Balamurugan, R. Bombardi, G. Duncan, B. McCord, The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing, *Electrophoresis.* 33 (2012) 1736-1745.
- [9] J. Park, O. Kwon, J.H. Kim, H. Yoo, H. Lee, K. Woo, S. Kim, S. Lee, Y.S. Kim, Identification of body fluid-specific DNA methylation markers for use in forensic science. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 13 (2014) 147-153.
- [10] I. Blotta, F. Prestinaci, S. Mirante, A. Cantafora, Quantitative assay of total dsDNA with PicoGreen reagent and real-time fluorescent detection, *Ann. Ist. Super Sanità.* 41 (2005) 119-123.
- [11] J. Wang, B. McCord, The application of magnetic bead hybridization for the recovery and STR amplification of degraded and inhibited forensic DNA, *Electrophoresis.* 32 (2011) 1631-1638.
- [12] L. Chaitanya, M. Van Oven, N. Weiler, J. Harteveld, L. Wirken, T. Sijen, P. de Knijff, M. Kayser, Developmental validation of mitochondrial DNA genotyping assays for adept matrilineal inference of biogeographic ancestry at a continental level. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 11 (2014) 39-51.

[13] E.A. Moskalev, M.G. Zavgorodnij, S.P. Majorova, I.A. Vorobjev, P. Jandaghi, I.V. Bure, J.D. Hoheisel, Correction of PCR-bias in quantitative DNA methylation studies by means of cubic polynomial regression. *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) e77.

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O campo da epigenética vem crescendo cada vez mais e as novas pesquisas mostram a sua ampla aplicação nas mais diversas áreas. Na ciência forense, a epigenética e o desenvolvimento de marcadores de metilação de DNA ganharam força e tem havido cada vez mais um grande esforço por parte dos pesquisadores para encontrar novos biomarcadores que sejam mais robustos e mais precisos, auxiliando assim no processo de investigação forense.

A predição de idade é muito importante na área forense, seja para auxiliar na busca de suspeito/vítima, seja para ajudar na identificação de restos mortais em desastres em massa, ou em outros tipos de situações. Entretanto, até pouco tempo atrás, estimar a idade de um indivíduo dependia de processos invasivos, laboriosos e até mesmo pouco precisos. Com a descoberta da associação entre idade e padrões de metilação de DNA, foi então possível investigar e desenvolver marcadores moleculares que permitem uma análise mais precisa, sensível e confiável, além de facilitar no trabalho do pesquisador já que usa a mesma molécula de DNA atualmente empregada nos testes de identificação humana. O mesmo acontece com a análise de fluidos biológicos encontrados na cena de crime. Atualmente, a análise desses fluidos é baseada em ensaios enzimáticos, com pouca especificidade, e que muitas vezes necessitam de uma grande quantidade de amostra, o que na maioria dos casos não é a realidade forense.

Os resultados aqui apresentados mostram a versatilidade dos novos marcadores epigenéticos, através de estudos de idade, sensibilidade, especificidade, estabilidade e de resolução de misturas. Além de mostrar a importância desse tipo de trabalho e a necessidade de que novos estudos continuem sendo feitos para que novos marcadores epigenéticos sejam desenvolvidos. Estes novos marcadores demonstram ter uma aplicação promissora nas análises de casos forenses. Os fluidos biológicos recuperados a partir de cenas de crime são considerados um dos mais importantes tipos de provas, fornecendo informações cruciais para conectar provas e crime. O desenvolvimento de marcadores epigenéticos para a identificação do tipo de célula irá proporcionar aos investigadores uma ferramenta de análise mais aprimorada e confiável. Além disso, a capacidade de estimar a idade do doador da amostra biológica com base no DNA mostra-se como um método importante e de grande auxílio para a investigação forense.

O presente estudo traz contribuições nesta linha de investigação, asquais estimulam e fundamentam a inclusão de uma nova tecnologia na rotina dos laboratórios de genética forense.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaz J., Walsh S.J., Curran J.M., Moss D.S., Cullen J., Bright J.A., Crowe G.A., Cockerton S.L., Power T.E., Comparison of the variables affecting the recovery of DNA from common drinking containers, *Forensic Sci. Int.* 126 (2002) 233–240.
- Alberts B., Johnson A., Walter P., *Biologia Molecular da Célula*, Porto Alegre: Artmed, 2004.
- Alkass K., Buchholz B.A., Ohtani S., Yamamoto T., Druid H., Spalding K.L., Age Estimation in Forensic Sciences: application of combined aspartic acid racemization and radiocarbon analysis, *Mol Cell Proteomics* 9 (2010) 1022-1030.
- Allery J.P., Telmon N., Mieusset R., Blanc A., Rouge D., Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods, *J. Forensic Sci.* 46 (2001) 349–351.
- Almen M.S., Nilsson E.K., Jacobsson J.A., Kalnina I., Klovinis J., Fredriksson R., Schiøth H.B., Genome-wide analysis reveals DNA methylation markers that vary with both age and obesity, *Gene*. 548 (2014) 61-67.
- Aubert G., Lansdorp P.M., Telomeres and Aging, *Physiol. Rev.* 88 (2008) 557-579.
- Barni F., Lewis S.W., Berti A., Miskelly G.M., Lago G., Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection, *Talanta* 72 (2007) 896–913.
- Bell J.T., Tsai P., Yang T., Pidsley R., Nisbet J., Glass D., Mangino M., Zhai G., Zhang F., Valdes A. et al., Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population, *Plos Genet.* 8 (2012) 1-12.
- Ben-Avraham D., Muzumdar R.H., Atzmon G., Epigenetic genome-wide association methylation in aging and longevity, *Epigenomics.* 4 (2012) 503–509.
- Bevel T., Gardner R., *Blood Pattern Analysis*. Boca Raton: CRC Press, 1997.
- Blum L.J., Esperanca P., Rocquefelte S., A new high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence, *Can. Soc. Forensic Sci. J.* 39 (2006) 81–100.
- Bocklandt S., Lin W., Sehl M.E., Sanchez F.J., Sinsheimer J.S., Horvath S., Vilain E., Epigenetic predictor of age, *Plos One* 6 (2011) 1-6.
- Boks M.P., Derks E.M., Weisenberger D.J., Strengman E., Janson E., Sommer I.E., Kahn R.S., Ophoff R.A., The relationship of DNA methylation with age, gender and genotype in twins and healthy controls. *PLoS One.* 4 (2009) e6767.
- Borba V.S., Marcadores moleculares: classificação e aplicações.  
<http://www.ckagricola.com/ckagricola/arquivos/MARCADORES%20MOLECULARES.doc>. Acesso em outubro de 2009.
- Butler J.M., *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005.
- Butler R.N., Sprott R., Warner H., Bland J., Feuers R., Forster M., Fillit H., Harman S.M., Hewitt M., Hyman M., Johnson K., Kligman E., McClearn G., Nelson J., Richardson A., Sonntag W., Weindruch R., Wolf N., Biomarkers of aging: from primitive organisms to humans, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 59 (2004) B560-B567.
- Breul J., Pickl U., Hartung R., Prostate-specific antigen in urine. *Eur. Urol.* 26 (1994) 18–21.
- Castelló A., Alvarez M., Verdú F., Accuracy, reliability and safety of luminol in bloodstain investigation, *Canad. Soc. Forens. Sci. J.* 35 (2002) 113–121.
- Christophersen N.S., Helin K., Epigenetic control of embryonic stem cell fate, *J. Exp. Med.* 207 (2010) 2287–2295.
- Cordero P., Li J., Oben J.A., Epigenetics of obesity: beyond the genome sequence, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 18 (2015) 361-366.
- Corral-Debrinski M., Horton T., Lott M.T., Shoffner J.M., Beal M.F., Wallace D.C., Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age, *Nature Genet.* 2 (1992) 324 – 329.
- Cortopassi G.A., Shibata D., Soong N.W., Arnheim N., A pattern of accumulation of a somatic deletion of mitochondrial DNA in aging human tissues, *Proc. Natl Acad. Sci.* 89 (1992) 7370-7374.

- Eckmann-Scholz C., Bens S., Kolarova J., Schneppenheim S., Caliebe A., Heidemann S., Von Kaisenberg C., Kautza M., Jonat W., Siebert R., Ammerpohl O., DNA-methylation profiling of fetal tissues reveals marked epigenetic differences between chorionic and amniotic samples, *Plos One* 7 (2012) 1-8.
- Fitzgerald M.J.T., *Embriologia Humana: Ciências Médicas*. 1 ed. São Paulo: Harper e Row do Brasil, 1980.
- Fontes L.P., Jimenez P.Q., Iriarte M.M., Epigenetics and epilepsy, *Neurología*. 30 (2015) 111-118.
- Fraga M., Ballestar E., Paz M., Ropero S., Setien F., Ballestart M., Heine-Suner D., Cigudosa J. C., Urioste M., Benitez J., Boix-Chornet M., Sanchez-Aguilera A., Ling C., Carlsson E., Poulsen P., Vaag A., Stephan Z., Spector T.D., Wu Y.Z., Plass C., Esteller M., Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102 (2005) 10604-10609.
- Frascione N., Thorogate R., Daniel B., Jickells S., Detection and identification of body fluid stains using antibody-nanoparticle Conjugates, *Analyst* 137 (2012) 508–512.
- Frumkin D., Wasserstrom A., Budowle B., Davidson A., DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci. Int.: Genet.* 5 (2011) 517–524.
- Gaensslen R.E., *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry*, Washington, DC: U.S. Department of Justice, 1983, pp. 1–692.
- Goren A., Simchen G., Fibach E., Szabo P.E., Tanimoto K., Chakalova L., Pfeifer G.P., Fraser P.J., Engel J.D., Ce H., Fine Tuning of Globin Gene Expression by DNA Methylation, *Plos One* 1 (2006) 1-8.
- Greenfield A., Sloan M.A., Identification of biological fluids and stains, in: S.H. James, J.J. Nordby (Eds.), *Forensic Science: an Introduction to Scientific and Investigative Techniques*, Boca Raton: CRC Press, 2003, pp. 203–220.
- Grundberg E., Meduri E., Sandling J.K., Hedman A.K., Keildson S., Buil A., Busche S., Yuan W., Nisbet J., Sekowska M., Wilk A., Barrett A., Small K.S., Ge B., Caron M., Shin S.Y., Multiple Tissue Human Expression Resource Consortium, Lathrop M., Dermitzakis E.T., McCarthy M.I., Spector T.D., Bell J.T., Deloukas P., Global analysis of DNA methylation variation in adipose tissue from twins reveals links to disease-associated variants in distal regulatory elements, *Am. J. Hum. Genet.* 93 (2013) 876–890.
- Haas C., Klesser B., Kratzer A., Bar W., mRNA profiling for body fluid identification, *Forensic Sci. Int. Gen.* 1 (2008) 37–38.
- Haas C., Klesser B., Maake C., Bar W., Kratzer A., mRNA profiling for body fluid identification by reverse transcription endpoint PCR and realtime PCR, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3 (2009) 80–88.
- Haggarty P., Genetic and metabolic determinants of human epigenetic variation, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 18 (2015) 334-338.
- Handel A.E., Ebers G.C., Ramagopalan S.V., Ramagopalan Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease, *Trends Mol. Med.* 16 (2010) 7–16.
- Hannum G., Guinney J., Zhao L., Zhang L., Hughes G., Satta S., Klotzle B., Bibikova M., Fan J. B., Gao Y., Deconde R., Chen M., Rajapakse I., Friend S., Ideker T., Zhang K., Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates, *Mol. Cell.* 49 (2013) 359–367.
- Hanson E.K., Ballantyne J., Rapid and inexpensive body fluid identification by RNA profiling-based multiplex High Resolution Melt (HRM) analysis, *F1000Res.* 2 (2014) 281.
- Healy D.A., Hayes C.J., Leonard P., McKenna L., O’Kennedy R., Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 125–131.
- Heard E., Disteche C.M., Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome, *Genes Dev.* 20 (2006) 1848–1867.
- Hedman J., Dalin E., Rasmusson B., Ansell R., Evaluation of amylase testing as a tool for saliva screening of crime scene trace swabs, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011) 194-198.
- Hirabayashi Y., Gotoh Y., Epigenetic control of neural precursor cell fate during development, *Nat. Rev. Neurosci.* 11 (2010) 377–88.
- Hochmeister M.N., Budowle B., Sparkes R., Rudin O., Gehrig C., Thali M., Schmidt L., Cordier A., Dirnhofer R., Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood, *J. Forensic Sci.* 44 (1999) 597–602.

- Illingworth R., Kerr A., DeSousa D., Jorgensen H., Ellis P., Stalker J., Jackson D., Clee C., Plumb R., Rogers J. et al., A Novel CpG Island Set Identifies Tissue-Specific Methylation at Developmental Gene Loci, *Plos Biol.* 6 (2008) 37-51.
- Jaenisch R., Bird A., Epigenetic regulation of gene expression: how the genome intergrates intrinsic and environmental signals, *Nat. Genet.* 33 (2003) 245–254.
- Johnston E., Ames C.E., Dagnall K.E., Foster J., Daniel B.E., Comparison of presumptive blood test kits including Hexagon OBTI, *J. Forensic Sci.* 53 (2008) 687- 689.
- Juusola J., Ballantyne J., Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids, *Forensic Sci Int.* 152 (2005) 1-12.
- Juusola J., Ballantyne J., mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR, *J. Forensic Sci.* 52 (2007) 1252–1262.
- Kim S.H., Kang Y.K., Koo D.B., Kang M.J., Moon S.J., Lee K.K., Han Y.M., Differential DNA methylation reprogramming of various repetitive sequences in mouse preimplantation embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 58-63.
- Kim T.Y., Lee H.J., Hwang K.S., Lee M., Kim J.W., Bang Y.J., Kang G.H., Methylation of RUNX3 in various types of human cancers and premalignant stages of gastric carcinoma, *Lab. Invest.* 84 (2004) 479–484.
- Klose R.J., Bird A.P., Genomic DNA methylation: the mark and its mediators, *Trends. Biochem. Sci.* 31 (2006) 89–97.
- Koch C.M., Wagner W., Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues, *Aging.* 3 (2011) 1-10.
- Koppelstaetter C., Kern G., Mayer G., Biomarkers of aging with prognostic and predictive value in non-oncological diseases, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 3469-3475.
- Kovalenko S.A., Kopsidas G., Kelso J.M., Linnane A.W., Deltoid human muscle mtDNA is extensively rearranged in old age subjects, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232 (1997) 147–152.
- Kouzarides T., Chromatin modifications and their function, *Cell.* 128 (2007) 693–705.
- Laffan A., Sawyer I., Quinones I., Daniel B., Evaluation of semen presumptive tests for use at crime scenes, *Med. Sci. Law.* 51 (2011) 11–17.
- Lardenoije R., Iatrou A., Kenis G., Kompotis K., Steinbusch H.W., Mastroeni D., Coleman P., Lemere C.A., Hof P.R., van den Hove D.L., Rutten B.P., The epigenetics of aging and neurodegeneration, *Prog. Neurobiol.* 2015, in press.
- Lawson M.L., Maculoso M., Bloom A., Hortin G., Hammond K.H., Blackwell R., Objective markers of condom failure, *Sex. Transm. Dis.* 25 (1998) 427–432.
- Lee H.Y., Park M.J., Choi A., An J.H., Yang W.I., Shin K., Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification, *Int. J. Legal Med.* 126 (2012) 55–62.
- Li R., *Forensic Biology*, Boca Raton: CRC Press, 2008.
- Loke Y.J., Hannan A.J., Craig J.M., The Role of Epigenetic Change in Autism Spectrum Disorders, *Front. Neurol.* 6 (2015) 107.
- Madi T., Balamurugan K., Bombardi R., Duncan G., McCord B., The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing, *Electrophoresis.* 33 (2012) 1736-1745.
- Mandavilli B.S., Santos J.H., van Houten B., Mitochondrial DNA repair and aging, *Mutat. Res.* 509 (2002) 27–151.
- Mannello F., Bianchi G., Gazzanelli G., Immunoreactivity of prostate-specific antigen in plasma and saliva of healthy women. *Clin. Chem.* 42 (1996) 1110–1111.
- Martin G.M., Epigenetic drift in aging identical twins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (2005) 10413–10414.
- Mastroeni D., Grover A., Delvaux E., Whiteside C., Coleman P.D., Rogers J., Epigenetic changes in Alzheimer’s disease: decrements in DNA methylation, *Neurobiol. Aging.* 31 (2010) 2025–2037.
- Mather K.A., Jorm A.F., Parslow R.A., Christensen H., Is Telomere Length a Biomarker of Aging? A Review, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 66A (2011) 202-213.
- Mayer W., Niveleau A., Walter J., Fundele R., Haaf T., Demethylation of the zygotic paternal genome, *Nature.* 403 (2000) 501–502.

- Meissner C., Bruse P., Oehmichen M., Tissue-specific deletion patterns of the mitochondrial genome with advancing age, *Exp. Gerontol.* 41 (2006) 508–524.
- Meissner C., Mohamed S.A., Klueter H., Hamann K., von Wurmb N., Oehmichen M., Quantification of mitochondrial DNA in human blood cells using an automated detection system, *Forensic Sci. Int.* 113 (2000) 109–112.
- Meissner C., Ritz-Timme S., Molecular pathology and age estimation, *Forensic Sci. Int.* 15 (2010) 34–43.
- Melov S., Shoffner J.M., Kaufman A., Wallace D.C., Marked increase in the number and variety of mitochondrial DNA rearrangements in aging human skeletal muscle, *Nucleic Acids Res.* 23 (1995) 4122–4126.
- Miller C.A., Sweatt J.D., Covalent modification of DNA regulates memory formation, *Neuron.* 53 (2007) 857–869.
- Miranda T.B., Jones P.A., DNA methylation: the nuts and bolts of repression, *J. Cell Physiol.* 213 (2007) 384–390.
- Moore K.L., Persaud T.V.N., *Embriologia Básica.* 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- Nussbaumer C., Gharehbaghi-Schnell E., Korschineck I., Messenger RNA profiling: a novel method for body fluid identification by real-time PCR, *Forensic Sci. Int.* 157 (2006) 181–186.
- Pai A.A., Bell J.T., Marioni J.C., Pritchard J.K., Gilad Y., A Genome-Wide Study of DNA Methylation Patterns and Gene Expression Levels in Multiple Human and Chimpanzee Tissues, *Plos Genet.* 7 (2011) 1–11.
- Pang B.C.M., Cheung B.K.K., Identification of human semenogelin in membrane strip test as an alternative method for the detection of semen, *Forensic Sci. Int.* 169 (2007) 27–31.
- Park J., Kwon O., Kim J.H., Yoo H., Lee H., Woo K., Kim S., Lee S., Kim Y.S., Identification of body fluid-specific DNA methylation markers for use in forensic science. *Forensic Sci. Int. Genet.* 13 (2014) 147–153.
- Peterson C.L., Laniel M.A., Histones and histone modifications, *Curr. Biol.* 14 (2004) R546–R551.
- Ponce A.C., Pascual F.A.V., Critical revision of presumptive tests for bloodstains, *Forens. Sci. Commun.* 1 (1999) 1–15.
- Poulsen P., Esteller M., Vaag A., Fraga M.F., The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases, *Pediatr. Res.* 61 (2007) 38R–42R.
- Ramsthaler F., Ebach S.C., Birngruber C.G., Verhoff M.A., Postmortem interval of skeletal remains through the detection of intraosseal hemin traces. A comparison of UV-fluorescence, luminol, Hexagon-OBTI, and Combur tests, *Forensic Sci. Int.* 209 (2011) 59–63.
- Rakyan V.K., Down T.A., Maslau S., Andrew T., Yang T.P., Beyan H., Whittaker P., McCann O.T., Finer S., Valdes A.M., Leslie R.D., Deloukas P., Spector T.D., Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains, *Genome Res.* 20 (2010) 434–439.
- Saferstein R., *Criminalistics: An Introduction to Forensic Science.* Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall, 2004, pp. 348–349.
- Santucci K.A., Nelson D.G., McQuillen K.K., Duffy S.J., Linakis J.G., Wood's lamp utility in the identification of semen, *Pediatrics* 104 (1999) 1342–1344.
- Sato I., Yoshiike M., Yamasaki T., Yoshida K., Takano S., Mukai T., Iwamoto T., A dot-blot-immunoassay for semen identification using a polyclonal antibody against semenogelin, a powerful seminal marker, *Forensic Sci. Int.* 122 (2001) 27–34.
- Sato I., Sagi M., Ishiwari A., Nishijima H., Ito E., Mukai T., Use of the 'SMITEST' PSA card to identify the presence of prostate-specific antigen in semen and male urine, *Forensic Sci. Int.* 127 (2002) 71–74.
- Seidl S., Hausmann R., Betz P., Comparison of laser and mercury-arc lamp for the detection of body fluids on different substrates, *Int. J. Legal. Med.* 122 (2008) 241–244.
- Sensabaugh G.F., Isozymes in forensic science, in: M.C. Rattazzi, J.G. Scandalios, G.S. Whitt (Eds.), *Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research*, New York: Alan R. Liss Inc., 1982, pp. 247–260.
- Shaler R.C., Modern forensic biology, in: R. Saferstein (Ed.), *Forensic Science Handbook*, Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2002, pp. 529–546.
- Shaw P., Ngan F., But P.P., Wang J., Molecular markers in Chinese medical materials, [http://www.worldscibooks.com/etextbook/4700/4700\\_chap1\\_1.pdf](http://www.worldscibooks.com/etextbook/4700/4700_chap1_1.pdf). Acesso em outubro de 2009.
- Snustad D.P., Simmons M.J., *Fundamentos de Genética*, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

- Solnica-Krezel L., Sepich D.S., Gastrulation: Making and Shaping Germ Layers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28 (2012) 11.1–11.31.
- Spalding R.P., Identification and characterization of blood and bloodstains, in: S.H. James, J.J. Nordby (Eds.), *Forensic Science: an Introduction to Scientific and Investigative Techniques*, Boca Raton: CRC Press, 2003, pp. 181–201.
- St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D., Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 44784–44790.
- Sweet D., Hildebrand D., Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report, *Int. J. Legal Med.* 112 (1999) 201–203.
- Teschendorff A.E., Menon U., Gentry-Maharaj A., Ramus SJ, Weisenberger D.J., Shen H., Campan M., Noushmehr H., Bell C.G., Maxwell A.P., Savage D.A., Mueller-Holzner E., Marth C., Kocjan G., Gayther S.A., Jones A., Beck S., Wagner W., Laird P.W., Jacobs I.J., Widschwendter M., Agedependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer., *Genome Res.* 20 (2010) 440-446.
- Toyota M., Ahuja N., Ohe-Toyota M., Herman J.G., Baylin S.B., Issa J.P., CpG island methylator phenotype in colorectal cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 8681–8686.
- Tra J., Kondo T., Lu Q., Kuick R., Hanash S., Richardson B., Infrequent occurrence of age-dependent changes in CpG island methylation as detected by restriction landmark genome scanning, *Mech. Ageing Dev.* 123 (2002) 1487–1503.
- Vandenberg N., Van Oorshot R.A.H., The use of Polilight in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests, *J. Forensic Sci.* 51 (2006) 361–370.
- Vijg J., Campisi J., Puzzles, promises and a cure for ageing, *Nature.* 454 (2008) 1065–1071.
- Virkler K., Lednev I.K., Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene, *Forensic Sci. Int.* 188 (2009) 1–17.
- Webb J.L., Creamerand J.I., Quickenden T.I., A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques, *Luminescence* 21 (2006) 214–220.
- Wolpert L., Jessell T., Lawrence P., Meyerowitz E., Robertson E., Smith J., *Princípios de biologia do desenvolvimento.* 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- Xu Y., Xie J., Cao Y., Zhou H., Ping Y., Chen L., Gu L., Hu W., Bi G., Ge J., Chen X., Zhao Z., Development of highly sensitive and specific mRNA multiplex system (XCYR1) for forensic human body fluids and tissues identification, *PLoS One.* 9 (2014) e100123.
- Yamane R.S., Marcadores moleculares, <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL003.htm>. Acesso em setembro de 2009.
- Yi S.H., Xu L.C., Mei K., Yang R.Z., Huang D.X., Isolation and identification of age-related DNA methylation markers for forensic age-prediction, *Forensic Sci. Int. Genet.* 11 (2014) 117-125.
- Ziller M.J., Gu H., Muller F., Donaghey J., Tsai L.T., Kohlbacher O., De Jager P.L., Rosen E.D., Bennett D.A., Bernstein B.E., Gnirke A., Meissner A., Charting a dynamic DNA methylation landscape of the human genome, *Nature.* 500 (2013) 477–481.
- Zubakov D., Hanekamp E., Kokshoorn M., Van IJcken W., Kayser M., Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples, *Int. J. Legal Med.* 122 (2008) 135–142.
- Zubakov D., Liu F., van Zelm M.C., Vermeulen J., Oostra B.A., van Duijn C.M., Driessen G.J., van Dongen J.J.M., Kayser M., Langerak A.W., Estimating human age from T-cell DNA rearrangements, *Curr. Biol.* 20 (2010) R970-1.