

Epigenética em Ciências Forenses

M.A. Cáceres-Durán ^{a,b*}, M.P.M. de Souza ^{b,c}, L.M. Cáceres ^d, P.A. Francez ^{b,e}

^a *Laboratório de Genética Humana e Médica. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém (PA), Brasil.*

^b *Instituto Nacional de Perícias e Ciências Forenses, Belém (PA), Brasil.*

^c *Laboratório de Biologia Molecular. Seção de Arbovirologia e Febres Hemorrágicas. Instituto Evandro Chagas, Belém (PA), Brasil.*

^d *Dentista da Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.*

^e *Laboratório Forense da Polícia Técnico-Científica (POLITEC-AP), Macapá (AP), Brasil.*

*Endereço de e-mail para correspondência: macdur@gmail.com. Tel.: +55-91-98053-2660.

Recebido em 17/01/2023; Revisado em 27/03/2023; Aceito em 11/04/2023

Resumo

A epigenética envolve mudanças na função dos genes que não estão relacionadas a mudanças na sequência do DNA. Dentro dos mecanismos epigenéticos estão a metilação do DNA e os RNAs não codificantes (ncRNAs). A metilação do DNA é um processo pelo qual se agrega grupos metil ao DNA e geralmente tem por função, dificultar a transcrição genética. Padrões de metilação podem ser usados no campo forense para determinação tecidual e de fluidos, estimativa de idade e diferenciação entre gêmeos monozigóticos. Os ncRNAs reguladores são moléculas de RNA que não são traduzidas em proteína, e têm uma importante função na regulação da expressão gênica. Dentre eles, os mais estudados são os microRNAs (miRNAs), que podem induzir silenciamento genético através da sua associação direta com o RNA mensageiro (mRNA). Numerosos estudos publicados relatam que muitos miRNAs são expressos de maneira tecido-específica, sendo bastante promissores para o campo forense na identificação de fluidos biológicos como sangue, sêmen, saliva e secreções vaginais. Os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) se valem de diversos mecanismos para regular a expressão gênica. Diversos estudos têm demonstrado o potencial uso dos lncRNAs como marcadores biológicos, no entanto, devido ao grande número de lncRNAs existentes, ainda precisam ser mais bem caracterizados para avaliar o seu possível uso no campo forense. As aplicações epigenéticas nas ciências forenses são relativamente novas e atualmente limitadas, entretanto, o mundo da epigenética tem o potencial de melhorar as investigações criminais, aumentando a quantidade de informações que podem ser obtidas de materiais biológicos obtidos nas cenas de crimes, contribuindo assim, no que diz respeito as evidências criminais para o sistema judicial.

Palavras-Chave: Epigenética; Epigenômica; Metilação; RNA não codificante.

Abstract

Epigenetics involves changes in gene function that are unrelated to changes in the DNA sequence. Among the epigenetic mechanisms are DNA methylation and non-coding RNAs (ncRNAs). DNA methylation is a process by which methyl groups are added to DNA and generally acts to repress gene transcription. Methylation patterns can be used in forensic for identification of biological fluids and tissues, age estimation and distinguishing between monozygotic twins. Regulatory ncRNAs are RNA molecules that are not translated into protein and play an important role in the regulation of gene expression. Among them, the most studied are microRNAs (miRNAs), which can induce genetic silencing through their direct association with messenger RNA (mRNA). Numerous published studies report that many miRNAs are expressed in a tissue-specific manner, being quite promising for the forensic field in the identification of biological fluids such as blood, semen, saliva and vaginal secretions. Long non-coding RNAs (lncRNAs) use several mechanisms to regulate gene expression. Several studies have demonstrated the potential use of lncRNAs as biological markers, however, due to the large number of existing lncRNAs, they still need to be better characterized to evaluate their possible use in the forensic field. Epigenetic applications in forensic science are relatively new and currently limited, however, the world of epigenetics has the potential to improve criminal investigations by increasing the amount of information that can be obtained from biological material found at crime scenes, thus contributing to more evidence for the justice system.

Keywords: Epigenetics; Epigenomics; Methylation; non-coding RNA.

1. INTRODUÇÃO

O material genético como evidência para aplicações forenses tem tido um imenso impacto no campo forense. O ácido desoxirribonucleico (DNA) pode servir como evidência infalível em casos criminais, e é considerado imune à subjetividade e ao viés. Por isso, as evidências de DNA são muitas vezes consideradas como modelo de evidências forenses. No entanto, novas pesquisas mostraram que o genoma não é inteiramente preditivo do fenótipo e existem muitos outros fatores biológicos que estão envolvidos na expressão gênica. Sabe-se que todo o DNA humano é composto pelas mesmas bases nucleotídicas, porém, é sabido que as células estão diferenciadas com base na sua função. Estas diferenças são o resultado de interruptores moleculares que determinam a expressão gênica. Há muitos desafios envolvidos no estudo de uma cena de crime, por isto, os cientistas forenses estão constantemente procurando por novos métodos para melhorar as técnicas atuais que possam ajudar nas investigações criminais [1-3].

Nos últimos anos, a tipagem de DNA forense tem se concentrado principalmente em demonstrar a ligação entre um suspeito com a evidência, testando um conjunto de marcadores de repetição curta em tandem (STR). Com os avanços na tecnologia de detecção de DNA e o aumento do número de marcadores disponíveis, perfis de DNA úteis podem ser obtidos a partir de materiais de evidência altamente danificados. No entanto, os perfis de DNA muitas vezes podem falhar na identificação de pessoas quando não há suspeito disponível, e o perfil de DNA de evidência não corresponde ao de qualquer pessoa no banco de dados de DNA Forense [4].

2. EPIGENÉTICA E EPIGENÔMICA

O termo “epigenética” parece ser usado para explicar uma ampla gama de observações biológicas, por isso é útil ter uma definição precisa de seu significado. A palavra “epigenética” foi usada pela primeira vez por Conrad Waddington em 1942, definindo-se como “um ramo da biologia que estuda as interações causais entre genes e seus produtos que dão origem ao fenótipo”. Atualmente, o termo epigenética pode ser definido como mudanças no fenótipo que não são causadas por alterações na sequência de DNA que são mitoticamente e/ou meioticamente hereditárias [5].

O termo "epigenoma" refere-se ao status epigenético geral de uma célula, paralelo ao termo "genoma". O epigenoma é o conjunto de modificações químicas no DNA que alteram a expressão gênica [6].

A epigenética estuda as alterações herdadas no fenótipo ou expressão gênica causada por mecanismos diferentes das alterações na sequência do DNA, e é uma área emergente de interesse nas ciências forenses. Essas

mudanças podem persistir através de múltiplas divisões celulares, mesmo para o restante da vida da célula, e podem durar várias gerações. Os mecanismos epigenéticos mais significativos incluem a metilação do DNA, as modificações das histonas (metilação e acetilação) e os processos mediados pela classe mais recentemente descoberta, os ácidos ribonucleicos (RNAs) não codificantes (ncRNAs) [7]. Nesta revisão, daremos ênfase nos processos de metilação do DNA e nos ncRNAs, mostrando o seu potencial uso nas ciências forenses.

3. METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA é a modificação epigenética melhor caracterizada, na qual um grupo metila (CH_3) é adicionado covalentemente à citosina no DNA, especificamente em ilhas CpG (Figura 1) [3,7,8].

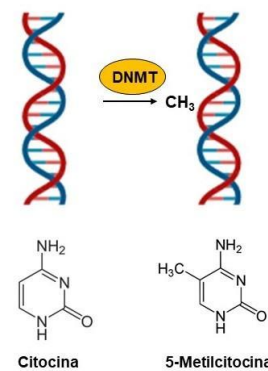


Figura 1. Metilação do DNA. A metilação do DNA é um processo pelo qual há agregação de grupos metil (CH_3) ao DNA e geralmente ocorre para reprimir a transcrição genética. A metilação da citosina para formar 5-metilcitosina ocorre na quinta posição no anel da pirimidina e é realizada por enzimas DNA metilases DNMT.

As ilhas CpG metiladas próximas aos promotores do gene o tornam compacto e inacessível aos fatores de transcrição levando à inativação do gene. A epigenética tem um amplo papel no desenvolvimento humano e é um regulador chave do *imprinting* genômico e da inativação do cromossomo X. A má programação da regulação epigenética e a metilação aberrante do DNA estão relacionadas a várias doenças humanas [5].

Apesar de sua estabilidade, a metilação do DNA é influenciada por vários fatores, como nutrição, envelhecimento, tabagismo, fatores psicossociais, exposição a poluentes, entre outros. Com o passar dos anos, a metilação do DNA diminui devido à perda da capacidade da maquinaria de metilação do DNA de manter os padrões de metilação [9].

Em relação a outras modificações epigenéticas, a metilação de DNA é a mais usada na perícia. Atualmente, apenas um número limitado de marcadores de metilação de DNA são aplicados para fins forenses. Essas abordagens

incluem perfil de metilação de DNA para determinação tecidual, predição de idade e diferenciação entre gêmeos monozigóticos. O conceito de epigenômica personalizada, que já é utilizado na pesquisa médica, ainda não foi reconhecido no campo forense [10,11].

3.1. Identificação de tecidos e fluidos corporais

Uma vez que análises recentes do epigenoma indicaram que o DNA carrega padrões de metilação tecido-específicos, foi evidenciado o seu potencial uso para identificação de fluidos corporais examinados no campo forense [12-15].

Em ciências forenses, a detecção e identificação de um fluido corporal presente na cena do crime é crucial para a investigação. Regiões metiladas diferencialmente demonstram variação nos padrões de metilação de acordo com o tipo de tecido/célula/fluido. Tais regiões podem ser não metiladas em tecidos específicos, mas exibem graus variados de metilação em outros, proporcionando assim características distintivas entre eles. Isso permite não apenas encontrar a origem da amostra de DNA, mas também estimar a população de vários tipos de células na amostra [9,11].

Ensaio de identificação de tecidos baseado em metilação têm sido promissores para as aplicações forenses, fornecendo um sistema de formato único com alta especificidade, o qual pode identificar sangue, saliva, sêmen e pele, sugerindo que a identificação de tecidos por padrões de metilação provavelmente será uma ferramenta viável para análises forenses de materiais biológicos [12].

3.2. Diferenciação entre gêmeos monozigóticos

A diferenciação entre gêmeos monozigóticos para fins forenses é atualmente impossível usando perfil de STR, uma vez que compartilham o mesmo perfil genético. Essa incapacidade causa problemas em casos criminais ou de paternidade envolvendo gêmeos monozigóticos como suspeitos ou supostos pais [10,16].

Por outro lado, o perfil de metilação do DNA foi recentemente proposto como uma abordagem para superar este desafio. Kader e Ghai (2015) estudaram a metilação de todo o genoma no DNA do sangue de 10 pares de gêmeos monozigóticos, encontrando 19-111 sítios metilados diferencialmente entre eles. No entanto, estudos futuros precisarão abordar o número ideal de marcadores epigenéticos necessários para a identificação confiável de indivíduos gêmeos monozigóticos, incluindo considerações estatísticas [10]. Xu *et al* (2015) concluíram que existem diferenças globais na metilação do DNA em alguns pares de gêmeos monozigóticos. Eles propuseram que a metilação do DNA na família de elementos transponíveis LINE-1 pode ser um marcador potencial para ajudar a discriminar indivíduos dentro de pares de gêmeos

monozigóticos. Além disso, destacaram que a especificidade do tecido deve ser considerada na prática. [16].

Os avanços no conhecimento do epigenoma irão definir se a metilação do DNA é uma metodologia apropriada para resolver este problema forense [16,17].

3.3. Predição de idade

Existem muitas técnicas utilizadas para a estimativa da idade individual, no entanto, muitas delas requerem a presença do indivíduo para análise, por exemplo registros dentários ou restos esqueléticos. Ainda assim, se uma amostra de fluido corporal for recuperada da cena do crime que seja atribuível ao infrator e não houver perfis de DNA suspeitos ou correspondentes nos bancos de dados de DNA, essa amostra é a única coisa que pode ser analisada para obter mais informações. Para estimar a idade humana, várias estratégias de base molecular têm sido propostas, como a determinação do comprimento dos telômeros que diminui com o aumento da idade, identificação de mutações de RNA mensageiro (mRNA) que se acumulam com o aumento da idade, de rearranjos de DNA de células T, de deleções de DNA mitocondrial dependentes da idade ou alterações de proteínas, como a racemização de ácido aspártico e produtos de glicação avançada. A epigenética tem uma ligação comprovadamente forte com o envelhecimento. Acredita-se que a idade e a metilação do DNA exibem uma relação inversa, ou seja, o envelhecimento das células está associado à perda da metilação do DNA com uma precisão aceitável que é clinicamente útil [3,18-25]. Vários estudos também destacam mudanças relacionadas à idade na metilação global do DNA [18,26]. Foi encontrada uma correlação negativa entre idade e metilação do DNA em 43 sítios CpG em seis genes [27], além de também terem sido demonstradas que alterações na metilação do DNA relacionadas à idade, são tecido-específicas [28]. Por esses motivos, o uso da metilação do DNA para a predição individual da idade tornou-se rapidamente o método mais confiável para fins forenses.

3.4. Informação de ancestralidade

As populações são frequentemente divididas categoricamente em grupos raciais/étnicos distintos com base em construções sociais e não biológicas. A ancestralidade genética tem sido sugerida como uma alternativa a essa categorização [31]. Na idade adulta, há evidências de que vários grupos raciais diferem em termos de seus padrões de metilação do DNA em tecidos saudáveis e seus padrões de mudança em alguns tecidos cancerosos. Existe uma extensa variação dependente da população e ancestralidade na metilação do DNA. De acordo com estudos recentes, as populações africanas têm

geralmente menor metilação global do que os caucasianos [29,30]. A metilação medida no sangue periférico se correlaciona com a composição leucocitária e está associada à etnia, estresse psicossocial e status socioeconômico no início da vida [32].

Um estudo de Rahmani *et al* (2017) demonstrou que o sinal de informação de ancestralidade é espelhado em dados de metilação de DNA em todo o genoma [33]. Galanter *et al* (2017) tipificaram mais de 450.000 ilhas CpG no sangue total de 573 indivíduos de diversas origens hispânicas, encontrando que tanto a etnia auto-identificada, quanto a ancestralidade geneticamente determinada, foram significativamente associadas aos níveis de metilação em 916 e 194 CpG, respectivamente, concluindo que a metilação diferencial entre grupos étnicos é parcialmente explicada pela ancestralidade genética compartilhada [31].

Um estudo bastante relevante para discriminar marcadores informativos de ancestralidade altamente aplicável às ciências forenses observou diferenças em indivíduos negros, brancos e hispanos em Nova York até a meia-idade. No registro de nascimento, os negros apresentaram níveis mais baixos de metilação do que os brancos e os hispanos. Essa associação entre a metilação do DNA e os grupos não se alterou após o ajuste das variáveis do curso de vida. Outros fatores, como tabagismo, tabagismo passivo e status socioeconômico familiar também foram considerados, mas, no geral, os indivíduos de raça negra demonstraram níveis mais baixos de metilação [29].

Embora o uso da metilação diferencial pareça bastante promissor na distinção de grupos étnicos, é uma ferramenta de grande preocupação devido as questões legais e éticas [11].

4. RNAs NÃO CODIFICANTES (ncRNAs)

Com base nas suas funções, os ncRNAs podem ser divididos em duas classes amplas: ncRNAs *housekeeping* e ncRNAs regulatórios. Os *housekeeping* regulam principalmente funções celulares genéricas, como por exemplo, tradução de mRNA, *splicing* e modificação de RNA ribossômico (rRNA). Por outro lado, os reguladores podem ser divididos, com base no comprimento do transcrito, em transcritos não codificantes curtos, compreendendo menos de 200 nucleotídeos (nt) e ncRNAs longos, compreendendo transcritos maiores que 200 nt [34]. Esta classe de RNA não codificador de proteína e moléculas de RNA funcional inclui RNAs não codificantes longos (lncRNAs), RNAs não codificantes circulares (circRNAs), pequenos RNAs de interferência (siRNA), pequenos RNAs nucleolares (snoRNA), RNA de interação com piwi (piRNA), entre outros [35,36]. Dentro dos ncRNAs vamos focar principalmente nos miRNAs e nos lncRNAs.

Em geral, os miRNAs normalmente reprimem a expressão de alvos genéticos no nível pós-transcricional (Figura 2). Em contraste, os lncRNAs podem usar vários métodos para regular a expressão gênica. Estes incluem a remodelação da cromatina para ativar ou reprimir a transcrição, modulando o pré-mRNA e inibindo a tradução do mRNA (Figura 2) [37].

Apesar de sua instabilidade termodinâmica em relação ao DNA, RNA de qualidade e quantidade suficiente para análise pode ser recuperado de itens probatórios tipicamente encontrados em casos de biologia forense, sendo possível co-extrair DNA e RNA. Uma vez que o RNA é convertido em DNA complementar (cDNA), a mesma análise química usada para o DNA pode ser conduzida usando as mesmas plataformas analíticas. Ao contrário do DNA genômico, onde duas cópias de um segmento de DNA autossômico estão presentes em uma célula, múltiplos segmentos do genoma são copiados em espécies de RNA em uma célula. Esse aumento no número de cópias pode ajudar a amenizar a redução do número de alvos do RNA devido à degradação normal que ocorre durante a fase de secagem após o líquido fisiológico ter sido depositado *ex vivo* [41].

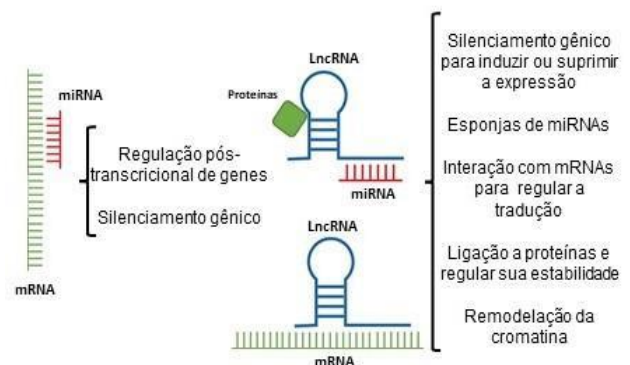


Figura 2. Funções dos microRNAs (miRNAs) e RNAs longos não codificantes (lncRNAs). Os miRNAs desempenham papéis importantes na regulação gênica pós-transcricional. Em células animais, os miRNAs regulam seus alvos por inibição traducional e desestabilização do mRNA. Os lncRNAs induzem ou suprimem a expressão gênica induzindo modificações na cromatina ou interagindo com a enzima RNA polimerase; também podem agir como esponjas de miRNA, formar uma estrutura estável de RNA de fita dupla com mRNAs e regular a tradução; além disso, podem se ligar a proteínas e regular sua estabilidade.

O perfil de miRNA tem sérias vantagens em comparação com o perfil de mRNA. Em primeiro lugar, devido ao seu pequeno tamanho, de cerca de 22 nt, os miRNAs maduros são muito mais estáveis do que os mRNAs, o que é de suma importância em ambientes forenses, pois torna os miRNAs maduros decididamente menos suscetíveis ao fracionamento por tensão química ou física [38].

4.1. Identificação de fluidos corporais

Têm sido demonstrados que alguns miRNAs são expressos de maneira tecido-específica e vários deles têm sido identificados e sugeridos como biomarcadores potenciais na identificação de fluidos corporais relevantes nas ciências forenses.

A expressão de 452 miRNAs humanos foi avaliada por meio de análise quantitativa de PCR em vários fluidos corporais, onde foi determinado um painel composto por nove miRNAs (miR451, miR16, miR135b, miR10b, miR658, miR205, miR124a, miR372 e miR412) que apresentam expressão diferencial em grau que permite a identificação da origem de manchas biológicas forenses (sangue, saliva, sêmen, secreções vaginais e sangue menstrual), utilizando apenas 50 pg de RNA total [39].

Mayes *et al* (2018) sugeriram que a presença de miR-141-3p e miR-412-3p poderia ser usada para indicar sangue menstrual [40]. Zubakov *et al* (2010) demonstraram que quatro miRNAs estão presentes e fortemente expressos no sêmen (miR-507, miR-135a, miR-943 e miR-10a) [41]. Os miRNAs miR-200b, miR-486-5p, miR-16-5p, miR-451a, miR-144-3p, miR-126-5p, miR-144-5p foram identificados como marcadores específicos de fluidos corporais como sangue, sangue menstrual, saliva, urina, sêmen, suor e fezes [42-44].

Um outro estudo recente identificou 15 miRNAs candidatos em quatro tipos de fluidos corporais (sangre venoso, saliva, sêmen e secreção vaginal) por RT-qPCR e descobriu que sete deles (miR-144-3p, miR-451a-5p, miR-888-5p, miR-891a-5p, miR-203a-3p, miR-223-3p e miR-1260b) foram úteis para discriminá-los [45].

Os resultados desses estudos fornecem uma indicação inicial de que o perfil de miRNA pode ser uma abordagem alternativa promissora para a identificação de fluidos corporais para casos forenses.

4.2. Predição de idade

Certos miRNAs são altamente relacionados à idade e podem ter utilidade potencial na predição de idade. Um estudo realizado em 2020 por Fang *et al*, através do algoritmo AdaBoost, estabeleceu um modelo de predição de idade baseado em miRNAs, sendo miR-98-3p, miR-324-3p, miR-32-3p, miR-330-5p, miR-374c-5p e miR-342-3p os possíveis biomarcadores de predição, com os resultados revelando o erro médio absoluto de 5,52 e 7,46 para amostras de sangue masculina e feminina, respectivamente [46].

Wu *et al* (2015) identificaram vários lncRNAs em células de fibroblasto humano senescente que apresentam níveis de expressão diferencial em comparação com células jovens correspondentes, indicando que o lncRNA SALNR tem um papel importante na senescência [47]. Marttila *et al* (2020) relataram padrões de expressão de

lncRNAs associados à idade em 29 tecidos humanos. Esses marcadores de lncRNA estão envolvidos em processos do sistema imunológico, transdução e transcrição de sinais e a maioria deles são altamente tecido-específicos. No entanto, o estudo de lncRNAs relacionados ao processo de envelhecimento é dificultado pelo baixo número de lncRNAs funcionalmente caracterizados [48].

4.3. Outras aplicações

Mesmo que nos últimos anos alguns estudos tenham fornecido novas evidências sobre as aplicações forenses dos miRNAs, muitas evidências ainda precisam ser divulgadas. Os miRNAs estão envolvidos em muitas vias moleculares e, devido à sua ubiquidade, têm sido considerados marcadores em diversas áreas. O estudo de Tu *et al* (2018) concentrou-se na estabilidade de miRNAs e RNAs circulares (circRNAs), através de algoritmos específicos (geNorm e NormFinder), em camundongos, e relatou os seguintes marcadores como adequados para estimativa de intervalo post-mortem (IPM): miR-122, miR-133a e 18S em tecido cardíaco, LC-Ogdh, circ-AFF1 e miR-122 em fígado e miR-133a, circ-AFF1 e LC-LRP6 no tecido muscular esquelético, indicando assim, que miRNAs e circRNAs foram mais estáveis como genes de referência do que outros tipos de RNAs em relação à estimativa de IPM [49]. Neste sentido, vários ncRNAs devem ser investigados como marcadores de diversos processos como vitalidade e idade de uma ferida, cicatrização de pele e, talvez, o seu uso na distinção entre lesões ante-mortem e post-mortem [50]. No caso dos lncRNAs, estudos têm demonstrado o seu potencial uso como marcadores biológicos, no entanto, devido ao grande número de lncRNAs existentes, ainda precisam ser mais bem caracterizados para o seu possível uso no campo das ciências forense.

5. CONCLUSÕES

Existem várias limitações na aplicação da epigenética na área forense. Uma das principais é a quantidade e qualidade limitada do material biológico. O ensaio utilizado na identificação da metilação do DNA deve possuir alta especificidade e sensibilidade, por exemplo. Além disso, é um fato bem estabelecido que o padrão de metilação do DNA é alterado devido a fatores extrínsecos como consumo de álcool, tabagismo, abuso de substâncias, dieta, medicamentos, estresse, entre outros. Portanto, é importante garantir que os marcadores selecionados para a identificação do padrão de metilação do DNA não sejam influenciados por esses fatores. Outra limitação do uso da epigenética para fins forenses é seu custo elevado, o que tornaria inviável para os países em desenvolvimento realizar essas análises rotineiramente. As aplicações epigenéticas nas ciências forenses são relativamente novas

e atualmente limitadas, mas a epigenética forense tem o potencial de contribuir para o progresso das investigações criminais, não apenas aumentando a quantidade de informações que podem ser obtidas de um vestígio biológico na cena do crime, mas também abordando os desafios das evidências que podem ser encontradas no sistema judicial.

As principais áreas onde a epigenética forense tem valor são na identificação de fluidos corporais, predição de idade individual e diferenciação entre gêmeos monozigóticos. Espera-se que os desenvolvimentos tecnológicos e científicos atuais e previstos no campo da epigenômica humana permitam o crescimento da epigenética e epigenômica forense, que, sem dúvida, terá um grande impacto no sistema de justiça criminal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] D.F. Eilerts. Beyond DNA, Epigenetics and Proteomics in Forensic Science. *Themis, Res. J. Just. Stud. & Forensic Sci.* **4(1)**, 175-187, 2016.
- [2] Pittcon. Epigenetics, A New Tool for Forensic Detectives. News-Medical, 2021. Acesso em 04 dez 2021, disponível em, <https://www.news-medical.net/news/20171220/Epigenetics-A-New-Tool-for-Forensic-Detectives.aspx>
- [3] F. Kader, M. Ghai, A.O. Olaniran. Characterization of DNA methylation-based markers for human body fluid identification in forensics, a critical review. *Int. J. Legal Med.* **134(1)**, 1-20, 2020.
- [4] H.Y. Lee, S.D. Lee, K.J. Shin. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Reports*, **49(7)**, 359-369, 2016.
- [5] L. Armstrong. Epigenetics. 1. ed. [s.l.], Garland Science, 2020.
- [6] C. Maulani, E.I. Auerkari. Age estimation using DNA methylation technique in forensics, a systematic review. *Egypt. J. Forensic Sci.* **10(1)**, 1-15, 2020.
- [7] J.-W. Wei, K. Huang, C. Yang, C.S. Kang. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. *Oncol. Rep.* **37(1)**, 3-9, 2017.
- [8] Sabeeha, S.E. Hasnain. Forensic Epigenetic Analysis, The Path Ahead. *Med. Princ. Pract.* **28(4)**, 301-308, 2019.
- [9] L. Gil. Forensic applications of DNA methylation analysis (2020). Disponível em, <<https://revistamedicojuridica.com/blog/2020/01/24/forensic-applications-of-dna-methylation-analysis/>>. Acesso em, 30 out. 2022.
- [10] A. Vidaki, A. C. Díez López, E. Carnero-Montoro, A. Ralfa, K. Wardb, T. Spectorb, J.T. Bellb, M. Kayser. Epigenetic discrimination of identical twins from blood under the forensic scenario. *Forensic Sci. Int. Genet.* **31**, 67-80, 2017.
- [11] F. Kader, M. Ghai. DNA methylation and application in forensic sciences. *Forensic Sci. Int.* **249**, 255-265, 2015.
- [12] D. Frumkin, A. Wasserstrom, B. Budowle, A. Davidson. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci. Int. Genet.* **5(5)**, 517-524, 2011.
- [13] J.-H. AN, K.-J. Shin, W.-I. YANG, H.Y. Lee. Body fluid identification in forensics. *BMB Rep.* **45(10)**, 545-553, 2012.
- [14] A. Wasserstrom, D. Frumkin, A. Davidson, M. Shpitzen, Y. Herman, R. Gafny. Demonstration of DSI-semen - A novel DNA methylation-based forensic semen identification assay. *Forensic Sci. Int. Genet.* **7(1)**, 136-142, 2013.
- [15] T. Madi, K. Balamurugan, R. Bombardi, Robin, G. Duncan, B. McCord. The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing, *Nucleic acids. Electrophoresis.* **33(12)**, 1736-1745, 2012.
- [16] J. Xu, G. Fu, L. Yan, J.M. Craig, X. Zhang, L. Fua, C. Ma, S. Li, B. Cong. LINE-1 DNA methylation, A potential forensic marker for discriminating monozygotic twins. *Forensic Sci. Int. Genet.* **19**, 136-145, 2015.
- [17] H.Y. Lee, S.D. Lee, K.J. Shin. Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Rep.* **49(7)**, 359-369, 2016.
- [18] C. Cencioni, F. Spallotta, F. Martelli, Fabio, S. Valente, A. Mai, A.M. Zeiher, C. Gaetano. Oxidative Stress and Epigenetic Regulation in Ageing and Age-Related Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **14(9)**, 17643-17663, 2013.
- [19] K.A. Mather, J.B. Kwok, N. Armstrong, P.S. Sachdev. The role of epigenetics in cognitive ageing, Epigenetics and cognitive ageing. *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* **29(11)**, 1162-1171, 2014.
- [20] I.M. REA. Towards ageing well, Use it or lose it, Exercise, epigenetics and cognition. *Biogerontology.* **18(4)**, 679-691, 2017.
- [21] G. Williams, B. Horn, Bradley. Forensic epigenetics methods and applications. In, *Epigenetics Methods*. [s.l.], Elsevier. 647-669, 2020.
- [22] C. Weidner, Q. Lin, C. Koch, Carmen, L. Eisele, F. Beier, P. Ziegler, D.O. Bauerschlag, K.H. Jöckel, R. Erbel, T.W. Mühleisen et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol.* **15(2)**, 1-12, 2014.
- [23] D. Zubakov, F. Liu, I. Kokmeijer, Iris, Y. Choi, J.BJ van Meurs, W.F.J van IJcken, A.G Uitterlinden, A. Hofman, L. Broer, C.M. van Duijn et al. Human age estimation from blood using mRNA, DNA methylation, DNA rearrangement, and telomere length. *Forensic Sci. Int. Genet.* **24**, 33-43, 2016.
- [24] WOCHNA, Katarzyna, Bonikowski, Radosław, Śmigielski, Janusz, J. Berent. Aspartic acid racemization of root dentin used for dental age estimation in a Polish population sample. *Forensic Sci. Med. Pathol.* **14(3)**, 285-294, 2018.

- [25] A. Freire-Aradas, C. Phillips, A. Mosquera-Miguel, L. Girón-Santamaría, A. Gómez-Tato, M. Casares de Cal, J. Álvarez-Dios, J. Ansele-Bermejo, M. Torres-Español, P.M. Schneider et al. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. *Forensic Sci. Int. Genet.* **24**, 65-74, 2016.
- [26] S. Horvath. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* **14(10)**, R115, 2013.
- [27] I. Florath, K. Butterbach, H. Muller, H. M. Bewerunge-Hudler, H. Brenner. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age, an epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Hum. Mol. Genet.* **23(5)**, 1186-1201, 2014.
- [28] K. Day, L.L. Waite, A. Thalacker-Mercer, A. West, M.M. Bamman, J.D. Brooks, R.M. Myers, D. Absher. Differential DNA methylation with age displays both common and dynamic features across human tissues that are influenced by CpG landscape. *Genome Biol.* **14(9)**, R102, 2013.
- [29] M.B. Terry, J.S. Ferris, R. Pilsner, J.D. Flom, P. Tehranifar, R.M. Santella, M.V. Gamble, E. Susser. Genomic DNA Methylation among Women in a Multiethnic New York City Birth Cohort. *CEPB.* **17(9)**, 2306-2310, 2008.
- [30] R.M. Adkins, J. Krushkal, F.A. Tylavsky, F. Thomas. Racial differences in gene-specific DNA methylation levels are present at birth. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* **91(8)**, 728-736, 2011.
- [31] J.M. Galanter, C.R. Gignoux, S.S. Oh, D. Torgerson, M. Pino-Yanes, N. Thakur, C. Eng, D. Hu, S. Huntsman, H.J. Farber et al. Differential methylation between ethnic sub-groups reflects the effect of genetic ancestry and environmental exposures. *eLife.* **6**, e20532, 2017.
- [32] L.L. Lam, E. Emberly, H.B. Fraser, S.M. Neumann, E. Chen, G.E. Miller, M.S. Kobor. Factors underlying variable DNA methylation in a human community cohort. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 17253-17260, 2012.
- [33] E. Rahmani, L. Shenhav, R. Schweiger, P. Yousefi, K. Huen, B. Eskenazi, C. Eng, S. Huntsman, D. Hu, J. Galanter et al. Genome-wide methylation data mirror ancestry information. *Epigenetics Chromatin.* **10(1)**, 1, 2017.
- [34] J.L. Charles Richard, P.J. Adam Eichhorn. Platforms for Investigating LncRNA Functions. *SLAS Technol.* **23(6)**, 493-506, 2018.
- [35] C. Klinge. Non-Coding RNAs in Breast Cancer, Intracellular and Intercellular Communication. *Non-Coding RNA.* **4(4)**, 40, 2018.
- [36] 9. S. Ning, X. Li. Non-coding RNA Resources. Em, X. Li, J. XU, Y. XIAO, S. Ning, Y. Zhang (Orgs.). Non-coding RNAs in Complex Diseases, 2018.
- [37] S. Kumar, E.A. Gonzalez, P. Rameshwar, J.P. Etchegaray. Non-Coding RNAs as Mediators of Epigenetic Changes in Malignancies. *Cancers.* **12(12)**, 3657, 2020.
- [38] C. Courts, B. Madea. Micro-RNA – A potential for forensic science? *Forensic Sci. Int.* **203(1-3)**, 106-111, 2010.
- [39] E. Hanson, H. Lubenow, Helge, J. Ballantyne. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal. Biochem.* **387(2)**, 303-314, 2009.
- [40] C. Mayes, S. Seashols-Williams, S. Hughes-Stamm. A capillary electrophoresis method for identifying forensically relevant body fluids using miRNAs. *Leg. Med.* **30**, 1-4, 2018.
- [41] D. Zubakov, A.W.M. Boersma, C. Ying, P.F. van Kuijk, E.A.C. Wiemer, K. Manfred. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int. J. Leg. Med.* **124(3)**, 217-226, 2010.
- [42] A. Rocchi, E. Chiti, A. Maiese, E. Turillazzi, I. Spinetti. MicroRNAs, An Update of Applications in *Forensic Science. Diagnostics* **11(1)**, 32, 2020.
- [43] S. Seashols-Williams, C. Lewis, C. Calloway, N. Peace, A. Harrison, C. Hayes-Nash, S. Fleming, Q. Wu, Z.E. Zehner. High-throughput miRNA sequencing and identification of biomarkers for forensically relevant biological fluids, *Nucleic Acids. Electrophoresis*, **37(21)**, 2780-2788, 2016.
- [44] Z. Wang, D. Zhou, Y. Cao, Z. Hu, S. Zhang, Y. Bian, Y. Hou, C. Li. Characterization of microRNA expression profiles in blood and saliva using the Ion Personal Genome Machine ® System (Ion PGMTM System). *Forensic Sci. Int. Genet.* **20**, 140-146, 2016.
- [45] S. Fujimoto, S. Manabe, C. Morimoto, M. Ozeki, Y. Hamano, E. Hirai, H. Kotani, K. Tamaki. Distinct spectrum of microRNA expression in forensically relevant body fluids and probabilistic discriminant approach. *Sci. Rep.* **9(1)**, 14332, 2019.
- [46] C. Fang, X. Liu, J. Zhao, B. Xie, J. Qian, W. Liu, B. Li, X. Zhang, H. Wu, J. Yan. Age estimation using bloodstain miRNAs based on massive parallel sequencing and machine learning, A pilot study. *Forensic Sci. Int. Genet.* **47**, 102300, 2020.
- [47] C.L. Wu, Y. Wang, B. Jin, H. Chen, B.S. Xie, Z.B. Mao. Senescence-associated Long Non-coding RNA (SALNR) Delays Oncogene-induced Senescence through NF90 Regulation. *J. Biol. Chem.* **290(50)**, 30175-30192, 2015.
- [48] S. Marttila, K. Chatsirisupachai, D. Palmer, J.P. de Magalhães. Ageing-associated changes in the expression of lncRNAs in human tissues reflect a transcriptional modulation in ageing pathways. *Mech. Ageing Dev.* **185**, 111177, 2020.
- [49] C. Tu, T. Du, C. Shao, Chengchen, Z. Liu, L. Li, Y. Shen. Evaluating the potential of housekeeping genes,

rRNAs, snRNAs, microRNAs and circRNAs as reference genes for the estimation of PMI. *Forensic Sci. Med. Pathol.* **4(2)**, 194-201, 2018.

[50] A. Manetti, A. Maiese, A. Baronti, E. Mezzetti, P. Frati, V. Fineschi, E. Turillazzi. MiRNAs as New Tools in Lesion Vitality Evaluation, A Systematic Review and Their Forensic Applications. *Biomed.* **9(11)**, 1731, 2021.