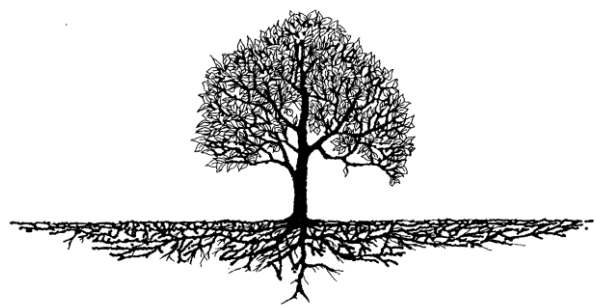


REBECA SOUTO SANTOS

Contributos da Epigenética no âmbito da Medicina Legal

Dissertação de Candidatura ao grau de
Mestre em Medicina Legal submetida ao
Instituto de Ciências Biomédicas de
Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientadora: Professora Doutora Maria José Carneiro
de Sousa Pinto da Costa; Professora
associada convidada no Instituto Ciências
Biomédicas Abel Salazar, Universidade do
Porto.



“Faça as coisas difíceis enquanto forem fáceis e faça as coisas grandes enquanto ainda forem pequenas. Uma viagem de mil milhas tem de começar com um único passo.”

Lao Tzu

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer à Coordenadora do Mestrado em Medicina Legal, Prof. Doutora Maria José Carneiro de Sousa Pinto da Costa, por ter aceite a minha candidatura nesta instituição, foi o primeiro passo desta jornada. Agradeço ainda por ser minha Orientadora, foi um privilégio ter sido orientada por uma pessoa que tanto estimo e admiro. Agradeço-lhe por toda a sua disponibilidade e colaboração, incentivo e um sincero voto de confiança nas minhas capacidades, mesmo nas horas mais difíceis e com a distância geográfica. Pela sua humanidade, atenção e amizade, o meu sentido e sincero agradecimento, Um bem-haja Professora!

Ao Prof. Doutor José Eduardo Pinto da Costa, professor e mestre. Agradeço-lhe imenso pela inspiração e pelos ensinamentos científicos e humanos, consigo cresci e aguicei ainda mais a vontade do saber e a vontade do querer fazer sempre melhor. Foi e continuará a ser um exemplo de um excelente profissional e de um grande ser humano.

A realização da parte prática deste trabalho só foi possível devido ao apoio de duas instituições, grupo de investigação Genómica de Plantas em Stress (GPlantS) do Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) em Oeiras, e Departamento de Biologia Animal, Biologia Vegetal Y Ecologia (BABVE) da Universitat Autònoma de Barcelona.

Um especial agradecimento à Prof. Doutora Margarida Oliveira e à Doutora Dra. Isabel Abreu pelo voto de confiança ao me permitirem desenvolver um trabalho de investigação científica integrando a equipa do GPlantS. Agradeço-lhes ainda pela amizade e orientação ao longo de tantos meses.

Agradeço o apoio financeiro concedido pela Fundação para a Ciência e Tecnologia, através do projecto "*The impact of environmental stresses on epigenetic regulation of rice genome*" FCT/MCTES, Ref PTDC/BIA-BCM/111645/2009.

Um enorme agradecimento pela supervisão, orientação, incentivo, amizade e amabilidade recebida pela Dra. Ana Paula Santos durante toda a estadia no grupo de investigação.

À Liliana Ferreira, Natacha Vieira e Ana Margarida Rosa minhas colegas de trabalho e amigas, pela vossa cumplicidade, paciência, carinho e ajuda durante todo o trabalho desenvolvido, o meu eterno agradecimento.

É um agradecimento especial aos restantes membros da excelente equipa do GPlantS, por me fazerem sentir acolhida, pela ajuda, companheirismo e amizade durante seis meses. Um bem-haja a todos vós! Alicja Górska, Mafalda Rodrigues, Diego Almeida, André Cordeiro, Helena Sapeta, Cecília Pina, Ana Paula Farinha, Nuno Gonçalves, Pedro Barros, Nelson Saibo, Sónia Negrão, Tânia Serra e Tiago Lourenço.

À Dra. Cristina Pereira Dos Santos por ter aceite o meu estágio profissional de Erasmus, e ainda pela supervisão e orientação durante toda a minha estadia no Departamento BABVE na Universitat Autònoma de Barcelona.

À minha colega de tantas horas de trabalho Maria Del Mar Gracia, e a todos os restantes colegas do departamento BABVE, na UAB.

Um especial agradecimento à grande amiga e colega de laboratório Cristina Afonso, pelo companheirismo vivido, sincera amizade e ainda pela revisão deste trabalho.

Outro especial agradecimento aos verdadeiros amigos que estiverem sempre presentes apesar da distância, Andreia Padrão, André Azevedo, Anabela Azevedo, Cristina Costa, Juan Reyes, Geisa Teixeira, Martinho Vasconcelos, Nádía Rodrigues e Sónia Pereira.

Ao meu avô de coração Alberto Rodrigues, sempre atento e cheio de amor.

Aos meus Pais e ao meu Irmão, porque sem eles nada faz sentido. Por todo vosso amor e apoio incondicional com que sempre me presentearam. Por todos os ensinamentos e valores, pela nossa união, por sermos Família, por tudo o que sou! O meu muito e eterno agradecimento!

“Cada Pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”

Marie Curie

RESUMO

Poderá a Epigenética ajudar a Medicina Legal e as Ciências Forenses?

O reconhecimento de uma identidade é um dos principais quesitos que a Medicina Legal em parceria com outras ciências forenses, responde auxiliando a justiça em processos de investigação criminal, seja no caso de identificação de vítimas vivas ou mortas, suspeitos ou ainda o caso de agressores.

No entanto quando não existem pertences, vestígios físicos ou testemunhas que auxiliem no reconhecimento individual, são analisados vestígios de amostras biológicas comparadas com contrapontos forenses.

É indiscutível a ajuda da genética forense, nomeadamente através da análise do ADN, que permite a obtenção de um perfil genético. Porém, tal como em todas as ciências existem algumas limitações que podem dificultar a atribuição de um perfil genético, condicionando o reconhecimento de uma identidade.

A Epigenética é a ciência que se dedica ao estudo da interação da regulação génica e o ambiente circundante, sem que envolva alterações ao nível da sequência de ADN, podendo ainda persistir nas gerações seguintes. Com o avanço científico e tecnológico vários têm sido os estudos realizados com o intuito de ultrapassar as dificuldades ao nível da atribuição de uma identificação individual, tais como a diferenciação de gémeos monozigóticos, determinação da idade biológica, auxílio em casos de filiação, entre outros.

O presente trabalho, realizado no âmbito de dissertação do Mestrado em Medicina Legal, pretende apresentar inovações na área da Epigenética e evidenciar quais os contributos que poderão ser aplicados em Medicina Legal através de uma investigação realizada sobre os últimos trabalhos e avanços desenvolvidos nesta área científica.

Por forma a esclarecer quais os mecanismos que envolvem as marcas epigenéticas e como estes podem ser alterados, foi desenvolvido um trabalho experimental com técnicas e metodologias epigenéticas com o grupo de investigação GPlantS no Instituto Tecnológico de Química e Biologia, e ainda no Departamento BABVE da Universidade Autónoma de Barcelona. Os resultados experimentais revelaram que factores ambientais como o *stress* do frio influenciam no tipo de resposta a genes específicos como *OsDREB1B* e enzimas que intervêm no processo de remodelação da cromatina, como a enzima *OsHAC704*.

Palavras-chave: Epigenética, Epigenética forense, marcas epigenéticas, genética forense, identificação, perfil genético, padrão de metilação de ADN.

ABSTRACT

Can Epigenetics help Legal Medicine and Forensic Sciences?

The recognition of an identity is one of the main questions that the Forensic Medicine in partnership with other forensic sciences aim to answer, aiding Law enforcement in criminal investigations, with such things like, identification of living or dead victims -, suspects or even in the case of offenders.

However when there are no physical traces, belongings or witnesses to help in the individual recognition, biological traces are analyzed and compared with forensic samples.

It is undeniable the help of forensic genetics, specially using of DNA analysis as a forensic tool, which allows to obtain a genetic profile. However, as in all sciences, there are some limitations that can difficult the attribution of a genetic profile.

Epigenetic is the science that studies the interaction between the gene regulation with the surrounding environment, without involving any changes to the DNA sequence and may also be passed on to future generations.

Given recent scientific and technological advances, some studies have been conducted in order to exceed some of the genetic profiling limitations. Differentiation of monozygotic twins, determination of biological age and assistance in parental cases are some of the examples of such studies.

The present work, developed as a Master's dissertation in Legal Medicine, aims to present innovations in the Epigenetic field and shed light on some contributions that can be applied in Legal Medicine.

In order to clarify the mechanisms involved in epigenetic marks, and how these can be changed, experimental work was developed with epigenetic techniques and methodologies in the GPlantS research group at the Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) and BABVE Department of the Universitat Autònoma de Barcelona. The results revealed that environmental factors promote a significantly influence in epigenetic regulation on specific genes and enzymes like OsDREB1B and OsHAC704 under stress conditions like cold.

Key words: Forensic Epigenetics, epigenetic marks, forensic genetics, identification, genetic profile, DNA methylation pattern.

LISTA DE ABREVIATURAS

µL: Unidades de medição de líquidos, microlitro;

ABO: Sistema sanguíneo ABO (AA, BB, AB, O);

ADN: Ácido Desoxirribonucleico;

ADNmt: Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial;

ADNn: Ácido Desoxirribonucleico nuclear;

bp: pares de bases;

cDNA: ADN complementar;

ChiP: Técnica de Imunoprecipitação da Cromatina;

CODIS: Sistema Combinado de Índices de ADN, *Combined ADN Index System*;

CpG: Dinucleótidos de CpG;

HAT: Histonas Acetil-transferase;

HDAC: Histonas Deacetilases;

HDM: Histonas Demetilases;

HMT: Histonas Metil-transferase;

mM: Unidades de concentração, milimolar;

MN: Sistema sanguíneo MN (MM, NN, MN);

ng: Unidades de medição de peso, nanograma;

°C: Unidades de medição de temperatura, graus Celcius;

PCR: Reação em cadeia de polimerase, *Polimerase Chain Reaction*;

Rh: Sistema sanguíneo Rh (Rh+, Rh-);

RNA: Ácido ribonucleico (ARN);

SNP: Polimorfismo de um único nucleótido, *Single Nucleotide Polymorphism*;

STR: Sequencias simples repetidas ou microssatélites, *Short Tandem Repeats*, ou *Simple Sequence Repeats (SSRs)*;

VNTR: Minisatélites, *Variable Number of Tandem Repeats*.

LISTA DE ABREVIATURAS DE NOMES ESPECÍFICOS

Dj: Planta de arroz (*Oryza sativa*) da variedade *Don jing*;

Mut: Planta de arroz (*Oryza sativa*) da variedade *Don jing* mutante;

OsDREB1B: Gene específico de resposta ao frio para o arroz;

OsHAC704: Gene que codifica para uma acetil-transferase específica.

LISTA DE FIGURAS

Figura I.1: Evolução da utilização dos marcadores moleculares em Genética Forense, modificado de Carracedo, 2013.	7
Figura I.2: Principais mecanismos epigenéticos, modificado de Vidaki <i>et al.</i> , 2013.....	15
Figura I.3: Mecanismo de metilação de ADN, adaptado de Vidaki <i>et al.</i> , 2013.	18
Figura I.4: Representação esquemática da regulação da expressão génica em genes que contenham ilhas CpG.	18
Figura I.5: Principais modificações Epigenéticas: modificação das histonas e metilação do ADN.	19
Figura III.1: Representação esquemática do processo de inibição das histonas HDAC pela droga trichostatin A, modificado de Riken, 2008.	31
Figura III.2: Representação esquemática dos ensaios experimentais. Período de germinação (0 -5 dias), camara escura, a 28°C. Período de crescimento em meio yoshida (6 – 14 dias) camara com fotoperíodo e condições controladas. Tratamento de <i>stress</i> do fio 4°C (15º dia), colheita e armazenamento das plantas.	32
Figura IV.1: Níveis de expressão da enzima <i>OsHAC704</i> , em diferentes condições de <i>stress</i>	41
Figura IV.2: Níveis de expressão do gene específico de resposta ao frio, <i>OsDREB1B</i> em grupos de plantas com enzima <i>OsHAC704</i> (Dj) e grupos de plantas sem enzima <i>OsHAC704</i> (Mut).	43
Figura IV.3: Níveis de expressão do gene específico de resposta ao frio, <i>OsDREB1B</i> em plantas sem enzima <i>OsHAC704</i> (Mut) com a adição da droga TSA.	44
Figura V.1: Percentagem de metilação de ADN em três regiões promotoras dos genes dos DARADD, NPTX2 e TOM1L1, a partir de amostras de saliva de gémeos monozigóticos versus a idade.....	58

Figura V.2: Regiões de CpG com as mudanças mais significativas associadas à idade. Tabela apresentada no trabalho de Koch & Wagner, 2011.....	60
Figura V.3: Quantificação do conteúdo total das marcas epigenéticas entre os irmãos de cada par de gêmeos monozigóticos com idades compreendidas entre os 3 e 50 anos.	62
Figura V.4: Comparação dos valores epigenéticos entre os irmãos de cada par de gêmeos monozigóticos com idades compreendidas entre os 3 e 50 anos.	62
Figura V.5: Nível médio do padrão de metilação do ADN nas regiões promotoras dos genes EDRD4, SERT e MAOA em idades compreendidas entre os 5 e os 10 anos.	63
Tabela III.1: Disposição das plantas por grupos de acordo com o tipo de tratamento de stress.....	30

DEFINIÇÃO DE TERMOS USADOS NA DISSERTAÇÃO

- ✓ **Acetilação:** descreve uma reação que introduz um grupo funcional acetil em um composto orgânico.
- ✓ **Cromatina:** complexo constituído pelo ADN e proteínas que se encontra dentro do núcleo nas células eucarióticas.
- ✓ **Deacetilação:** descreve uma reação em que um grupo funcional acetil é removido de um composto orgânico.
- ✓ **Desmetilação:** descreve uma reação em que um grupo funcional metil é removido de um composto orgânico.
- ✓ **Dinucleótidos de CpG:** conjunto de nucleótidos de citosina-guanina dispersos pelo genoma.

- ✓ **Epigenoma:** conjunto de sinalizadores e marcadores que modelam a regulação e expressão de todo o genoma.
- ✓ **Fenótipo:** resultado da expressão génica do organismo, possível de ser visualizado em características físicas.
- ✓ **Forense:** do latim, significa "antes do fórum", aplicação de um largo espectro de ciências que auxiliam o sistema judicial.
- ✓ **Gêmeos monozigóticos:** gêmeos formados a partir do mesmo zigoto.
- ✓ **Genoma:** toda a informação hereditária de um organismo.
- ✓ **Heterocromatina:** corresponde à cromatina no estado condensado.
- ✓ **Loci:** do latim significa lugar, plural *locus*, é o local fixo num cromossoma onde está localizado determinado gene ou marcador genético.
- ✓ **Metilação:** descreve uma reação que introduz um grupo funcional metil em um composto orgânico.
- ✓ **Mosaicismo:** existência de um indivíduo com dois materiais genéticos distintos, porém provenientes do mesmo zigoto.
- ✓ **Polimorfismo:** do grego, poli "muitas", morfos "formas", ocorrência de variação de natureza genética em uma população para um ou mais locus cujo alelo mais raro apresenta frequência de pelo menos 1% na população.
- ✓ **Quimerismo:** existência de dois perfis genéticos num mesmo indivíduo que teve origem a partir de diferentes zigotos.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	VII
Lista de Abreviaturas de nomes específicos.....	VIII
Lista de Figuras.....	VIII
Definição de Termos usados na Dissertação	IX
Índice	XI
I. Introdução	1
I.1.1. Evolução da Genética Forense: metodologias e marcadores de análise de ADN ..	4
I.1.2. Aplicações da genética forense	8
I.1.3. Limitações da análise de ADN nuclear e ADN mitocondrial.....	11
I.2. Epigenética, contributos à genética forense.....	13
I.2.1. Principais Marcas Epigenéticas.....	15
I.2.2. O <i>Imprinting</i> genómico.....	16
I.2.3. Metilação do ADN.....	17
I.2.4. Modificação das Histonas	19
I.3. O Arroz (<i>Oryza sativa</i>) como organismo modelo para o estudo de marcas epigenéticas como a modulação de histonas.....	20
II. Objetivos	23
III. Material e Métodos	25
III.1. COMO AS MARCAS EPIGENÉTICAS SÃO INFLUENCIÁVEIS PELO AMBIENTE: Arroz (<i>Oryza sativa</i>), organismo modelo para o estudo de marcas epigenéticas	25
III.1.1. Alteração das marcas epigenéticos face à exposição de condições de <i>stress</i> , Frio (4°C).....	27
III.1.1.1. Material biológico: variedades do Arroz	27
III.1.1.2. Obtenção e confirmação da planta de arroz mutante	27
III.1.1.3. Ferramentas bioinformáticas para o desenho dos conjuntos de Primers:	28
III.1.2. Análise de gene específico de resposta ao stress do frio, <i>OsDREB1B</i> e histona específica <i>OSHAC704</i>	29
III.1.2.1. Condições de Crescimento.....	29
III.1.2.2. Tratamento de stress, Frio 4°C, período 30 min e 4 horas	30
III.1.2.3. Tratamento de stress, droga TSA, período de 3 dias	31
III.1.3. Estudo de expressão génica do gene <i>OsDREB1B</i> , pela técnica de PCR em Tempo Real	33
III.1.3.1. Extração, purificação, quantificação de RNA e síntese de cDNA	33
III.1.3.2. Conjunto de Primers para a quantificação por PCR em Tempo Real	33

III.1.3.3. PCR em Tempo Real	34
III.1.3.4. Análise de resultados	34
III.1.4. Técnicas de análise de marcas epigenéticas:	35
III.1.4.1. Análise global dos níveis de metilação, técnica de sequenciação com bissulfito	35
III.1.4.2. Análise do mecanismo de interação do ADN com as histonas, técnica de imunoprecipitação da cromatina (ChiP).....	36
III.2. Progressos na Epigenética com aplicação nas ciências forenses	37
IV. Resultados.....	39
IV.1. Resultados Experimentais	39
IV.1.1. Como as marcas epigenéticas são influenciáveis pelo ambiente.....	39
IV.1.1.1. Níveis de expressão da enzima <i>OsHAC704</i> , quando sujeito a fatores externos ambientais de <i>stress</i> , Frio, 4°C	40
IV.1.1.2. Níveis de expressão do gene específico de resposta ao frio, <i>OsDREB1B</i>	42
V. Análise e discussão de resultados	46
V.1. Análise e discussão dos resultados experimentais	46
V.2. Análise e discussão de trabalhos desenvolvidos em Epigenética Forense.....	48
V.2.1. Contributos da Epigenética em âmbito médico-legal	48
V.2.1.1. Epigenética na Psicologia e Psiquiatria forense.....	48
V.2.1.2. Epigenética na autenticação de amostras de ADN humano	51
V.2.1.3. Epigenética na determinação da origem parental de alelos	52
V.2.1.4. Epigenética no reconhecimento de fluidos corporais.....	53
V.2.1.5. Prevendo a idade por meio da Epigenética.....	56
V.2.1.6. Epigenética na identificação de gémeos monozigóticos	61
VI. Considerações Finais.....	66
VII. Referências.....	69

CAPITULO I

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

No decorrer de uma investigação criminal, os órgãos policiais e a medicina legal atuam em parceria, tratando-se de uma equipa multidisciplinar constituída por peritos e investigadores das mais diversas áreas complementares. Deste modo, qualquer ciência que auxilie a justiça na elucidação de um caso judicial adota a denominação de ciência forense.

De acordo com o princípio de Locard, “qualquer indivíduo que esteja presente num local de crime deixa algum tipo de vestígio, e transporta sempre algo do local de crime consigo”. Deste modo, pela análise do local de crime pode-se perceber o que foi deixado para trás e o que foi alterado. Através da recolha e posterior processamento de todos os vestígios encontrados, quer em cenários de crime, quer em vítimas e ou suspeitos, é possível determinar a causa e cronologia dos eventos, e ainda reconhecer identidades. Estabelecer uma identidade não é um processo recente, em finais do século XIX, Alphonse Bertillon propôs o primeiro método para atribuir uma identificação, a antropometria judicial, um sistema de identificação adotado rapidamente na Europa e nos Estados Unidos. Este método baseava-se na análise de um conjunto de caracteres de medidas do corpo humano. Na mesma época Francis Galton, criou o primeiro sistema de identificação por impressões digitais, com base em estudos de autores anteriores. No ano de 1904, Juan Vucetich reconheceu a superioridade do estudo das impressões digitais relativamente ao sistema de Bertillon, proclamando no início do século XX, pela Academia de Ciências em Londres, a Dactiloscopia como um sistema internacional para a identificação humana (Mozayani & Noziglia, 2006; Pinheiro, 2008; Gardner, 2009; James *et al.*, 2013).

A dactiloscopia, baseia-se na análise de características individualizantes presentes nas impressões digitais e em três princípios fundamentais que sustentam a sua utilização: Imutabilidade, as cristas papilares não se modificam fisiologicamente, mesmo existindo cortes profundos a regeneração tecidual confere a mesma impressão digital, sendo que a parte afetada pelo traumatismo apenas divide o desenho original; Perenidade, as cristas papilares formam-se no sexto mês da vida intra-uterina, permanecem invariáveis em número, forma e direção até que a putrefação cadavérica destrua a pele; e Variabilidade, as cristas papilares, diferem de dedo para dedo, e de indivíduo para indivíduo, inclusive são distintas entre gémeos monozigóticos.

A utilização de impressões digitais como forma de identificação existe desde a Antiguidade em diversos lugares, como Mesopotâmia, Turquestão, Índia, Japão e China, com o objetivo de autenticar documentos e selar acordos civis e comerciais. Atualmente, os métodos de identificação pelas impressões digitais, incluem o reconhecimento das extremidades digitais dos dedos, palma das mãos (Quiroscopia), e plantas dos pés (Pelmatoscopia). Em alguns casos de investigação criminal, foi possível estabelecer uma identificação pela comparação de um vestígio impresso de uma orelha com um suspeito. Não existem dúvidas, sobre o contributo deste método de identificação, para a investigação criminal, no entanto, à semelhança da maioria dos métodos científicos, existem algumas limitações à técnica (Mozayani & Noziglia, 2006; Pinheiro 2008).

Quando não existem impressões biológicas, ou quando as mesmas não permitem qualquer identificação seja pela sobreposição de vestígios, borrões, ou presença de caracteres insuficientes, o processo de atribuição de identidade poderia ficar comprometido. Todavia existem outros métodos que permitem atribuir uma identificação positiva, tais como, a comparação de arcadas dentárias e outros vestígios em odontologia forense, fotografia forense, ou o perfil genético, pela análise da molécula de ADN (Ácido Desoxirribonucleico). Com o avançar dos conhecimentos biológicos e tecnológicos, a Genética veio acrescentar novos métodos igualmente fiáveis e reprodutíveis que auxiliam o processo de identificação humana.

O ADN é uma molécula presente em todas as células do organismo e que contém toda a informação genética de um organismo, constituindo o genoma. No caso dos humanos, a maioria dessa informação encontra-se localizada no núcleo organizada sobre a forma estrutural e condensada denominada de cromossomas, e ainda uma pequena porção organizada sobre uma forma estrutural circular nas mitocôndrias, pequenos organelos citoplasmáticos que intervêm no processo da respiração celular. Desta forma, a informação genética de qualquer indivíduo organiza-se sobre a forma de ADN nuclear (ADNn) e ADN mitocondrial (ADNmt). As características individualizantes de cada indivíduo são o resultado da informação genética que é herdada dos seus progenitores e o modo como esta informação é expressa.

Importante ainda referir que o ADN se distingue em três tipos diferentes consoante a função que desempenha: ADN codificante, constituído pelo ADNn e ADNmt que contêm a informação genética necessária para a produção de proteínas (ADN que confere características fenotípicas como doenças ou características físicas); ADN auxiliar, contêm a informação genética que codifica proteínas que interferem ao nível dos mecanismos de

regulação celular; e ADN repetitivo ou ADN não codificante, corresponde ao ADN que não se traduz em proteínas, mas que sob o ponto de vista de identificação é muito importante. Por ser repetitivo e muito variável entre indivíduos, e por representar a maioria do genoma humano reúne informação de extrema relevância que necessária para a obtenção de um perfil genético, permitindo a identificação humana (Pinheiro, 2008).

A identificação humana, através da análise do perfil genético, só possível devido às características específicas e particulares que constituem a molécula de ADN: Exclusividade, o perfil genético é único para cada indivíduo dentro de uma população; Igualdade, a molécula de ADN, é igual em todas as células do organismo; Invariabilidade, o genoma não varia com o avançar da idade.

Deste modo, utilizando técnicas de análise específicas combinadas com marcadores moleculares específicos, obtêm-se um perfil genético que posteriormente comparado com um contraponto forense permite reconhecer uma identidade (Thompson & Black, 2006; Pinheiro, 2008; Gunn, 2009; Carracedo, 2013).

I.1.1. Evolução da Genética Forense: metodologias e marcadores de análise de ADN

A história da genética forense caracteriza-se pela evolução contínua dos marcadores genéticos e metodologias, com o intuito de aumentar a eficácia do poder discriminatório ao nível da identificação, entre outras aplicações com interesse judicial.

Os primeiros recursos genéticos utilizados para auxiliar na identificação humana, consistiam na análise de marcadores imunológicos, nomeadamente os sistemas sanguíneos ABO, Rh e MN e marcadores proteicos. Contudo, ambos os marcadores possuíam uma variabilidade reduzida, dificultando ou mesmo impossibilitando a identificação humana (Carracedo, 2013).

Em 1985, Alec Jeffrey e seus colaboradores, conseguiram contornar essa limitação com a descoberta da existência de uma diversidade de polimorfismos genéticos presentes no genoma humano, conferindo a existência de uma impressão genética única para cada indivíduo denominada de *DNA fingerprinting* (Jeffreys *et al.*, 1985; Carracedo, 2013). Esta técnica, altamente informativa para a identificação humana, tira partido da elevada variabilidade de regiões genómicas designadas por minisatélites ou VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats). Os VNTRs caracterizam-se pela existência de regiões variáveis na sequência genómica que apresentam um tamanho compreendido entre 10 a 100 bp (pares de bases), estas regiões possuem ainda como característica o facto de as mesmas se poderem repetir sequencialmente várias vezes (repetição em *tandem*) ao longo do genoma, sendo que o número correspondente a essas repetições é altamente variável entre os indivíduos de uma mesma população. Deste modo, após um corte enzimático altamente específico no genoma, seguido de uma corrida electroforética, a técnica do *DNA fingerprinting* permite, uma avaliação qualitativa de identificação humana, por comparação visual dos padrões de bandas pertencentes dos suspeitos com a prova biológica recolhida de eventos criminais. Como desvantagem, esta técnica era demasiado morosa e exigia uma quantidade considerável de ADN bem conservado e sem qualquer tipo de contaminações. Estes fatores limitavam a aplicação da técnica, uma vez que a maioria das recolhas de vestígios biológicos, se encontram expostas a inúmeros agentes contaminantes e o material genético passível de análise encontra-se muitas vezes em quantidades vestigiais (Afonso, 2008).

Em 1985, Karry Mullis e seus colaboradores, apresentaram a técnica denominada de PCR (Polymerase Chain Reaction). A PCR revolucionou todos os campos da genética, inclusive a genética forense.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica quantitativa simples, realizada *in vitro*, que permite uma rápida amplificação de ADN, resultando na obtenção de milhões de cópias de um determinado fragmento de ADN, a partir de uma quantidade inicial de amostra muito reduzida. Deste modo, é possível uma análise posterior e ainda análise de ADN a partir de vestígios como, folículos capilares ou células epiteliais bucais em filtros de cigarro (Duarte *et al.*, 2001). A PCR é uma técnica altamente específica e com uma vasta aplicabilidade, no entanto limitada em situações de presença de contaminações, que pode conduzir a uma interpretação falsa de resultados, sendo sempre aconselhável a incorporação de um controle negativo em todas as utilizações (Duarte *et al.*, 2001; Borovik *et al.*, 2006).

Esta metodologia, conduziu à aplicação de um novo tipo de marcadores genéticos altamente polimórficos, denominados de microsatélites ou STRs (Short Tandem Repeats). A sequência genómica varia entre 2 a 6 bp, e com uma repetição em *tandem* máxima de 50 vezes (Brinkmann *et al.*, 1998). Entre 1990 e 1996, surgiram os primeiros *kits* comerciais multiplex para STRs, que incorporam métodos de marcação como a fluorescência, permitindo o estudo de vários marcadores em simultâneo, correspondendo a uma amplificação até 15 *loci*. Estes *kits* multiplex, permitiram reduzir substancialmente a quantidade de amostra necessária para a análise, assim como, minimizar o custo e o tempo de análise para a obtenção de resultados, e ainda diminuir a possibilidade de erro em caso de troca de amostras.

A identificação genética individual é realizada, maioritariamente recorrendo a STRs, visto serem estes os marcadores mais informativos. No entanto, nos últimos anos, tem sido crescente o interesse forense por outro tipo de polimorfismo de ADN, os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). Os SNPs são marcadores moleculares que possuem alterações que ocorrem num única base azotada de um nucleótido originando diferentes formas alélicas. Essas modificações podem ser inserções ou deleções e para que sejam consideradas de polimorfismo a taxa de ocorrência tem que ser igual ou superior a 1% dentro de uma população. Se essa taxa for inferior a 1% a alteração denomina-se de mutação, verificando-se esse acontecimento mais comumente associado a populações selecionadas como o caso de famílias. Os SNPs mais comuns são bi-alélicos, originando

três genótipos diferentes (Brookes, 1999), o que para conseguir uma identificação precisa exige que a tipagem realizada inclua um maior número de marcadores (Koch & Michelsen, 2008), para obter o mesmo poder discriminatório dos 15 loci obtidos com o uso de STRs (Amorim & Pereira, 2005). Os SNPs são os polimorfismos conhecidos com maior abundância no genoma humano, verificando-se uma alteração polimórfica a cada 200 ou 300 bp (Sobrinho *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2010). Apresentam ainda como grande vantagem o facto de poderem ser estudados em produtos de amplificação muito curtos, cerca de 50 pb ou menos, constituindo vantagens sobre os microssatélites e em casos de amostras com ADN degradado (Pena, 2005).

Devido à sua abundância no genoma, cerca de 5,3 milhões SNPs identificados (Xiao *et al.*, 2006), são várias as aplicações clínicas, nomeadamente como marcadores de genes associados a determinadas doenças, e por isso com um forte potencial no âmbito da farmacogenética (Sobrinho *et al.*, 2005; Pinheiro *et al.*, 2010). Apesar das múltiplas vantagens dos SNPs sobre os STRs, estes últimos ainda não foram substituídos.

Os bancos de dados criminais, criados nos anos 90, com a aplicação do sistema centralizado de dados, denominado de CODIS (Combined ADN Index System), foram construídos com recurso de STRs. Deste modo, existe um maior número de marcadores STRs, que permitem mais facilmente uma identificação positiva. Novos métodos de genotipagem estão a ser desenvolvidos para os SNP, como as tecnologias de minisequenciação, microarrays ou uso da espectrometria de massa (Andrew *et al.*, 2012; Kenneth *et al.*, 2012), e prevê-se que num futuro próximo exista uma combinação entre marcadores de STRs e SNPs nas análises de ADN na obtenção do perfil genético.

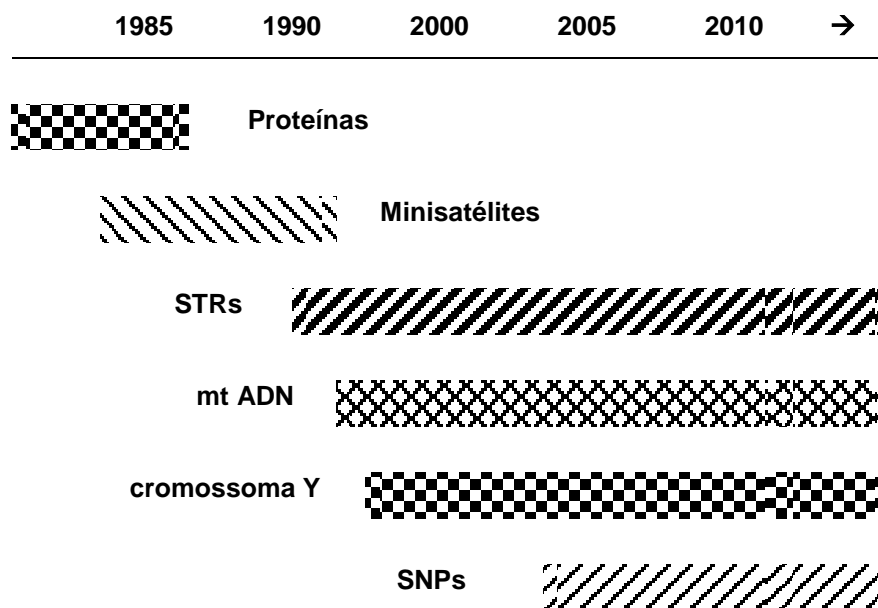


Figura I.1: Evolução da utilização dos marcadores moleculares em Genética Forense, modificado de Carracedo, 2013.

I.1.2. Aplicações da genética forense

Em prol do sistema judicial, as ferramentas moleculares empregues pela Genética revolucionaram a investigação criminal relativamente à análise de vestígios biológicos. Identificação biológica de parentesco; criminalística biológica; e identificação genética individual, são as áreas de investigação levadas a cabo pelos peritos e investigadores de genética forense abrangendo desde casos criminais a cíveis.

Em Portugal o número de investigações relativamente ao reconhecimento de parentesco biológico tem vindo a aumentar consideravelmente, circunstância resultante da entrada em vigor do artigo 1864º do código civil em 1977, que impõem a investigação de identidade do pai quando apenas é conhecida a identidade materna. Estas perícias que determinam a exclusão e a não exclusão de paternidade, podem ser requeridas no decorrer de uma investigação criminal no entanto a sua maioria provêm do âmbito cível (Pinheiro, 2010).

No decorrer de uma investigação de criminalística biológica são solicitadas perícias que pretendem a obtenção de perfis genéticos provenientes de amostras biológicas encontradas em cenários de crime, ou recolhidas de vítimas e/ou suspeitos. Manchas de sangue, tecidos biológicos, transferência de fluídos orgânicos e/ou secreções são apenas alguns dos vestígios biológicos possíveis de encontrar, preservar e analisar (Pinheiro, 2010).

Relativamente à identificação genética individual, é aplicada a partir da análise de restos cadavéricos (vestígios ósseos e/ou dentes), provenientes de catástrofes naturais, desastres em massa ou atentados contra a humanidade, identificação de militares, investigações históricas sobre a população humana, entre outros (Goedecke *et al.*, 2004; Dolinsky & Pereira, 2007; Rocha, 2009, Carracedo *et al.*, 2010). A identificação por meio de análise de ADN, das vítimas do atentado terrorista que ocorreu a 11 de Setembro de 2001, no *World Trade Center* em Nova Iorque, contribuiu para uma progressão na rapidez de obtenção de resultados, nomeadamente na criação novas metodologias de análise de ADN (Biesecker *et al.*, 2005). Testes de análise de ADN que no passado se realizavam num período entre 6 a 8 semanas, podem ser feitos atualmente em poucas horas. A sensibilidade de análise foi igualmente outro dos parâmetros onde se verificou um enorme progresso. Em alguns casos a existência de uma pequena quantidade de amostra, correspondente a um reduzido número de células, permite a atribuição de um perfil de ADN, não sendo necessário uma amostra biológica de tamanho considerável com ADN bem preservado – técnica do *Low Copy Number*, tal como era exigido num passado não muito distante (Butler, 2009).

A realização destes exames periciais consiste na análise de ADN nuclear de autossomas, nomeadamente STR (Short Tandem Repeats) considerados os marcadores genéticos forenses por excelência, em grande parte devido à sua abundância e elevada variabilidade. Sempre que necessário a perícia recorre ao auxílio de outros marcadores genéticos tais como a análise do cromossoma X (X-STR) análise do cromossoma Y (Y-STR) e a análise do ADN mitocondrial (mtDNA-STR).

A utilidade do cromossoma X, restringe-se a casos onde existe uma mistura de ADN masculino e ADN feminino, verificando-se muitas vezes em casos de abuso sexual.

A análise do cromossoma Y, pelo marcador Y-STR apresenta algumas particularidades, aplicável em diversos casos, nomeadamente na resolução de crimes sexuais, uma vez que permite distinguir perfis genéticos provenientes de sexos diferentes, ou seja permite a deteção exclusiva de ADN masculino, mesmo quando está presente um enorme background feminino, atribuindo uma correta identificação. Quando existem múltiplos agressores, e se estes forem parentes próximos com a mesma linhagem paterna, exemplo dois irmãos, ou um pai e um filho, é necessário recorrer à combinação com STRs autossómicos, de modo a poder diferenciar os perfis. Y-STR, permite também reconhecer a proveniência geográfica. Os níveis elevados de heterozigotia e de polimorfismos, permitem identificar alelos caraterísticos e com frequências alélicas específicas características de certas populações, deste modo os marcadores do cromossoma Y funcionam como marcadores de ancestralidade (Pinheiro, 2010).

Quando as amostras biológicas possuem ADN degradado ou em casos onde o material biológico possui o ADN nuclear em pequenas quantidades, nomeadamente em restos cadavéricos, recorre-se na sua maioria à análise do ADN mitocondrial, visto este possuir um maior número de cópias comparando com o ADN nuclear. No entanto, o genoma mitocondrial é muito pequeno, e funciona como um único *locus*, resultando num poder discriminatório menor. Porém, em um mesmo indivíduo podem existir diferentes populações de ADNmt, fenómeno denominado heteroplasmia. Este tipo de ADN, provém da herança materna e tal como o cromossoma Y, funciona como um marcador de ancestralidade e permite reconhecer indivíduos pela comparação de perfis genéticos provenientes de uma linha materna comum. Deste modo, as particularidades do ADNmt contribuem para o auxílio da determinação de identidades para casos de criminalística biológica, individual e ainda ancestralidade. Todavia, as técnicas aplicadas podem ser mais laboriosas e nem sempre proporcionar resultados (Salas, 2001; Pinheiro, 2008; Pinheiro, 2010).

A informação fornecida pela análise de um perfil genético, através do estudo de marcadores moleculares como STRs, é aceita em processos judiciais e continuará a ser fundamental para a conclusão de perícias de Genética Forense (Pinheiro, 2010). Contudo, a existência da presença de um perfil genético de um suspeito num cenário de crime, ou numa vítima, não confere por si só, prova de culpabilidade ou inocência do mesmo, no entanto, auxilia a estabelecer uma conexão entre o suspeito e o evento alvo da investigação criminal.

De modo a armazenar a informação obtida a partir dos perfis genéticos, foram criados bancos de dados de ADN. Essa informação organizada permite a ajudar a resolver casos como reincidência de crimes ou pessoas desaparecidas, a partir da comparação dos perfis (Ge *et al.*, 2012).

Por forma a assegurar que um perfil genético, não revele informações referentes à afinidade populacional, características fenotípicas ou a existência de possíveis patologias genéticas de um indivíduo, são apenas permitidos, o uso de *kits* comerciais de STRs de ADN não codificante devidamente validados de acordo com a legislação vigente de cada país (Pinheiro, 2010). Este tipo de seletividade de acesso à informação genética individual é imposto pela maioria dos países (Pinheiro, 2010).

Porém em 2003, a Holanda, procedeu a uma modificação legislativa, que visa em condições específicas a utilização de marcadores genéticos de ADN codificante permitindo a determinação da ancestralidade genética, assim como a análise de outras características externas visíveis, com o intuito de fornecer informação privilegiada acerca de amostras biológicas com interesse processual penal. Esta abordagem apresenta uma aceitação geral por parte da comunidade científica de peritos e investigadores que trabalham em genética forense, uma vez que em casos particulares, os interesses das vítimas assim como dos que lhes são mais próximos, devem se sobrepor aos propalados direitos, liberdades e garantias de criminosos (Pinheiro, 2010).

I.1.3. Limitações da análise de ADN nuclear e ADN mitocondrial

A análise do ADN, devido às suas características específicas e individualizantes como a exclusividade, igualdade e invariabilidade, tornou-se numa poderosa ferramenta na investigação criminal, auxiliando em casos cíveis e criminais, nomeadamente na atribuição da identidade humana, tal como acima citado.

No entanto, apesar dos estudos iniciados por Jeffreys amplamente utilizados em âmbito forense, a ciência demonstrou que existem exceções a esta lei da biologia. Não existe um método científico perfeito, e o estudo do ADN nuclear apresenta algumas limitações que dificultam ou até mesmo impossibilitam a atribuição de uma identidade quando não se verifica a presença de impressões digitais, tais como:

1. Ausência de ADN em quantidade suficiente e de qualidade para determinação de perfis genéticos;
2. Presença de quimerismo, micro-quimerismo ou mosaicismo, existência de dois perfis genéticos num indivíduo. Estes fenômenos na natureza são raros no entanto, devido a transplantes de órgãos e medula são cada vez mais comuns;
3. Determinação de paternidade biológica ou identificação biológica, em casos de indivíduos irmãos ou familiares próximos do mesmo género;
4. Impossibilidade de identificação individual em gémeos monozigóticos (Zhao *et al.*, 2005; Vidaki *et al.*, 2013).

Nestes últimos dois casos apresentados, recorrendo a marcadores genéticos convencionais de ADN, como STRs e SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) não é possível obter uma diferenciação genética, principalmente no caso de gémeos monozigóticos uma vez que ambos partilham o mesmo perfil genético.

Face a estas limitações encontradas na análise do genoma humano, diversos grupos de investigação científica têm-se debruçado sobre o estudo da existência de alterações epigenéticas ao nível do ADN e de histonas. Estas modificações denominadas de marcas epigenéticas constituem um papel primordial ao nível da expressão de características fenotípicas, assim como de inúmeras patologias humanas. Atualmente, sabe-se que o padrão de metilação do ADN, é um dos processos que melhor caracteriza a alteração do fenótipo de um indivíduo, sem que se verifiquem alterações ao nível da sequência de ADN,

permitindo um avanço valioso para uma possível distinção biológica em indivíduos gémeos monozigóticos (Zhao *et al.*, 2005; Rothstein *et al.*, 2009; Le Bouc *et al.*, 2010; Bell & Spector, 2011; Li *et al.*, 2011; Vidaki *et al.*, 2013).

Deste modo, a aplicação de técnicas que incorporem a análise de marcadores epigenéticos complementares aos marcadores genéticos em uso, terá um importante e valioso impacto em estudos de genética forense, nomeadamente no que refere à distinção biológica de indivíduos (Zhao *et al.*, 2005; Rothstein *et al.*, 2009; Le Bouc *et al.*, 2010; Bell & Spector, 2011; Li *et al.*, 2011; Vidaki *et al.*, 2013).

I.2. Epigenética, contributos à genética forense

A ideia de que o ambiente pode alterar a nossa herança genética não é nova e é conhecida como Epigenética, uma das áreas mais promissoras e intrigantes da genética.

“Epigenética é um campo da biologia que estuda as interações causais entre genes e os seus produtos que são responsáveis pela produção do fenótipo”, termo introduzido em 1940 pelo biólogo Conrad Waddington.

Nos últimos anos, com o rápido desenvolvimento na genética o conceito adquiriu um novo significado. Atualmente, Epigenética é definida e geralmente aceite como o “estudo das alterações herdadas (por via meiótica ou mitótica) da regulação e expressão génica sem que envolva mudanças na sequência de ADN” (Allis *et al.*, 2007; Jablonka & Raz, 2009).

Vários são os autores que associam as marcas epigenéticas à estabilidade genómica, reduzindo eventos de recombinação entre elementos repetitivos e prevenindo fenómenos de mutagenese (Dodge *et al.*, 2005; Zaratiegui *et al.*, 2007; Daskalos *et al.*, 2009).

São os mecanismos epigenéticos que controlam o modo como os genes são expressos, ou seja, se um determinado gene é “ligado” ou “desligado” e quantas vezes é expresso. As modificações epigenéticas funcionam como padrão de regulação que varia consoante o tipo de tecido celular e o estágio de desenvolvimento em que o organismo se encontra, podendo essas afetar vários aspetos da vida de um organismo e ainda aumentar a suscetibilidade a doenças. Devido à exposição de fatores ambientais, como por exemplo a alimentação, poluição, contacto com substâncias tóxicas, exposição a agentes patogénicos, entre outros, novos padrões de marcas epigenéticas podem surgir. Por exemplo, eventos traumáticos e/ou vivências de *stress* severo no início da vida podem alterar o epigenoma de um modo persistente e algumas vezes até hereditário (Franklin *et al.*, 2010 (a); Franklin *et al.*, 2010 (b); Weiss *et al.*, 2011). Muitos tipos de tumores estão associados a alterações epigenéticas induzidas por fatores externos, alterações essas, que são transmitidas a cada nova divisão celular e podem ainda a ser transmitidas a descendentes (Watanabe & Maekawa, 2010; Pogribny, 2010).

A epigenética ajuda a esclarecer sobre as diferenças individuais resultantes de diferentes experiências de vida. Um dos exemplos para essa compreensão debruça-se sobre o estudo em gêmeos monozigóticos que apesar de terem o mesmo genótipo possuem diferentes respostas fisiológicas, comportamentais e ainda suscetibilidades diferentes a doenças (Fraga *et al.*, 2005; Wong *et al.*, 2010).

Estes estudos revelam que o genoma, o epigenoma (marcas epigenéticas) e o ambiente envolvente condicionam de forma conjunta os processos de vida, sobrevivência e reprodução de qualquer organismo vivo (Portela & Esteller, 2010). O potencial que a Epigenética apresenta é imenso, podendo ser aplicado em diversas áreas do saber, desde as ciências da saúde às ciências forenses.

Deste modo, o estudo das alterações epigenéticas restritas ao indivíduo pode constituir uma ferramenta complementar em casos em que a genética forense não consegue atribuir uma identidade, entre outras aplicações nomeadamente ao nível do reconhecimento de características físicas.

Características importantes que promovem o estudo das Marcas Epigenéticas

- ✓ Específicas de determinados genes;
- ✓ Influenciadas pelo ambiente;
- ✓ São complexos dinâmicos e reversíveis;
- ✓ Podem permanecer estáveis ao longo de gerações;

I.2.1. Principais Marcas Epigenéticas

Neste trabalho serão abordados os mecanismos epigenéticos que apresentam maior relevância num contexto forense: *imprinting* genómico; metilação do ADN e a modificação das histonas (Goldberg *et al.*, 2007).

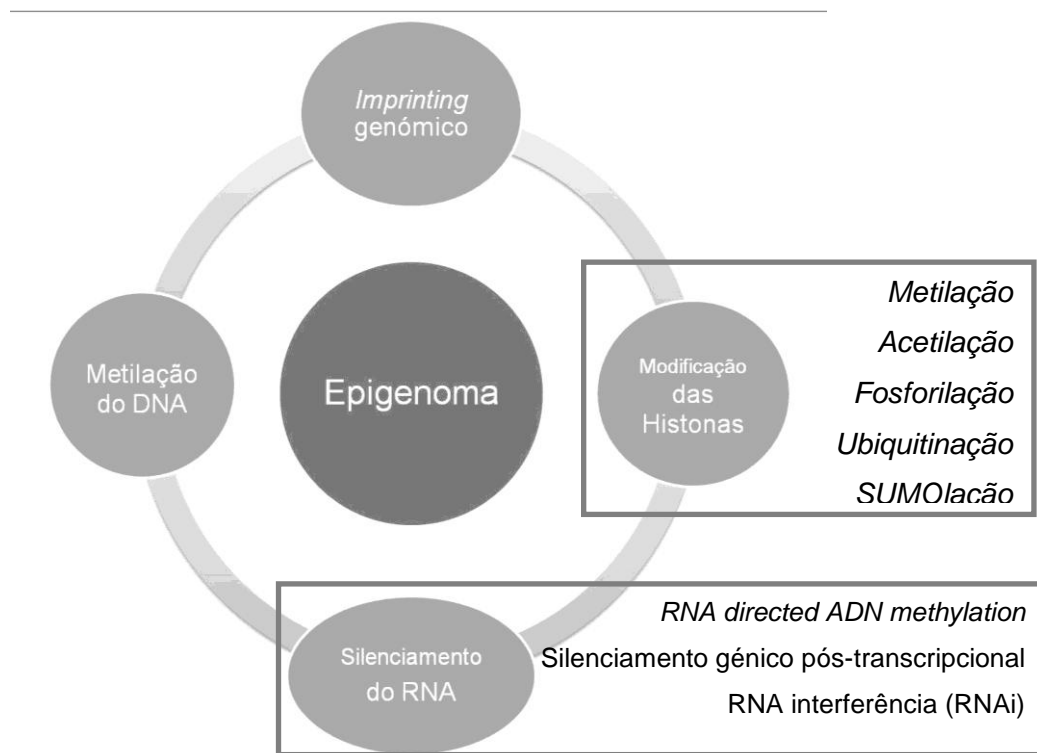


Figura I.2: Principais mecanismos epigenéticos, modificado de Vidaki *et al.*, 2013.

1.2.2. O *Imprinting* genómico

O *imprinting* genómico é um processo biológico que ocorre naturalmente nas células de diversos organismos e pode ser definido como uma marca epigenética que atua de modo distinto de acordo com o alelo parental herdado.

Ao contrário do proposto pelas leis Mendelianas, que defende igual contributo dos gametas sexuais na expressão génica, o *imprinting* genómico caracteriza-se pelas alterações que ocorrem no ADN que dependendo da origem do alelo parental originam diferentes fenótipos. Deste modo, promove uma expressão diferenciada dependendo dos alelos paternos e maternos herdados (Fridman & Koiffmann, 2000; Le Bouc *et al.*, 2010).

Este processo epigenético está associado a três etapas principais: a marcação do ADN dos gametas parentais, a manutenção dessa marca durante o desenvolvimento embrionário e nos tecidos somáticos adultos e o reajuste da marcação do ADN no início da gametogénese do novo indivíduo (Hall, 1990; Gomes, 2007). O *Imprinting* genómico, está ainda associado à inativação funcional de regiões da cromatina a partir da metilação de ilhas CpG (conjunto de dinucleotídeos CpG), uma vez que são diferentes as zonas metiladas de acordo com a origem do alelo. Estas marcas epigenéticas são um dos exemplos de marcas que são transmitidas entre gerações, visto que são transmitidas dos gametas para o embrião durante o processo de fecundação (Marques *et al.*, 2007).

I.2.3. Metilação do ADN

Uma das modificações covalentes de ADN com maior estudo e de maior predominância nos seres eucariontes, nomeadamente em animais é a metilação do ADN na citosina, seguido com menor frequência pelas metilações da adenina e guanina.

Esta marca epigenética é uma modificação herdável e estável, que afeta a regulação e expressão génica e a biologia celular (Fernandez *et al.*, 2012), uma vez que desempenha um papel importante no silenciamento génico herdado ao longo das divisões celulares. A metilação do ADN desempenha ainda um papel importante no processo de condensação da cromatina, evento este, referenciado pela literatura associado à não expressão génica (Figura I.4) (Miranda & Jones, 2007).

A metilação do ADN ocorre quase exclusivamente em dinucleotídeos CpG de células diferenciadas (Oliveira *et al.*, 2010), no entanto a metilação de ADN em plantas também pode ocorrer em locais CHG e CHH (Gruntman *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011).

Ao longo do genoma existem regiões denominadas de ilhas CpG, aglomerados de citosinas, que normalmente permanecem desmetiladas, enquanto em outros locais de CpG dispersos no genoma, se encontram metilados. É este padrão de metilação e desmetilação que determina quais os genes que serão expressos de acordo com a necessidade e o período em que a célula se encontra. Com o avanço da idade celular, verifica-se um processo inverso, ocorre um aumento das citosinas metiladas nas ilhas CpG contrapondo com uma diminuição global dos níveis de metilação no restante genoma.

Hoje em dia, sabe-se que cerca de metade dos genes de interesse, têm ilhas de CpG nas suas regiões promotoras, e que normalmente as mesmas se encontram desmetiladas permitindo a expressão normal dos mesmos. No entanto, quando as ilhas CpG presentes nas regiões promotoras dos genes se encontram hipermetiladas muitas vezes verifica-se o silenciamento de génicos. Sabe-se ainda que de acordo com alguns autores, na maioria dos tumores, o silenciamento de alguns genes supressores tumorais, resulta de uma metilação anormal do ADN (Chuang & Jones, 2007).

Deste modo, de acordo com o padrão de metilação do ADN, e até mesmo com o padrão de metilação das ilhas CpG, ambos influenciados pelo envelhecimento e pelos fatores ambientais externos, é possível estimar a idade biológica celular e ainda diferenciar gêmeos monozigóticos (Wong *et al.*, 2010; Bocklandt *et al.*, 2011; Koch & Wagner, 2011).

A metilação do ADN é uma modificação covalente em que ocorre a adição de um grupo metil, tal como citado anteriormente a maioria dos eventos de metilação no ADN ocorre em citosinas, e neste caso, a metilação ocorre na posição 5' da citosina (Figura I.3). Esta reação é catalisada por enzimas denominadas de ADN metil transferases (DNMTs) que adicionam um grupo metil na posição 5' da citosina, proveniente de uma molécula doadora a S-adenosil-metionina. Nos mamíferos, esta modificação ocorre nos dinucleótidos CpG e pode ser catalisada por três enzimas diferentes: DNMT1 e DNMT3a, e DNMT3b. Uma característica particular é que a metilação do ADN acontece quase exclusivamente em citosinas anteriores a uma guanina em um dinucleótido CpG.

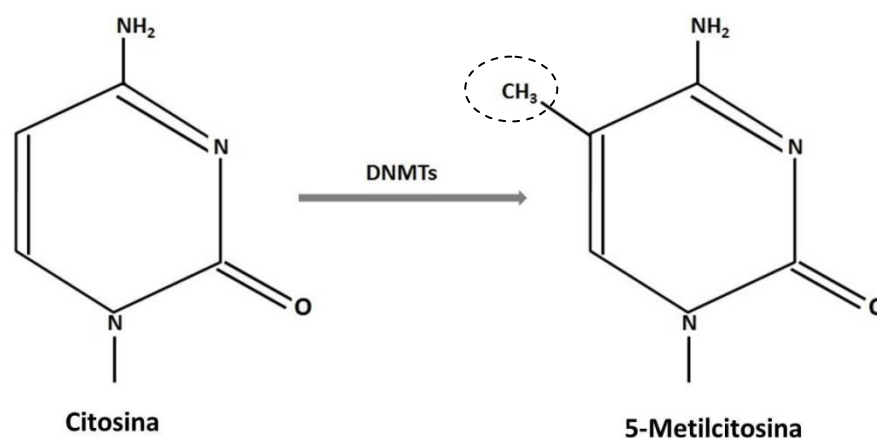


Figura I.3: Mecanismo de metilação de ADN, adaptado de Vidaki *et al.*, 2013.

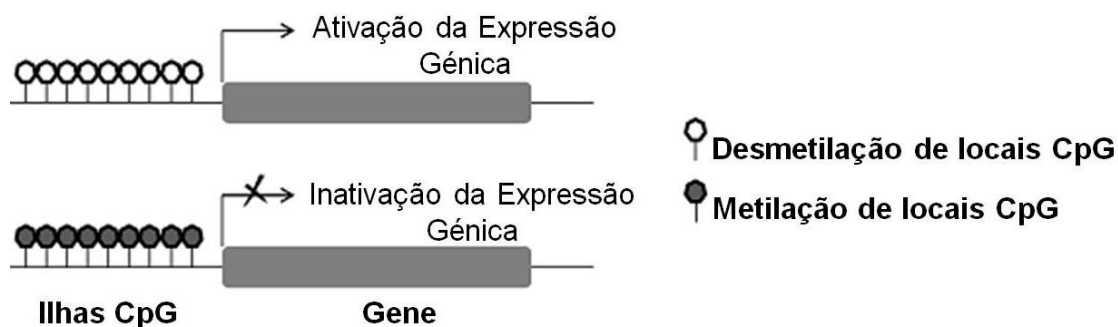


Figura I.4: Representação esquemática da regulação da expressão gênica em genes que contenham ilhas CpG, adaptado de Vidaki *et al.*, 2013.

I.2.4. Modificação das Histonas

Numa célula eucariótica, quase todo o ADN está compactado na cromatina, permitindo reduzir o tamanho da molécula. A cromatina é uma estrutura altamente dinâmica constituída por nucleossomas, unidades compostas pelo ADN, e estão envolvidos em torno do núcleo das proteínas histonas (H2A, H2B, H3 e H4) (Toth *et al.*, 2010). Esta estrutura é crucial para a regulação da expressão génica, que é feita através do recrutamento de complexos proteicos e pela remodelação da cromatina. As modificações covalentes no núcleo das histonas têm um papel crítico na regulação da expressão génica por meio da acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, SUMOilação entre outras modificações. Estas modificações em histonas são mais dinâmicas do que a metilação do ADN, uma vez que podem ser colocadas e removidas por uma ampla variedade de enzimas (Goldberg *et al.*, 2011; Van Montfoort, 2012).

Contrariamente à metilação do ADN, que geralmente está associada à repressão da transcrição, a metilação de histonas está associada tanto com a ativação quanto à repressão de genes, dependendo de quantos resíduos de lisina na histona são metilados (mono-, di- ou tri-metilados) (Toth *et al.*, 2010).

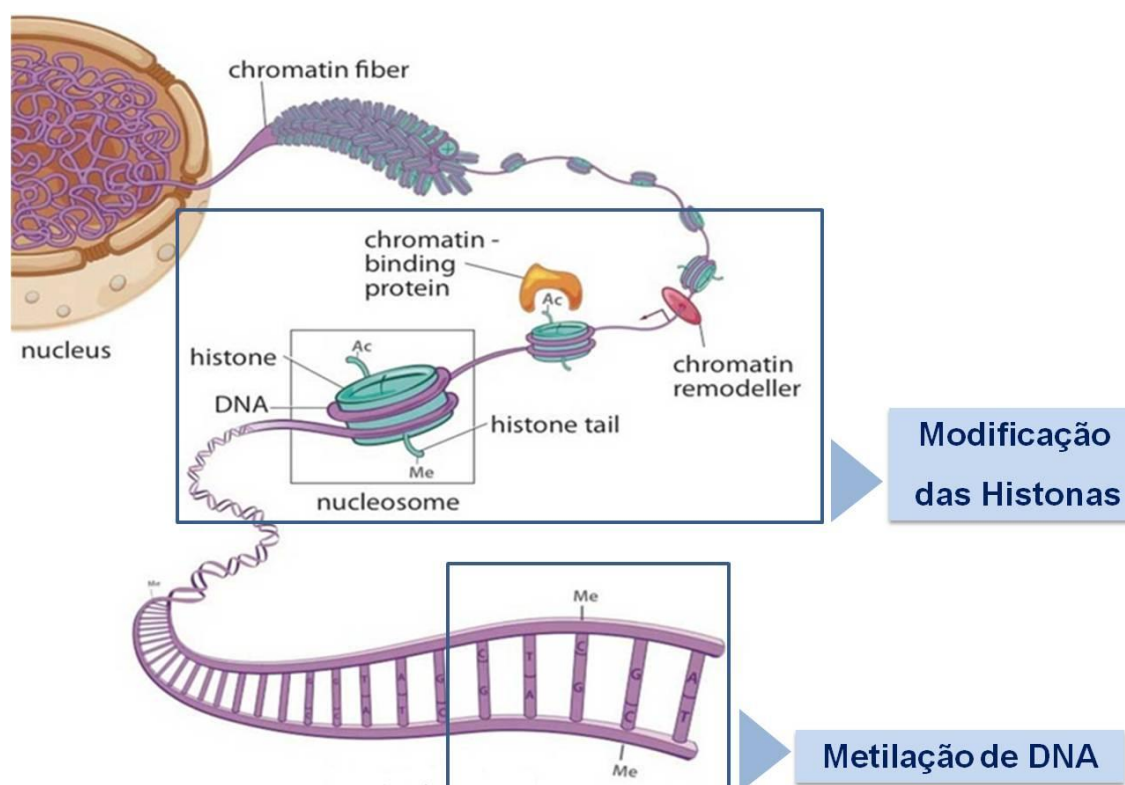


Figura I.5: Principais modificações Epigenéticas: modificação das histonas e metilação do ADN.

I.3. O Arroz (*Oryza sativa*) como organismo modelo para o estudo de marcas epigenéticas como a modulação de histonas

Todos os seres vivos possuem diferentes mecanismos de resposta ao *stress* para diminuir o seu impacto negativo (Hirayama & Shinozaki, 2010).

As alterações climáticas como a temperatura e a humidade, podem ter um efeito adverso na fisiologia dos seres vivos quando expostos a estas mudanças, gerando *stress* abióticos. As respostas face ao *stress* têm consequências na viabilidade dos organismos, podendo colocar em risco a sua capacidade de sobrevivência e o seu sucesso reprodutivo (Xiong *et al.*, 2009; Seck *et al.*, 2012).

As plantas, organismo sésseis, não podem evitar a exposição aos mais variados fatores de *stress* e são obrigadas a suportar os seus efeitos. Consequentemente, foram forçadas a desenvolver mecanismos complexos de resposta a fatores de stress. (Jagadish *et al.*, 2007; Efeoglu, 2009; Hirayama & Shinozaki, 2010; Santos *et al.*, 2011).

O arroz (*Oryza sativa*) é considerado um excelente modelo de estudo de plantas para a cultura de cereais. Trata-se de um organismo modelo que possui um ciclo de crescimento de 4 meses, sendo uma das variedades de cereais com ciclo de maturação mais rápido, possui o seu genoma totalmente sequenciado e com um tamanho reduzido (430Mb). Apresenta ainda, consideráveis sintonias conservadas com outros cereais igualmente importantes para a alimentação de humanos e de animais domesticados, tais como, o milho, o sorgo e o trigo, permitindo que estudos realizados com este modelo sejam correlacionados com as restantes culturas de cereais (Gale & Devos, 1998).

O arroz é uma das plantas de cultivo com maior relevo na história da humanidade, tendo sido uma das primeiras espécies vegetais a ser domesticada. Atualmente ocupa um papel essencial na nutrição humana, sendo a segunda planta mais cultivada do mundo a seguir ao milho, e ocupa um impacto na alimentação da população humana à escala global, constituindo a fonte primária de nutrição para cerca de 70% da população mundial (Humphreys *et al.*, 2007).

Em Portugal o arroz assume igualmente uma enorme importância, uma vez que Portugal é o maior consumidor europeu de arroz *per capita*, com uma produção insuficiente para suprir as necessidades de consumo nacionais (Food and Agriculture Organization of

the United Nations, 2009). A baixa produtividade, algo sobre o qual os agricultores se debatem, resulta essencialmente da extrema sensibilidade do arroz face às condições ambientais adversas.

A resposta a stresses ambientais, como o frio, envolve alterações na estrutura da cromatina, identificada como uma marca epigenética (Santos *et al.*, 2011), e ainda a interação com genes específicos (Figueiredo *et al.*, 2012). Acredita-se que, os mecanismos epigenéticos em conjunto com os fatores de transcrição assumam um papel relevante na regulação da expressão de genes face à exposição de stresses ambientais (Figueiredo *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2011).

Apesar de pouco conhecimento sobre as marcas epigenéticas envolvidas na resposta a fatores de stresses ambientais como o frio, o grupo de investigação do laboratório de Genómica de Plantas em Stress (GPlantS), está a desenvolver um trabalho de investigação científica que procura decifrar quais as marcas epigenéticas envolvidas em resposta ao frio, tais como a modificação de histonas.

Através da técnica de Imunoprecipitação da Cromatina (ChiP), que permite correlacionar marcas epigenéticas específicas de modificações de histonas com os estados da cromatina e expressão de genes, o grupo conseguiu identificar um enriquecimento da metilação da lisina 4 da histona 3 (*H3K4me*) ao nível do promotor de um gene fortemente induzido pelo frio (*OsDREB1B*). Adicionalmente, são estudadas plantas mutantes para as enzimas que estabelecem as marcas epigenéticas, uma vez que atuam como um controlo auxiliando na compreensão da regulação epigenética de genes de resposta a stresses.

O plano de trabalho de investigação delineado para esta tese de mestrado tem como objetivo perceber qual o papel das enzimas que estabelecem as modificações das histonas na regulação da expressão do gene específico de resposta ao frio (*OsDREB1B*).

O estudo de marcas epigenéticas num organismo modelo eucarionte de fácil manuseio, com um ciclo de maturação compatível com o tempo disponibilizado para a realização da tese de mestrado, e ainda o fato de que não constituir implicações éticas, foi o modo que melhor permitiu a compreensão das marcas epigenéticas e da sua real importância na vida, sobrevivência e reprodução dos organismos vivos, como é o caso do ser humano.

CAPITULO II

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

A elaboração deste trabalho de tese de mestrado em Medicina Legal, pretende apresentar inovações na área da Epigenética reconhecendo e identificando os contributos que possam ser aplicados no âmbito da Medicina Legal.

Por forma a melhor compreender os mecanismos e marcas epigenéticas foi realizada uma componente prática. Deste modo, o trabalho de investigação pretendeu reunir novas competências técnicas e teóricas de metodologias aplicadas em Epigenética, promovendo a autonomia de investigação laboratorial e contribuindo para uma melhor análise crítica sobre os trabalhos que têm vindo a ser realizados em humanos.

A realização prática deste trabalho, foi possível graças à aceitação de realização da tese de mestrado no grupo de investigação Genómica de Plantas em Stress (GPlantS) no ITQB (Instituto de Tecnologia Química e Biológica) em Oeiras, um trabalho de investigação científica inserido no âmbito de uma bolsa de investigação fornecida pela FCT (Fundação para a Ciência e Tecnologia) intitulado "*The impact of environmental stresses on epigenetic regulation of rice genome*" FCT/MCTES, Ref PTDC/BIA-BCM/111645/2009, trabalho supervisionado pela Doutora Ana Paula Santos e ainda pelo trabalho de acompanhamento de técnicas complementares desenvolvido no Departamento de Biologia Animal, Biologia Vegetal e Ecologia (BABVE) da Universidade Autónoma de Barcelona.

CAPITULO III

MATERIAL E MÉTODOS

III. MATERIAL E MÉTODOS

A primeira parte do trabalho, consistiu na aquisição de conhecimentos teóricos e práticos de metodologias de análise Epigenética, aplicáveis em organismos modelo, vegetais (arroz, milho) e animais (ratos), assim como em humanos.

III.1. COMO AS MARCAS EPIGENÉTICAS SÃO INFLUENCIÁVEIS PELO AMBIENTE: **Arroz (*Oryza sativa*), organismo modelo para o estudo de marcas epigenéticas**

Com este trabalho prático pretendeu-se entender qual o efeito das marcas epigenéticas do arroz (*Oryza sativa*) quando sujeito a fatores ambientais adversos como o frio (4°C) através da análise da resposta de expressão génica do gene específico (*OsDREB1B*). A marca epigenética alvo de estudo é uma modificação ao nível de uma das enzimas que intervêm no processo de condensação da cromatina. Existem quatro grandes famílias de enzimas que modulam a cromatina interferindo com a regulação e expressão do gene *OsDREB1B*: Histonas Acetil-transferase (HATs), Histonas Metil-transferase (HMTs), Histonas Demetilases (HDMs) e as Histonas Deacetilases (HDACs). Neste estudo recorreu-se à análise de dois grupos de plantas de arroz da variedade *Don jing*. Plantas selvagens sem alterações (*Don jing* selvagem) e plantas mutantes para uma família de histonas (*Don jing* mutante homocigótico). A planta, *Don jing* mutante homocigótica, não possui uma histona com papel enzimático que promove a acetilação da cromatina e por isso interfere com o nível da expressão do gene (*OsHAC704*). É sabido pela literatura que o fenómeno de acetilação está associado à expressão génica, deste modo, espera-se que a planta mutante, revele um resultado diferente da planta selvagem e que com esses dados possa auxiliar na compreensão do mecanismo epigenético da modificação desta histona em particular.

Outra particularidade deste estudo foi a incorporação de uma droga específica que colmatasse a falta da enzima da planta mutante homocigótica. Entre muitas drogas a ser aplicadas, foi selecionada a *Trichostatin A* (TSA) uma droga específica que inibe a ação das HDACs (Vanhaecke *et al.*, 2004). A TSA é um inibidor do ciclo celular que atua no início do estágio de crescimento, competindo pelo lugar de atuação das HDACs, conseqüentemente verifica-se uma maior ação das enzimas de acetilação. A TSA promove uma hiper acetilação das histonas, contribuindo para o aumento da expressão génica. Esta droga apresenta um enorme potencial anticancerígeno (Drummond *et al.*, 2005), e tem sido utilizada em tratamentos oncológicos uma vez que promove a apoptose celular e ajuda a

combater a progressão celular tumoral (Drummond *et al.*, 2005; Shankar & Srivastava, 2008). Apesar de ser uma droga inibidora das histonas deacetilases, os mecanismos epigenéticos e os efeitos moleculares resultantes não são ainda totalmente conhecidos (Shankar & Srivastava, 2008).

Os estudos efetuados envolvendo marcas epigenéticas são subdivididos em análise global das marcas epigenéticas, exemplo a análise do padrão de metilação de ADN e padrão de modificação de histonas; e uma análise específica de uma marca epigenética, como por exemplo um gene ou uma histona em particular. Neste trabalho foi possível realizar uma análise específica de um gene típico de resposta ao *stress* do frio, o *OsDREB1B* e uma histona com função enzimática, *OsHAC704*, relacionada com o mecanismo de acetilação das histonas, associada pela literatura com a ativação de genes.

III.1.1. Alteração das marcas epigenéticas face à exposição de condições de *stress*, Frio (4°C)

III.1.1.1. Material biológico: variedades do Arroz

Foram estudados dois grupos de plantas da mesma variedade de arroz *Don jing* selvagem e *Don jing* mutante homocigótico para *OsHAC704* (histona acetil-transferase).

III.1.1.2. Obtenção e confirmação da planta de arroz mutante

O mutante da variedade *Japonica* de *Don jing* para a enzima que codifica a histona acetil-transferase (Gene HAC704, Locus Os06g49130.l) resulta da inserção de uma sequência de ADN (*T-DNA insertion line 4A-01884 R, rice ssp.japonica cv. Dongjin*) (Jeon *et al.*, 2000) encomendado à RiceGE: Rice Functional Genomic Express Database (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/RiceGE>).

Após ter sido propagada a planta mutante, esperou-se 4 meses pela sua maturação e foram colhidas folhas e feita a sua extração de ADN, purificação, e armazenamento em azoto líquido. A planta mutante homocigótica foi confirmada através da realização de um estudo de genotipagem utilizando a técnica de PCR, com o conjunto de *primers*:

Fw: 5' GGC TCA ACA TCA GCA AGG TC 3'

Rv: 5' TCC GAT ACA CCA TAC GGG GA 3'

Foi feita ainda uma análise semi-quantitativa recorrendo ao cDNA da planta mutante e o cDNA da planta selvagem através da técnica de PCR semi-quantitativo para confirmar a não presença da enzima de acetilação. Foram utilizados cDNAs das folhas das plantas. Segue o conjunto de *primers* utilizados:

Fw: 5' GGC ATC AGG TCG CTT CAG GT 3'

Rv: 5' TCC GAT ACA CCA TAC GGG GA 3'

Todos os *primers* utilizados tinham a concentração de 1,25mM e uma temperatura de *annealing* de 60°C.

III.1.1.3. Ferramentas bioinformáticas para o desenho dos conjuntos de Primers:

Bases de dados do genoma do arroz (*Oryza sativa*): Rice Genome Annotation Project (<http://rice.plantbiology.msu.edu/index.shtml>);

Ferramenta de desenho de *primers*, programa bioinformático BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>);

Alinhamento das sequências realizado pelo programa bioinformático Clustal (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

III.1.2. Análise de gene específico de resposta ao stress do frio, *OsDREB1B* e histona específica *OSHAC704*

III.1.2.1. Condições de Crescimento

Por forma a que a germinação das sementes ocorresse livre de qualquer contaminação biológica e a fim de evitar a existência de um *stress* não desejado, todas as sementes de arroz das duas plantas foram sujeitas a um tratamento de lavagem otimizado em laboratório. As sementes foram colocadas separadamente em dois pequenos frascos de vidro com tampa com uma solução de benlate (1g/L) por 30 min a uma temperatura de 50°C. O benlate é um fungicida que combinado com elevadas temperaturas garante a sua máxima eficiência, o tempo de exposição pode variar de acordo com a espécie vegetal utilizada. Posteriormente as sementes foram lavadas com água bi-distilada (H₂O dd) e sujeitas a um tratamento de desidratação com álcool a 70% durante 1min à temperatura ambiente. Novamente lavadas com água bi-distilada as sementes foram sujeitas depois a um tratamento de uma solução de hipoclorito de sódio (50 mL H₂O dd + 50 ml lixívia + 2-3 gotas de detergente Tween, Sigma) durante 30 min com agitação à temperatura ambiente, lavando as sementes com água bi-distilada após os 30 min. O processo de lavagem finaliza após a repetição do último passo repetido por 6 vezes com um intervalo de tempo 15 min em cada lavagem para garantir a ausência de qualquer substância ou organismo capaz de causar dano às sementes.

Posteriormente à lavagem as sementes foram colocadas em caixas de *petri* de vidro com papel de filtro estéril embebido com água destilada ultra purificada e colocadas numa câmara escura a 27,8°C durante 5 dias. No início do 5º dia as sementes que germinaram foram colocadas, duas sementes por cada tubo de ensaio esterilizado com meio de nutritivo Yoshida (Yoshida *et al.*, 1976), numa câmara de crescimento com o fotoperíodo de 12:12h, 28/24°C temperatura, 70% humidade e 700µmol photons.m⁻².s⁻¹ até perfazer o total de 15 dias. Durante o período de crescimento o meio nutritivo foi substituído no 8º, 11º e 14º dias. No 15º dia as plantas foram sujeitas ao tratamento de *stress* do frio (Figura III.2).

Após o crescimento na câmara durante 15 dias, as plantas selvagens e mutantes foram dispostas em 9 grupos previamente selecionados, como se pode observar na tabela III.1.

Tabela III.1: Disposição das plantas por grupos de acordo com o tipo de tratamento de *stress*.

PLANTAS	CONDIÇÕES DE STRESS
Selvagem	Controlo sem Stress
Selvagem	Frio (4°C) 30 min.
Selvagem	Frio (4°C) 4 horas
Selvagem	TSA (3 dias)
Mutante	Controlo sem Stress
Mutante	Frio (4°C) 30 min.
Mutante	Frio (4°C) 4 horas
Mutante	TSA (3 dias)
Mutante	TSA (3 dias) + Frio (4°C) 4 horas

III.1.2.2. Tratamento de stress, Frio 4°C, período 30 min e 4 horas

Foram organizados 5 grupos de plantas no tratamento do *stress* ambiental do frio a 4°C numa câmara com fotoperíodo 12:12h, 4°C temperatura, 0% humidade e 700 μmol photons.m⁻².s⁻¹. Plantas selvagem (controlo) e plantas mutantes foram sujeitas a 30 minutos de exposição a 4°C, plantas selvagem (controlo) e plantas mutantes sujeitas a 4 horas de exposição a 4°C, plantas mutantes com incorporação de droga no meio nutritivo TSA sujeitas a 4 horas de exposição a 4°C. As plantas ao serem transferidas para a câmara de *stress* do frio, foi-lhes também substituído o meio nutritivo Yoshida que se encontrava a 4°C, a fim de evitar uma adaptação das plantas à temperatura, sendo que o que se pretendeu foi provocar um *stress* por choque térmico (Figura III.2) (Figueiredo *et al.*, 2012).

III.1.2.3. Tratamento de stress, droga TSA, período de 3 dias

No 13º dia, 15 plantas mutantes foram expostas a um meio nutritivo Yoshida com a droga Trichostatin A (TSA), inibidor de HDAC, a 15µM. (Figura III.1) (Yoshida *et al.*, 1995; SIGMA-ALDRICH, <http://www.sigmaaldrich.com>).

Após os tratamentos de *stress*, as plantas devidamente separadas por folhas e raízes, foram imediatamente colocadas *falcons* em azoto líquido, for forma a preservar o efeito de *stress* selecionado impedindo outro tipo de *stress* não desejado, tendo sido posteriormente armazenadas numa câmara a -80°C.

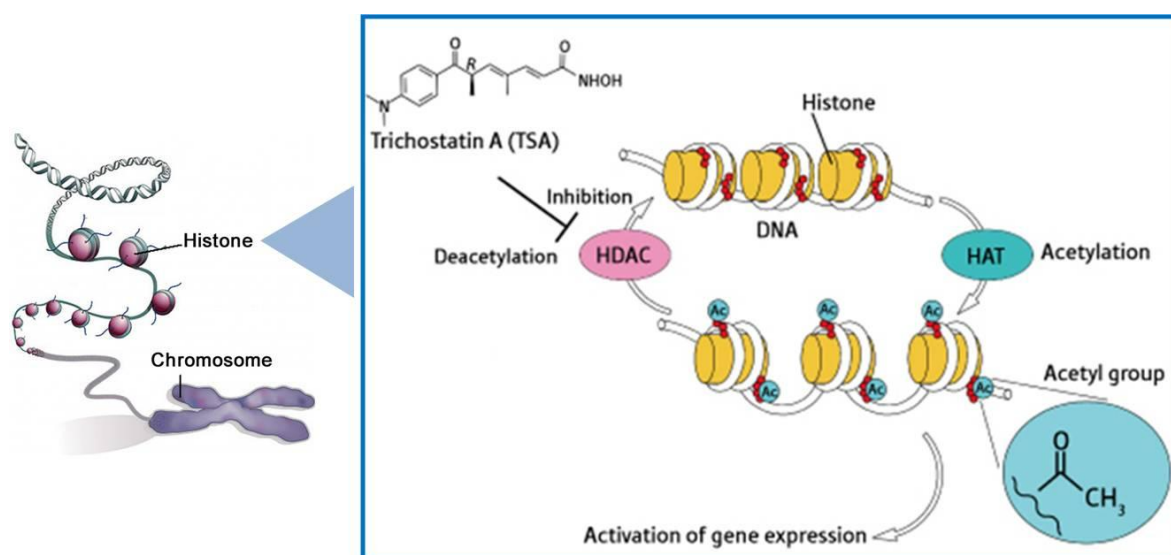
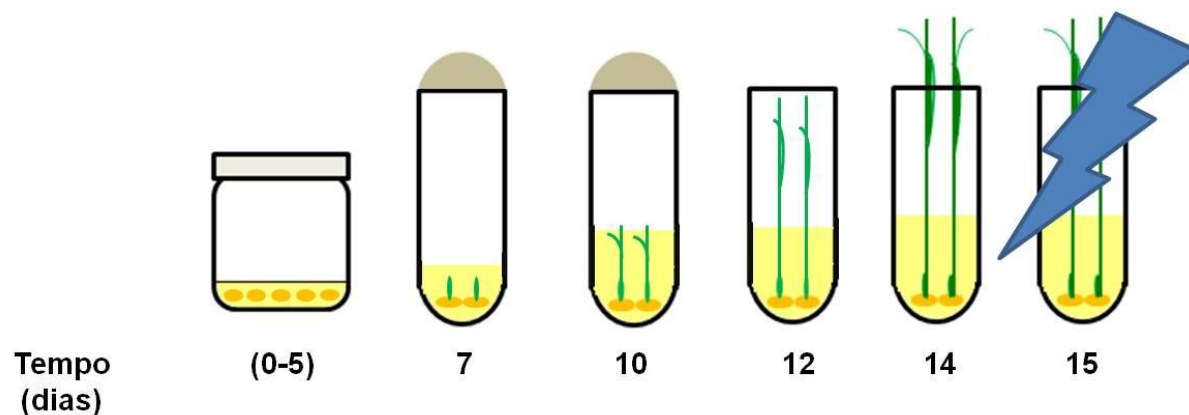


Figura III.1: Representação esquemática do processo de inibição das HDACs pela droga trichostatin A, modificado de Riken, 2008.



Tempo (dias)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Condições de stress 15º Dia
Selvagem & Mutante																Controlo sem stress	
Selvagem & Mutante																Frio (4°C) 30min.	
Selvagem & Mutante																Frio (4°C) 4horas	
Selvagem & Mutante																TSA (3 dias)	
Mutante																TSA (3 dias) + Frio (4°C) 4horas	

Figura III.2: Representação esquemática dos ensaios experimentais. Período de germinação (0 -5 dias), camara escura, a 28°C. Período de crescimento em meio yoshida (6 – 14 dias) camara com fotoperíodo e condições controladas. Tratamento de stress do fio 4°C (15º dia), colheita e armazenamento das plantas.

III.1.3. Estudo de expressão génica do gene *OsDREB1B*, pela técnica de PCR em Tempo Real

III.1.3.1. Extração, purificação, quantificação de RNA e síntese de cDNA

Por forma a conseguir extrair o RNA das folhas das plantas do ensaio experimental (Figura III.2), estas foram individualmente maceradas em azoto liquido, com o propósito de evitar contaminações e evitar que a amostra se deteriorasse.

Foram utilizados 50 ng de macerado de folhas de todas as plantas para proceder à extração de RNA.

A extração de RNA foi realizada de acordo com o protocolo do kit comercial, Direct Zol RNA Mini-Prep (Zymn). Após a extração de RNA, todas as amostras foram purificadas pelo método Turbo DNase Free (Ambion) e quantificadas pelo uso do Nanodrop que também revela o ratio de pureza das amostras. Posteriormente, foi sintetizado cDNA a partir de 4µg de RNA total de cada amostra pelo protocolo do kit comercial, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit (Roche). Os resultados da extração foram analisados num gel de 1% de agarose e fotografados utilizando o *software* GelDoc system.

III.1.3.2. Conjunto de Primers para a quantificação por PCR em Tempo Real

Antes de proceder à quantificação da expressão do gene, foi necessário determinar a recta de calibração e calcular a eficiência de expressão do gene, valores compreendidos num intervalo de [95-105]. Para a realização do cálculo da eficiência utilizou-se um gene de referência normalmente expresso em todas as células UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME (UBC). Todos os *primers* utilizados tinham a concentração de 1,25mM e uma temperatura de *annealing* de 60°C.

Conjunto de *primers* utilizados:

qPCR (*OsDREB1B*) Fw: 5'-CGCGAGGGGGGTCAGGGA-3'

qPCR (*OsDREB1B*) Rv: 5'-TAGTAGCTCCAGAGCGGCAT-3'

qPCR (UBC) Fw: 5'-CAAATTTTCCACCCGAATG-3'

pPCR (UBC) Rv: 5'-ATCACATGAATCAGCCATGC-3'

qPCR (*OsHAC704*) Fw: 5' GGC ATC AGG TCG CTT CAG GT 3'

qPCR (OsHAC704) Rv: 5' TCC GAT ACA CCA TAC GGG GA 3'

III.1.3.3. PCR em Tempo Real

O cálculo da eficiência do gene específico assim como a quantificação da expressão do mesmo foram realizados recorrendo a 5µL de cDNA de amostra utilizando o termociclador Lightcycler 480 thermocycler, o fluorocromo 480 SYBR Green I (Roche). Para cada amostra foram utilizadas três réplicas. Os *primers* utilizados estão acima citados, e a mesma temperatura de annealing foi aplicada em todos os conjuntos de *primers*.

III.1.3.4. Análise de resultados

Não foi possível a realização de uma análise estatística, uma vez que das três experiências realizadas, apenas houve material suficiente e em condições adequadas de duas experiências para proceder à análise e quantificação do material por PCR em Tempo Real. Seria necessário, ter material de uma nova experiência conduzida sob as mesmas condições apresentadas na Figura III.2, para se proceder a quantificação estatística dos resultados.

III.1.4. Técnicas de análise de marcas epigenéticas:

Durante a realização deste trabalho, por uma incompatibilidade de tempo, não foi possível realizar todas as técnicas que são aplicadas em análises epigenéticas. Porém, foi possível acompanhar outros trabalhos em curso na área da epigenética, desenvolvidos por colegas inseridos no mesmo grupo de investigação.

III.1.4.1. Análise global dos níveis de metilação, técnica de sequenciação com bissulfito

A técnica considerada padrão para analisar o estado de metilação do ADN, é o tratamento do ADN com Bissulfito seguido de Sequenciação. Neste processo, o bissulfito converte apenas as citosinas que não estão metiladas em uracilos sendo estas posteriormente lidas como timinas, enquanto citosinas metiladas são protegidas da conversão. O rendimento do bissulfito permite a obtenção de resultados com uma resolução optima dos dados (Fernandez *et al.*, 2012). Após a conversão das citosinas não metiladas em uracilos, a análise sobre o padrão de citosinas metiladas pode ser feita segundo vários métodos: digestão, utilizando enzimas de restrição; ensaios de extensão de nucleotídeos (MS-SnuPE); PCR com iniciadores específicos (MSP); sequenciação e ainda pirosequenciação.

As principais vantagens destas técnicas, reside no facto de não exigirem grandes quantidades de ADN, e de não serem muito laboriosos. No entanto, esta metodologia apenas permite estudar um gene ou *locus* por cada ensaio (Yang *et al.*, 2004).

III.1.4.2. Análise do mecanismo de interação do ADN com as histonas, técnica de imunoprecipitação da cromatina (ChIP)

Uma das técnicas que melhor permite entender como ocorre o mecanismo de interação do ADN com proteínas, como o caso das modificações que ocorrem nas histonas, denomina-se por técnica de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP). A ChIP é uma das técnicas que tem sido amplamente utilizada com o propósito de mapear locais específicos, tais como, caudas de histonas e genes específicos; permite ainda mapear a associação de fatores de transcrição em promotores e outros locais específicos de ligação do ADN; e ainda identificar enzimas que modificam o estado da cromatina (Collas & Dillas 2008).

A ChIP é uma técnica eficiente que permite a análise da interação entre fatores de transcrição e os complexos reguladores da cromatina com o DNA em células vivas, proporcionando assim uma imagem da célula viva com a estrutura nativa da cromatina ligada aos fatores modeladores de genes, de acordo com os diferentes estados funcionais.

Existem dois tipos de ChIP dependendo do processo de preparação inicial sobre a cromatina. O primeiro método, ChIP (XChIP) envolve o *crosslink* entre proteína-proteína e proteína-DNA, seguido do corte por sonicação para produzir pequenos fragmentos, variáveis entre 300-1000pb de tamanho médio. O segundo método ChIP (NChIP), a cromatina nativa é cortada por digestão enzimática.

Depois de fragmentada a cromatina, são adicionados anticorpos específicos, que permitem imunoprecipitar os fragmentos da cromatina. Posteriormente os fragmentos são purificados, e por último os resultados podem ser visualizados por PCR; microarrays (ChIP-on-chip); clonagem; sequenciação; ou ainda sequenciação direta de alto rendimento (ChIP-seq) (O'Neill *et al.*, 2004).

III.2. Progressos na Epigenética com aplicação nas ciências forenses

A segunda parte do trabalho, consistiu numa análise e discussão sobre os trabalhos recentes desenvolvidos em epigenética com aplicações nas ciências forenses.

A revisão bibliográfica foi efetuada com recurso a artigos científicos publicados em revistas internacionais disponíveis em base de dados como a PubMed da plataforma NCBI (National Center for Biotechnology Information), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>; e a revista *internacional Forensic Science International – Journal*, <http://www.journals.elsevier.com/forensic-science-international/>.

Principais palavras-chave utilizadas: epigenetic; forensic epigenetic; forensic genetic.

CAPITULO IV

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

A análise de marcas epigenéticas pode fornecer informações relevantes para a resolução casos de filiação e ainda casos de uma investigação criminal na determinação de uma identidade.

Por forma a melhor compreender como funcionam os mecanismos epigenéticos, foram realizadas atividades experiências nesse sentido, utilizando um organismo modelo vegetal o arroz (Capítulo III).

Deste modo, neste capítulo serão apresentados os resultados experimentais obtidos.

IV.1. Resultados Experimentais

IV.1.1. Como as marcas epigenéticas são influenciáveis pelo ambiente

A aquisição de prática em metodologias de análise de marcas epigenéticas possíveis de aplicar em humanos foi um dos objetivos principais deste trabalho. Porém outro objetivo do trabalho consistia em perceber até que ponto pode o ambiente externo, promover alterações em marcas epigenéticas e se estas alterações afetam ou não o organismo.

São vários os trabalhos epigenéticos realizados em humanos, nomeadamente na área da saúde mas também no âmbito forense, em particular casos de estudo de comportamento humano. Na literatura, estudos de análise comportamental humana revelam que a exposição a situações de *stress* ou eventos traumáticos nos primeiros anos de vida, podem alterar significativamente as marcas epigenéticas e com essas alterações condicionar comportamentos futuros (Yehuda & Bierer, 2009; McGowan & Szyf, 2010).

Para a realização deste trabalho, foram estudadas marcas epigenéticas num organismo modelo, o arroz, que foi sujeito a situações de *stress* (frio, 4°C) nos primeiros estágios de vida, 15 dias após a germinação.

Das marcas epigenéticas possíveis de analisar, foi escolhida uma enzima que está intimamente associada a mecanismos epigenéticos que controlam a regulação da expressão de genes, *OsHAC704*, que promove a acetilação das histonas, que por sua vez interfere no processo que permite a expressão de genes específicos de interesse.

Neste caso, como o *stress* escolhido foi a exposição ao frio (4°C), foi ainda analisado um gene específico de resposta ao frio, *OsDREB1B*. De modo, a que fosse mais fácil perceber qual a relevância desta enzima nos mecanismos de controle e regulação da expressão de genes foi analisado os níveis de expressão do gene em plantas que possuíam a enzima *OsHAC704* (Dj) e plantas que não possuíam a enzima estudada (Mut).

De acordo com os procedimentos experimentais apresentados no capítulo III, quinze dias após a germinação as plantas foram sujeitas a diferentes tempos de exposição ao *stress*, tal como demonstrado no capítulo III, figura III.2.

IV.1.1.1. Níveis de expressão da enzima *OsHAC704*, quando sujeito a fatores externos ambientais de *stress*, Frio, 4°C

Os ensaios foram conduzidos em plantas que possuem a enzima *OsHAC704*, Don jing selvagem (Dj – plantas controle, sem exposição a frio; Dj 30min – plantas expostas a 30 min a 4°C; Dj TSA – plantas expostas a 3 dias com TSA).

A análise de resultados foi obtida através da comparação dos resultados de cada grupo exposto ao *stress* com as plantas controle.

Os resultados obtidos em ambos os ensaios revelaram, que todas as plantas quando sujeitas à exposição de um fator externo como o frio, demonstraram níveis de expressão da enzima *OsHAC704* são inferiores comparativamente com os níveis de expressão da enzima *OsHAC704* das plantas controle, que não foram sujeitas à exposição do frio (Figura IV.1).

A adição da droga TSA, conhecida por promover a hiperacetilação das histonas (capítulo III) durante três dias (13^o-15^odia) revelou que os níveis de expressão do gene que codifica a enzima *OsHAC704* são superiores quando comparados com os níveis de expressão da enzima *OsHAC704* das plantas controle (Figura IV.1).

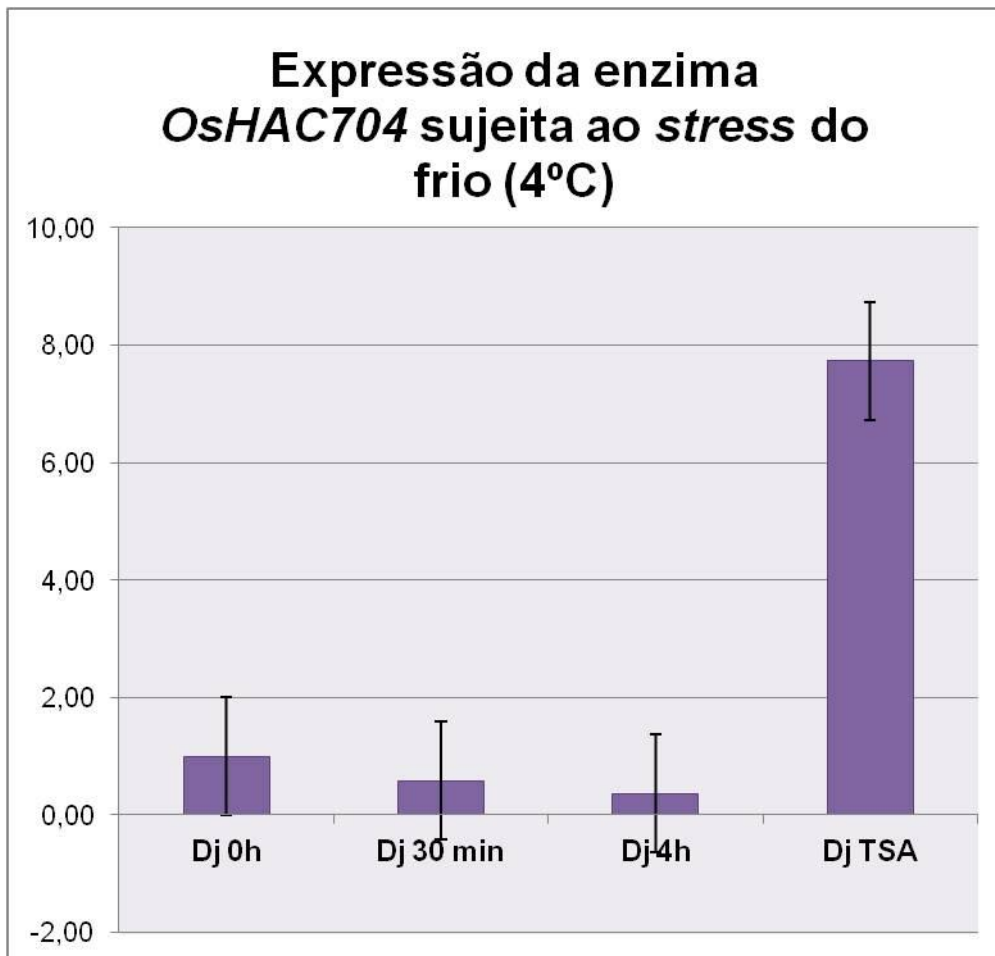


Figura IV.1: Níveis de expressão da enzima *OsHAC704*, em diferentes condições de *stress*.

Dj 0h (plantas controlo, sem exposição a 4°C); Dj 30 min (plantas com exposição a 4°C durante 30 min); Dj 4 h (plantas com exposição a 4°C durante 4 horas); Dj TSA (plantas com administração de TSA durante 3 dias, e sem exposição a 4°C).

IV.1.1.2. Níveis de expressão do gene específico de resposta ao frio, *OsDREB1B*

Neste ensaio foram analisados dois grupos de plantas. Plantas que possuem a enzima *OsHAC704* (*Don jing* selvagem – Dj), promotora da acetilação e plantas que não possuem a enzima *OsHAC704* (*Don jing* mutante – Mut). Quando sujeitas ao fator de *stress*, frio (4°C) os dois grupos de plantas revelaram resultados diferentes (Figura IV.2).

Grupo de plantas que possuem a histona *OsHAC704* (Dj 0h – controlo; Dj 30min – 30 min de exposição a 4°C; Dj 4h – 4h de exposição a 4°C):

A análise de resultados foi obtida através da comparação dos resultados de cada grupo exposto ao *stress* com as plantas controlo.

Plantas selvagens expostas a 30 minutos a 4°C, revelaram níveis de expressão do gene *OsDREB1B* inferiores comparativamente com os níveis de expressão das plantas controlo (selvagem). No entanto, os níveis de expressão do gene *OsDREB1B* em plantas selvagens expostas a 4 horas a 4°C foram superiores, quase o dobro, comparativamente com as plantas controlo.

Grupo de plantas que não possuem a histona *OsHAC704* (Mut 0h – controlo negativo; Mut 30min – 30 min de exposição a 4°C; Mut 4h – 4h de exposição a 4°C):

A análise de resultados foi obtida através da comparação dos resultados de cada grupo exposto ao *stress* com as plantas controlo.

Plantas mutantes, sujeitas à exposição de 30 minutos a 4°C e as plantas mutantes, sujeitas à exposição de 4 horas a 4°C revelaram níveis de expressão do gene *OsDREB1B* superiores às plantas controlo selvagens e níveis superiores ainda mais significativos em plantas mutantes sem exposição a 4°C.

No entanto, os níveis de expressão do gene *OsDREB1B* de plantas mutantes, sujeitas à exposição de 4 horas a 4°C é muito superior quando comparada com os níveis de expressão do gene *OsDREB1B* em plantas mutantes sujeitas a 30 minutos a 4°C.

Análise da administração da droga TSA

Relativamente à adição da droga TSA, por um período de 3 dias, os resultados dos níveis de expressão do gene *OsDREB1B*, das plantas com a histona *OsHAC704* são diferentes dos níveis de expressão do gene específico em plantas que não possuem a enzima *OsHAC704*.

No grupo de plantas que possui a histona *OsHAC704* a adição da droga TSA, promoveu níveis de expressão do gene específico de resposta ao frio inferiores comparativamente com as plantas controlo que possuem a histona em estudo.

No grupo de plantas que não possuem histona *OsHAC704* a adição da droga TSA, promoveu níveis de expressão do gene *OsDREB1B* muito superiores quando comparados com as plantas controlo com histona e quando comparados com as plantas controlo sem histona.

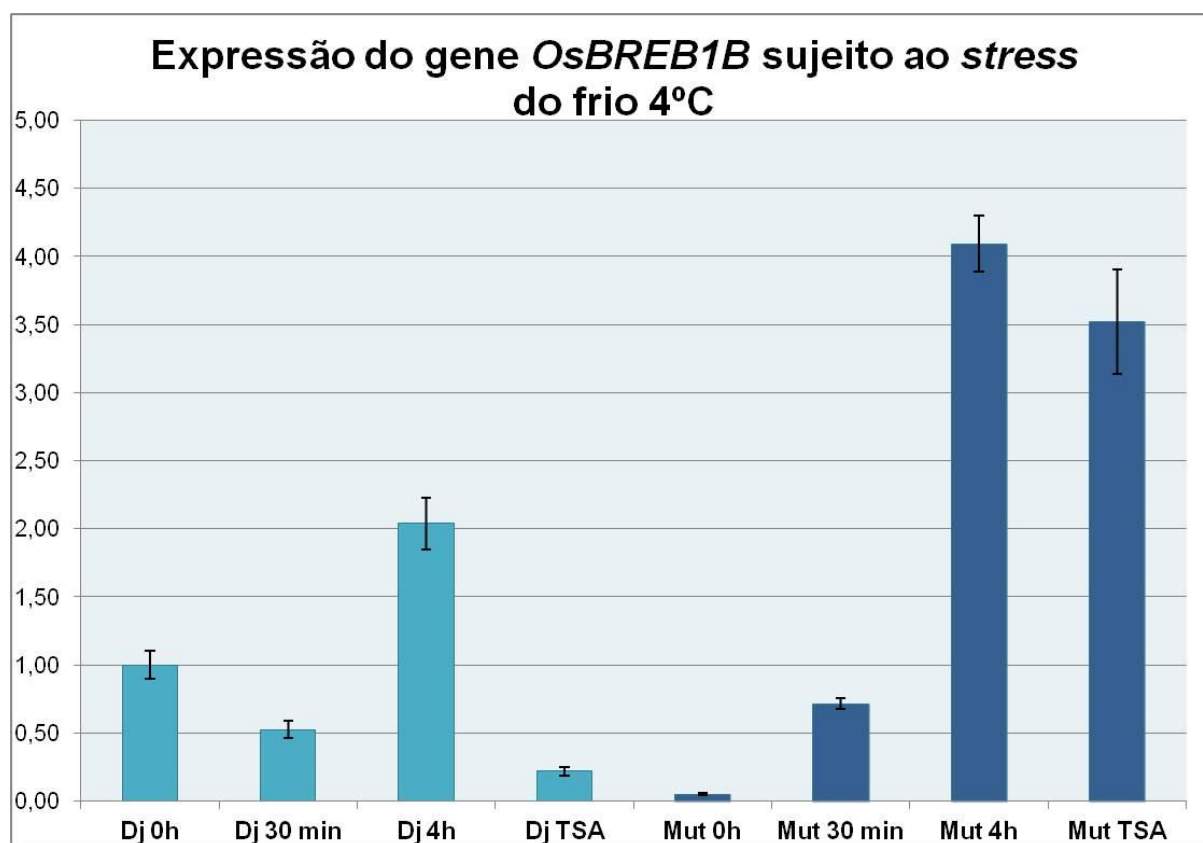


Figura IV.2: Níveis de expressão do gene específico de resposta ao frio, *OsDREB1B* em grupos de plantas com histona *OsHAC704* (Dj) e grupos de plantas sem histona *OsHAC704* (Mut).

Dj 0h (plantas controlo, sem exposição a 4°C) Dj 30 min (plantas com exposição a 4°C durante 30 min); Dj 4 h (plantas com exposição a 4°C durante 4 horas); Dj TSA (plantas com administração de TSA durante 3 dias, e sem exposição a 4°C); Mut 0h (plantas sem

exposição a 4°C) Mut 30 min (plantas com exposição a 4°C durante 30 min); Mut 4 h (plantas com exposição a 4°C durante 4 horas); Mut TSA (plantas com administração de TSA durante 3 dias, e sem exposição a 4°C).

Foi ainda realizado um outro ensaio com dois grupos de plantas mutantes sem a enzima *OsHAC704*. Um grupo de plantas mutantes sujeito à exposição de 4 horas a 4°C e outro grupo de plantas mutantes sujeitas à exposição de 4 horas a 4°C, com a adição prévia de TSA durante 3 dias (Figura IV.3).

Os resultados obtidos revelaram níveis de expressão do gene *OsDREB1B* muito próximos para ambos os grupos de plantas mutantes expostas a igual período de 4 horas a 4°C.

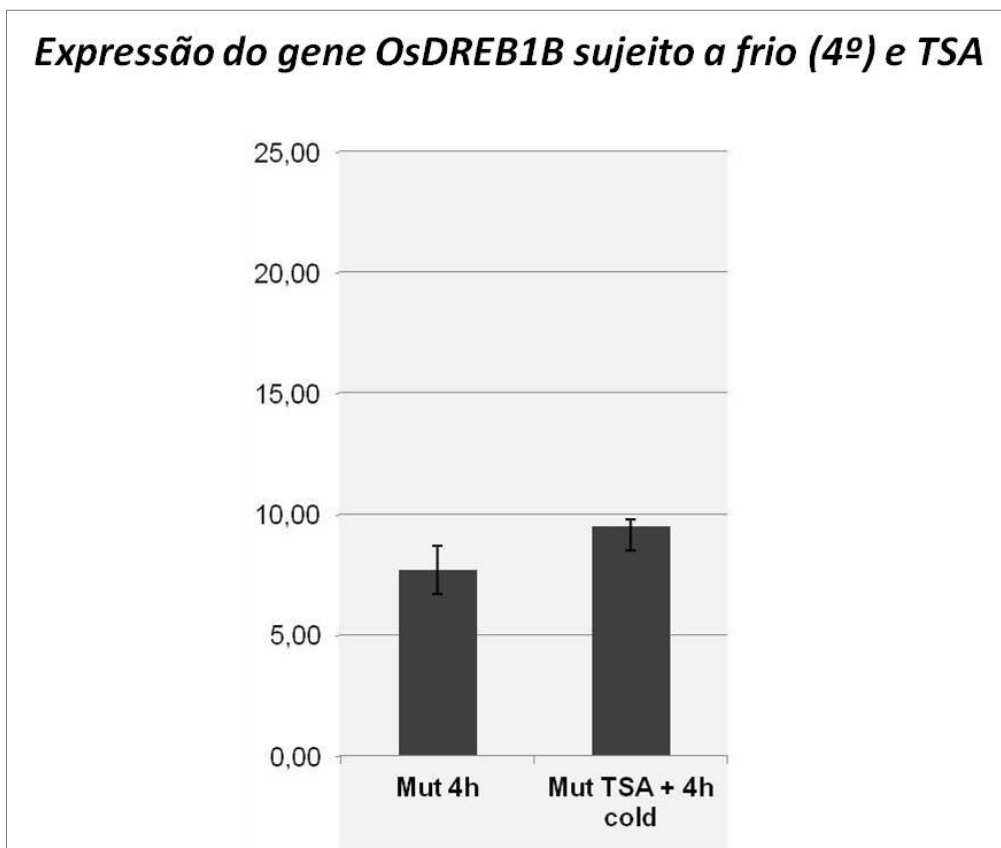


Figura IV.3: Níveis de expressão do gene específico de resposta ao frio, *OsDREB1B* em plantas sem enzima *OsHAC704* (Mut) com a adição da droga TSA.

Mut 4 h (plantas com exposição a 4°C durante 4 horas); Mut TSA + 4h, 4°C (plantas com administração de TSA durante 3 dias, e com exposição a 4°C durante 4 horas).

CAPITULO V

ANÁLISE E DISCUSSÃO

RESULTADOS

V. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

V.1. Análise e discussão dos resultados experimentais

De acordo com a literatura, plantas quando sujeitas à exposição de um fator que provoque *stress*, tais como o frio, calor, sal ou exposição a agentes químicos, a maioria dos genes diminuem os seus níveis de expressão. Ou seja, verifica-se uma diminuição dos níveis de acetilação das histonas contrariamente ao aumento dos níveis de metilação do ADN, duas marcas epigenéticas possíveis de ser observadas com técnicas de análise global como ensaios de imunohistoquímica (Santos *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2012).

Deste modo, a diminuição dos níveis de expressão do gene para a enzima *OsHAC704*, estão de acordo com o esperado. Ou seja, as plantas quando expostas ao *stress* do frio, verificou-se uma diminuição da expressão desta enzima, promovendo-se um silenciamento génico da grande maioria dos genes. Este fenómeno no caso das plantas é tolerável até um certo ponto de exposição a um fator de *stress*. No entanto, se o *stress* se prolongar, a sobrevivência da planta fica comprometida.

Também como era esperado, uma vez que é sabido pela literatura, o gene *OsDREB1B* obteve um aumento dos níveis de expressão em plantas quando sujeitas ao *stress* do frio, verificando-se um aumento acentuado, nos períodos de maior exposição ao fator provocador de *stress*. Sabe-se que este gene, para além de responder positivamente ao *stress* do frio, responde também positivamente ao *stress* da exposição excessiva da luz (Figueiredo *et al.*, 2013).

Os resultados que suscitaram alguma curiosidade, foi o caso de plantas mutantes para a enzima *OsHAC704*, revelarem não só uma resposta positiva de expressão para o gene específico *OsDREB1B* mas uma resposta positiva superior e bastante significativa principalmente no período de maior exposição ao fator de *stress* de frio.

De acordo com estes resultados, algo nos leva a supor que possam estar associados outros mecanismos epigenéticos que controlem a marca epigenética quando esta se encontra suprimida ou quando é inexistente. Do mesmo modo, a adição da droga promotora de acetilação (TSA), promoveu uma influência no aumento de níveis de expressão génicos superiores nas plantas mutantes.

Deste modo, de acordo com os resultados obtidos, a adição desta droga em particular pode ajudar a colmatar a falha da inexistência da histona em estudo.

Assim por forma a tentar perceber se a droga realmente ajudava na defesa contra os efeitos de *stress*, neste caso o frio, plantas mutantes (plantas sem a enzima *OsHAC704* foram submetidas ao *stress* do frio com a adição prévia da droga TSA. Os resultados obtidos revelaram que em plantas mutantes sem droga, e plantas mutantes com droga, apresentavam níveis de expressão para o gene específico de resposta ao frio, muito próximos.

Estudos complementares por Yong *et al.* 2011, realizados em plantas de milho sujeitas ao mesmo tipo de *stress* (frio, 4°C) e à mesma droga (TSA) mas com a análise debruçada sobre uma histona com papel contrário ao da acetilação – histona deacetilases, descrita por promover o silenciamento génico (HDAC), revelaram níveis elevados de expressão da histona HADC. E ainda que a adição da droga TSA, com exposição ao frio, promove uma diminuição da expressão do gene *OsDREB1B*.

Deste modo, a adição da droga TSA, demonstrou que ajudou a colmatar inexistências ou alterações de marcas epigenéticas. No entanto, no caso de exposição ao *stress* do frio, a sua adição não contribui de forma significativa para compensar os níveis de expressão de genes específicos como o *OsDREB1B*.

Neste sentido, outras drogas deverão ser analisadas com o propósito de promover a proteção das plantas a este fator de *stress*.

Com os resultados obtidos neste trabalho, pretende-se analisar posteriormente, se a exposição a este tipo de *stress* afetará ou não a sobrevivência e reprodução das linhagens futuras.

Sabe-se que a exposição a fatores de *stress* nos primeiros períodos de vida pode promover a alterações que se perdurem até o seu desenvolvimento em adulto e ainda passar a gerações futuras, não só em modelos vegetais, assim como em modelos animais como ratinhos e até em humanos (Szyf, 2013).

V.2. Análise e discussão de trabalhos desenvolvidos em Epigenética Forense

V.2.1. Contributos da Epigenética em âmbito médico-legal

V.2.1.1. Epigenética na Psicologia e Psiquiatria forense

Alguns trabalhos recentes mostram que o comportamento de um individuo pode ser o resultado da influência de fatores ambientais nos mecanismos epigenéticos dos seus progenitores. Deste modo, até que ponto podem os fatores ambientais condicionar epigenoma humano, interferindo no comportamento humano? Seremos nós o resultado de experiências vividas pelos nossos antepassados?

As primeiras suspeitas de que o comportamento pode ser o resultado de alterações epigenéticas resultantes da exposição a fatores externos, surgiram em 2004 por uma equipa de investigadores que se debruçaram sobre a análise do comportamento de crias de ratos fêmeas. O estudo conduzido por Moshe Szyf e seus colaboradores, consistiu no acompanhamento de dois grupos distintos de progenitoras, um grupo de progenitoras que cuidavam das crias, e outro grupo de crias que não recebia cuidados das progenitoras. Os resultados mostraram que os animais que receberam cuidados das progenitoras se tornaram adultos mais tranquilos comparativamente com as crias que não receberam cuidados das progenitoras durante os primeiros tempos de vida.

O que o grupo de Szyf observou foi que dependendo do cuidado maternal a sequência de ADN que regula a expressão do gene de RG (Recetor de Glicocorticóides) possui um padrão de metilação do ADN diferente. Quando as crias nascem, todas apresentam igual padrão de metilação, no entanto com os cuidados maternos recebidos das progenitoras, os níveis de metilação da sequência específica para o gene RG das crias diminuem, enquanto que crias que não recebem cuidados maternos mantêm o mesmo padrão e não desmetilam essa zona específica de ADN. Deste modo, a região codificante para o gene RG que atua no hipocampo, ao permanecer metilada, promove a condensação da cromatina e o gene é pouco expresso. Num estudo contínuo verificou-se ainda que as fêmeas dessa prole repetem o comportamento de suas progenitoras. O interessante desse estudo foi comprovar que essa herança não era genética porque ao colocarem crias de progenitoras cuidadas para serem cuidadas por progenitoras que cuidam pouco e vice-versa, as crias desenvolvem a metilação de acordo com sua progenitora de criação. Assim, conseguiram provar a influência do meio envolvente na resposta biológica comportamental,

neste caso que alteraram a regulação dos níveis de hormonas relacionadas com o *stress* na infância, condiciona o comportamento individual permanecendo posteriormente durante toda a vida adulta (Weaver *et al.*, 2004).

Para mostrar que essa lógica se aplicava também a humanos, a mesma equipa de neurocientistas conduziu outro estudo, a análise de cérebros de vítimas de suicídio. Por meio de históricos médicos e de entrevistas com familiares, foi possível identificar entre os suicidas, aqueles que tinham sofrido qualquer tipo de abuso severo durante a infância (verbal, sexual ou físico). Nessa investigação foi observado que do grupo que teve infância marcada por abusos, os genes que regulam os recetores de glicocorticoides estavam 40% menos ativos quando comparados com os dos genes de suicidas que não sofreram abuso e também quando comparados aos do grupo controle (pessoas que morreram por outras causas, como acidentes de carro). Os resultados deste estudo sugerem, portanto, que o abuso infantil condicionou a esses indivíduos a uma maior sensibilidade à exposição de stresses (McGowan *et al.*, 2009). Dentro da área de análise comportamental, outros estudos envolvendo eventos traumáticos têm sido conduzidos.

Rachel Yehuda, uma psiquiatra que acompanhava sobreviventes vítimas do Holocausto nazista, e notou que muitos dos filhos das vítimas, nascidos anos depois do fim da Segunda Guerra Mundial, apresentavam sintomas de stresse acima do comum, apesar de suas vidas não terem sido marcadas por qualquer evento traumático. Inicialmente, Yehuda pensou que “crescer ouvindo as histórias dos pais teria sido a causa desses estados depressivos” (“The Ghost in Your Genes” documentário da BBC, 2006). Porém ao ter conhecimento dos resultados das pesquisas efetuadas pelo grupo apresentado anteriormente, desenvolveu um estudo em parceria com a equipa de neurocientistas. A experiência de Yehuda, incidiu sobre a análise de dois grupos de ratos fêmeas gestantes, um grupo foi submetido a eventos causadores de *stress* e mal nutrição, durante o período de gestação e o outro seguiu sem qualquer evento de *stress*. Os resultados mostraram que as crias das progenitoras que tinham sido submetidas a eventos de *stress* durante a gestação apresentam respostas alteradas com estímulos violentos, ou seja, as crias ao se tornarem adultas eram mais ansiosas e agitadas do que as crias cujas progenitoras não foram sujeitas a qualquer tipo de *stress* na gestação. A experiência manteve em observação o acompanhamento de todas as crias fêmeas dos dois grupos, estas foram gestantes sem estarem sujeitas a qualquer tipo de *stress*, e o que se observou foi que crias, cujas progenitoras tinham sido geradas em ambiente de *stress*, em adultas apresentam igualmente o mesmo tipo de resposta alterada, agitação e ansiedade tal como as suas

progenitoras, mesmo não terem sido geradas em ambiente de stress. Este tipo de resposta, em organismos modelo animais, apontava uma explicação para o que se observava em filhos e netos de sobreviventes vítimas do Holocausto.

Yehuda em parceria com o grupo de investigação seguiram o estudo para humanos, 51 sobreviventes do Holocausto e 22 humanos sem qualquer tipo de evento traumático (controlo). Os resultados indicaram uma maior suscetibilidade a transtornos de humor, como ansiedade, depressão, entre outros distúrbios mentais. Segundo Yehuda, foram observadas mudanças comportamentais também na segunda e terceira geração de sobreviventes do Holocausto. Yehuda acompanhou ainda em filhos de mulheres que se encontravam grávidas durante o ataque às Torres Gêmeas e que foram evacuadas do prédio, observou alterações comportamentais como fortes estados de depressão e variações de humor (Yehuda *et al.*, 2006; Yehuda & Bierer, 2009; Yehuda *et al.*, 2009), Yehuda cita ainda evidências de que “o trauma e o *stress* podem afetar a saúde psicológica de um indivíduo alterando a componente genética que regula a química corporal” (Yehuda & Bierer, 2009).

No campo da psiquiatria, a epigenética pode promover importantes intervenções. Uma delas é a possibilidade de recorrer a biomarcadores que permitam identificar a população mais vulnerável a desenvolver depressões ou transtornos mentais, por forma a evitar eventos como o suicídio. A administração de drogas específicas capazes de reverter as alterações no padrão de expressão dos genes, é outra das possíveis aplicações, algo que já é feito na área de oncologia e começa a ser testado na área psiquiátrica. Inibidores de histonas deacetilase (HDACs) têm sido aplicadas em oncologia para travar a progressão tumoral, no entanto existem estudos a serem conduzidos tendo em vista a aplicação destes inibidores e outras drogas para o tratamento de doenças do sistema nervoso central, tais como as doenças neurodegenerativas e psiquiátricas, atraso mental, em parceria com a intervenção de terapias epigenéticas (Mund & Lyko, 2010; Best & Carey, 2010). Segundo Szyf “A grande revolução surgirá quando aprendermos como nos comportar para atingir o mesmo efeito que as drogas são capazes de promover. Descobrir como intervir no sistema nervoso central de forma que se possa reverter adaptações epigenéticas adversas ao comportamento” (McGowan & Szyf, 2010).

V.2.1.2. Epigenética na autenticação de amostras de ADN humano

Nos últimos 20 anos, as análises sobre o ADN revolucionaram as ciências forenses auxiliando a justiça. Atualmente a presença de um perfil genético pode ser a chave para a inocência ou culpabilidade nos mais diversos tipos de crime alvos de uma investigação criminal. Contudo, possibilidades perturbantes de que, vestígios podem conter falso ADN têm sido negligenciadas (Frumkin *et al.*, 2010).

Recorrendo a técnicas moleculares com protocolos bem estabelecidos, como a amplificação de ADN por PCR, clonagem molecular, e a amplificação total do genoma, aliado a conhecimentos especializados e equipamento adequado, podem conseguir criar um perfil genético falso para que este seja implantado em cenários de crime (Lasken *et al.*, 2003; Frumkin *et al.*, 2010).

O ADN falso pode ser implantado em superfícies de objetos ou incorporado em amostras biológicas de diferentes tecidos humanos verdadeiras, como sangue e saliva. E deste modo, as técnicas convencionais de determinação de perfis genéticos pela análise de marcadores moleculares em genética forense não conseguiram distinguir o ADN real de ADN falso.

Perante estas possibilidades de implantação de falsas amostras, um estudo conduzido por Frumkin, pretende através das marcas epigenéticas criar um método de análise fiável e possível de ser aplicado para distinguir ADN natural de ADN artificial, tal como metodologias que permitem atualmente distinguir ADN humano de ADN animal, através de análises bioquímicas e genéticas.

O estudo de Frumkin e seus colaboradores baseou-se na análise diferencial de padrões de metilação de ADN. Para perceber as diferenças nos padrões de metilação de ADN, Frumkin começou por sintetizar perfis genéticos *in vitro* por três métodos diferentes, amplificação de ADN por PCR, clonagem molecular, e a amplificação total do genoma, criando genomas falsos.

Para analisar os diferentes níveis de metilação foram analisadas os perfis genéticos falsos e ainda perfis genéticos de um grupo de voluntários a partir de amostras de sangue, saliva e vestígios biológicos implantados em superfícies.

Os resultados obtidos, revelaram que os perfis sintetizados *in vitro*, não possuíam nenhum padrão de metilação nos seus ADNs. Por outro lado, os perfis genéticos do grupo

de voluntários, todos possuíam regiões genómicas não metiladas e regiões genómicas metiladas.

Foram analisados diferentes *loci* no genoma, por forma a seleccionar os *loci* mais indicados, para o reconhecimento de ADN artificial proposto por Frumkin. Selecionaram dois conjuntos contendo cada um dois *loci*, regiões sempre metiladas *loci* NT18 e *loci* ADD6, e regiões nunca metiladas, *loci* MS53 e *loci* SW14 (Frumkin *et al.*, 2010).

Deste modo, nos casos em que se suspeite de presença de ADN artificial, o método apresentado por Frumkin poderá ser aplicado. A autenticação de amostras de ADN, poderá ser um dos contributos a partir da análise de marcas epigenéticas, como os padrões de metilação do ADN.

V.2.1.3. Epigenética na determinação da origem parental de alelos

Em testes de paternidade, especialmente em casos de órfãos de mãe, o alelo herdado do pai, muitas vezes não se consegue determinar. Nestes casos, a determinação da paternidade por exclusão de probabilidade recorrendo aos marcadores genéticos é consideravelmente reduzida (Lee *et al.*, 2000).

Casos de incesto, em que o pretense pai, pode ser o progenitor da mãe (avô), ou um irmão da mãe (tio), também são difíceis de determinar através dos marcadores de genética molecular.

Deste modo, com vista a resolução destes casos particulares, mas não menos comuns, um grupo de investigadores desenvolveu uma nova técnica, através da qual a origem dos alelos parentais pode ser determinada (Ohno *et al.*, 1982; Mayr, 1983; Zhao *et al.*, 2005).

Zhao e seus colaboradores, seleccionaram um *imprinting* SNP, para o *locus* rs220028 (A/G), que de acordo com a sua herança (paterna ou materna) apresenta um polimorfismo diferente. Foram ainda estudados padrões de metilação paternos e maternos. Este estudo foi realizado em 18 crianças com o genótipo heterozigótico. Os seus resultados revelaram uma fiabilidade utilizando regiões específicas na análise de padrões de metilação de ADN (Zhao *et al.*, 2005).

Após este estudo pioneiro, outros trabalhos se seguiram reconhecendo e identificando outras regiões onde se verifica o fenômeno de *Imprinting*. Métodos de detecção como o tratamento de bissulfito seguido de sequenciação e técnicas de análise de elevada resolução como PCR em Tempo Real, têm sido as escolhidas nestas investigações. Deste modo, foram reconhecidos alelos específicos de acordo com a origem parental, o gene H19 para determinação materna, e os genes HYMA1, SNRPN, PEG3 para determinação paterna (Zhao *et al.*, 2005; Naito *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008; Nakayashiki *et al.*, 2009 a) Nakayashiki *et al.*, 2009 b).

Como conclusão estes estudos revelam, que a determinação parental recorrendo a diferentes polimorfismos analisados em genes que sofrem *imprinting*, será uma ferramenta altamente promissora na resolução de casos de filiação (Naito *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2008; Nakayashiki *et al.*, 2008; Nakayashiki *et al.*, 2009) podendo ainda ser aplicado em outros casos em que a determinação de uma identidade se encontra comprometida.

V.2.1.4. Epigenética no reconhecimento de fluidos corporais

Uma das áreas de interesse no decorrer de uma investigação criminal é a reconstrução dos eventos num cenário de crime. A presença de tipos específicos de amostras biológicas, como fluídos corporais contendo sémen, são característicos e muitas vezes associados a um tipo específico de crimes, como os crimes sexuais.

Naturalmente, não basta a observação de vestígios biológicos para afirmar qual o tipo específico de tecido ou fluído. A análise de vestígios biológicos é feita em perícias de biologia e genética forense. Em primeiro lugar é necessário perceber qual a origem da amostra, ou seja se são provenientes de material biológico humano ou animal. Depois de se comprovar e validar com o grau máximo de certeza a origem biológica do vestígio, seguem as análises que permitem reconhecer o tipo de tecido ou fluído. Existem metodologias bioquímicas que permitem identificar a origem e o tipo de amostra biológica, porém são metodologias analíticas qualitativas passíveis de erros e que necessitam sempre de uma comprovação por análise laboratorial. Também existem algumas metodologias que conseguem recuperar o ADN após procedimentos de lavagem que removem os produtos aplicados em metodologias qualitativas. Mesmo assim, o material biológico que sobra é muito reduzido e por vezes não se consegue fazer qualquer análise.

Ou seja, em muitos casos não se consegue realizar os exames complementares suficientes para a atribuição de uma identificação devido à reduzida quantidade do vestígio biológico e ainda porque por vezes se compromete o vestígio biológico com análises qualitativas iniciais.

Face a estas dificuldades, vários grupos de investigação têm se debruçado para conseguir otimizar procedimentos que permitam através de uma única análise identificar o tipo de tecido ou fluído corporal e o perfil genético para a atribuição de uma identidade. Conseguir este tipo de análise num único ensaio será extremamente vantajoso para as investigações, isto porque permitiria resolver muitos casos atuais e ainda casos arquivados.

Neste sentido, alguns estudos têm sido conduzidos, porém a otimização para reconhecer o tipo de tecido celular com um grau de certeza elevado tem sido a maior das dificuldades.

O grupo de Frumkin e seus colaboradores, foi um dos primeiros grupos que começou por explorar os diferentes padrões de metilação do ADN em amostras biológicas de diferentes tecidos (sangue, saliva, sémen, pele, urina, fluído menstrual e secreções vaginais). A metodologia apresentada, partiu da análise reduzida de amostras de ADN dos diferentes tipos de fluídos, a partir de apenas 1ng. O grupo selecionou 205 regiões de ilhas CpG e 38 *loci* que mostravam diferenças significativas nos padrões de metilação. Neste estudo, os autores sugerem ainda que o tamanho do *locus* pode influenciar o padrão de metilação. No entanto, alguns fatores podem influenciar a análise dos resultados, tais como, a concentração de análise do ADN, ou efeitos estocásticos dos próprios equipamentos e/ou metodologia. Assim, os resultados obtidos são apresentados em valores de *ratios* de níveis de metilação do ADN (Frumkin *et al.*, 2011), ou seja, é necessário otimizar esta metodologia antes que possa ser aplicada.

Apesar de não fiável a metodologia apresentada por Frumkin, serviu de base para outros estudos que se seguiram.

Gomes e seus colaboradores reproduziram os trabalhos de Frumkin, mas focando-se em apenas dois *loci*. O objetivo para conseguir um padrão de metilação específico para identificação não foi conseguido, uma vez que descobriram o mesmo padrão de metilação do ADN para dois tecidos diferentes, pele e saliva. Ou seja este grupo identificou que existem padrões de metilação comuns a diferentes tecidos (Gomes *et al.*, 2011).

Porém, os esforços para conseguir distinguir tecidos e fluídos corporais não foram reduzidos. Seguindo as metodologias de Frumkin, Wasserstrom e seus colaboradores, conseguiram desenvolver um procedimento, *Nucleix DSI-Semen kit*, capaz de distinguir com um elevado grau de certeza fluído de sémen dos restantes fluídos. Este procedimento, consegue reconhecer 5 *loci* e ainda outros 3 *loci* que servem de controlo. Wasserstrom e seus colaboradores, têm a intenção que este procedimento possa vir a substituir a análise por microscópia, que inviabiliza a análise posterior do ADN, e assim conseguir também obter um perfil genético (Wasserstrom *et al.*, 2013).

Um outro avanço, foi conseguido pelo grupo de Lee *et al.*, 2012, que se debruçou sobre a análise de várias metodologias, desde análise de expressão de genes específicos por PCR em Tempo Real, análise de padrões de metilação de ADN por tratamento de bissulfito seguido de sequenciação e análise de padrão de proteínas específicas. Lee que também desenvolveu estudos na área da estimativa da idade através da análise de marcas epigenéticas, decidiu analisar não apenas regiões de ilhas CpG selecionadas por Frumkin, mas sim genes com padrões de metilação reconhecidos de tecidos específicos, como sangue, sémen, saliva, sangue menstrual e fluidos vaginais. Assim, Lee e sua equipa conseguiram identificar três regiões específicas com padrão de metilação para sémen (DACT1, USP49, PRMT2), um marcador não metilado (HOXA4) que permite exclusão de sangue dos outros fluídos, E ainda um marcador com potencial aplicabilidade para reconhecer fluidos vaginais (PFN3).

Trabalhos recentes, que estão a ser desenvolvidos por Madi e seus colaboradores desde 2012, este grupo pretende desenvolver marcadores para identificação de fluidos típicos de agressões sexuais. Madi e seus colaboradores estão a seguir o tratamento de bissulfito seguido de uma nova técnica de sequenciação, o pirosequenciaç. Este grupo em vez de ter analisar as regiões de ilhas CpG indicadas por Wasserstrom, estão a analisar *loci* específicos de diferentes tecidos (sangue, saliva, sémen, sangue menstrual e secreções vaginais) com o propósito de identificar padrões específicos de metilação de ADN. Conseguiram até ao momento, reconhecer quatro *loci* específicos, sendo que um deles era descrito inicialmente como um *loci* específico para sémen revelando-se ser para saliva. Assim, os quatro *loci* específicos reconhecidos por este grupo até ao momento são: C2Oorf17 – *loci* para o sangue; ZC3H12D e FGF7 – *loci* para o esperma e BCAS4 – *loci* para a saliva (Madi *et al.*, 2012).

V.2.1.5. Prevendo a idade por meio da Epigenética

Estimar a idade humana no momento da morte, é uma tarefa difícil, mas de enorme importância no decorrer de uma investigação. A antropologia forense e a odontologia forense, são duas ciências que possuem metodologias que permitem estimar a idade de um indivíduo, através da análise de restos cadavéricos como ossos e dentes respectivamente. A análise de parâmetros antropológicos, como estudo dos ossos do crânio e dos ossos longos, têm sido um dos métodos mais utilizados (Rissech, 2006; Thompson & Black, 2007). A Epigenética, é uma das ciências que pode ajudar a contribuir para a determinação da idade, analisando a alteração de marcas epigenéticas associadas ao processo de envelhecimento.

O envelhecimento afeta as funções fisiológicas e pode ser definido como a acumulação de danos nas moléculas, células e tecidos durante o ciclo de vida. A identificação de fatores que regulam o envelhecimento é limitada pela complexidade do processo e pela considerável heterogeneidade entre indivíduos e ainda pela diversidade existente entre tecidos de um mesmo corpo. No entanto, uma das naturais consequências do envelhecimento, é a acumulação gradual de danos no ADN e alterações epigenéticas que afetam a expressão gênica correta, conduzindo a alterações no funcionamento da regulação celular (Rodriguez-Rodero *et al.*, 2011).

No contexto de determinar a idade por meio de mecanismos epigenéticos, os gêmeos monozigóticos são o modelo ideal para estudar mudanças no padrão de metilação do ADN que ocorrem com o avançar da idade (Bocklandt *et al.*, 2011). Desde o momento do nascimento, que gêmeos monozigóticos possuem padrões de metilação de ADN quase idênticos. No entanto, apesar de certas mudanças de metilação no ADN serem geneticamente controladas, a exposição a diferentes fatores ambientais pode promover a formação de novos e diferentes padrões de metilação.

Vários estudos têm sido conduzidos para estimar a idade a partir de diferenças epigenéticas encontradas em gêmeos monozigóticos (Bocklandt *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Sahin *et al.*, 2011). Em 2011, dois importantes artigos foram publicados, evidenciando resultados positivos a partir de amostras biológicas humanas, como o sangue e a saliva, para determinar a idade celular a partir da análise da alteração de marcas epigenéticas, tais como a modificação de padrões de metilação do ADN.

O primeiro artigo, mostrou que os padrões da metilação do ADN se alteram com o avançar da idade e que estão associados a doenças relacionadas com idade, como doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Bocklandt *et al.*, 2011). Bocklandt e seus colaboradores, identificaram 88 regiões dentro ou próximas de 80 genes nos quais o grau de metilação de citosina foi significativamente correlacionado com a idade. Para a realização deste estudo, o grupo de investigação utilizou amostras de saliva de 34 pares de gémeos monozigóticos homens entre 21 e 55 anos de idade. Além disso, eles validaram regiões promotoras de três genes e repetiram os ensaios experimentais em amostras da população geral para servirem de controlos, 31 homens (controlo masculino) e 29 mulheres (controlo feminino) com idades compreendidas entre 18 e 70 anos. Os padrões de metilação das três regiões promotoras dos genes EDARADD, NPTX2 e TOM1L1, foram considerados estáveis com o avançar da idade, num intervalo de tempo de cinco décadas. Usando apenas duas citosinas encontradas neste *loci*, Bocklandt e seus colaboradores construíram um modelo de regressão que explicou 73% da variação na idade, e foram ainda capazes de prever a idade de um indivíduo com uma precisão média de 5,2 anos (Figura V.1).

Deste modo, segundo este estudo, o padrão de metilação das três regiões promotoras dos genes assinalados, pode ser utilizado em forense como uma ferramenta de auxílio na determinação da idade de uma pessoa, a partir de amostras biológicas isoladas como a saliva (Bocklandt *et al.*, 2011).

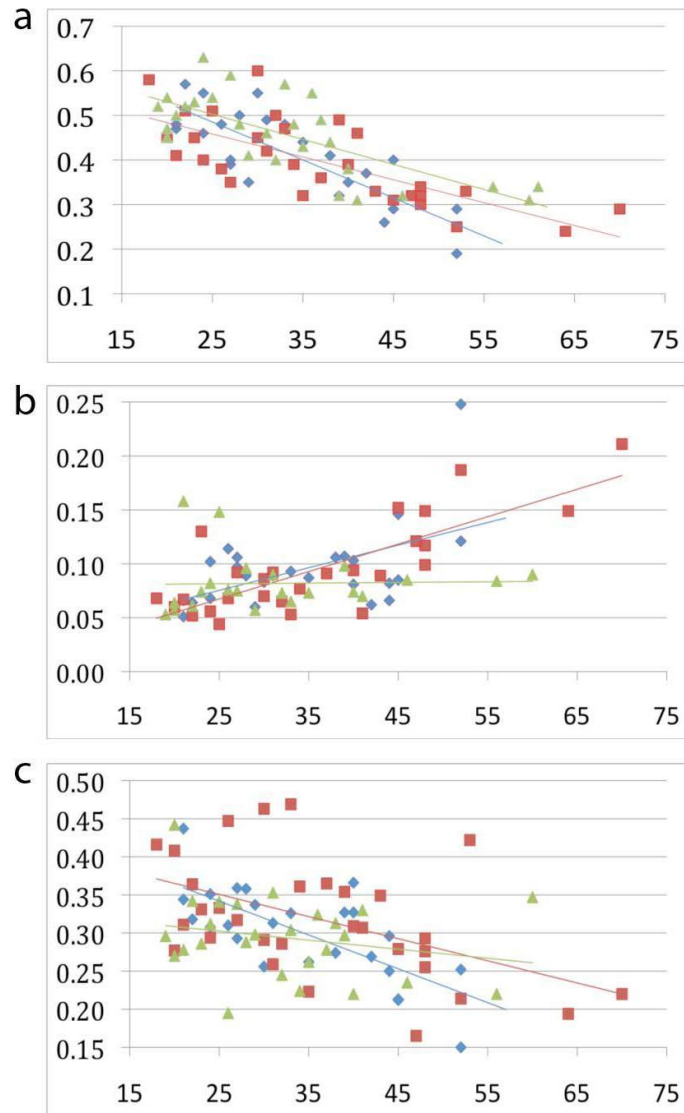


Figura V.1: Percentagem de metilação de ADN em três regiões promotoras dos genes dos EDARADD, NPTX2 e TOM1L1, a partir de amostras de saliva de gémeos monozigóticos versus a idade, figura apresentada no trabalho de Bocklandt *et al.*, 2011.

Gêmeos monozigóticos, identificados a azul; controlo masculino identificado a vermelho e controlo feminino identificado a verde. As linhas de tendência linear estão indicadas com as cores das amostras correspondentes. a) DARADD $r = -0,81$ (gémeos), $r = -0,73$ (controlo masculino), $r = -0,75$ (controlo feminino); b) NPTX2 $r = 0,52$ (gémeos), $r = 0,79$ (controlo masculino), $r = 0,03$ (controlo do feminino); c) TOM1L1 $r = -0,70$ (gémeos), $r = -0,49$ (controlo masculino), $r = -0,24$ (controlo feminino).

Em 2011, Koch & Wagner, publicaram outro artigo com interesse forense para estimar a idade. O propósito deste trabalho de investigação consistiu em determinar a idade a partir da análise de padrões de metilação de ADN, provenientes de amostras de diferentes tecidos celulares. Os perfis de metilação analisados provieram de uma base de dados pública por meio da plataforma HumanMethylation27 BeadChip, representando cerca de 27.578 regiões de CpG.

Koch & Wagner, construíram um modelo denominado de Pavlidis. Este modelo permitiu identificar 19 regiões de CpG que se caracterizam por estarem continuamente hipermetiladas com o avançar da idade. As regiões CpG identificadas, estão associadas aos genes NPTX2, TRIM58 e GRIA2 e KCNQ1DN; e ainda a uma região adicional CpG hipometilada (BIRC4BP).

Com base nesta marca epigenética, foram avaliados os perfis de metilação de ADN de cinco conjuntos celulares distintos. Células da pele: derme e epiderme; células de esfregaço cervical, células-T e monócitos. Em geral, as cinco regiões CpG revelaram mudanças na metilação do ADN associadas à idade em todos os tecidos (Figura V.2). A diferença média absoluta entre as idades previstas foi cerca de 11 anos.

Deste modo, o modelo Pavlidis, proposto por Koch & Wagner, usado para identificar regiões CpG que apresentassem alterações mais significativas associadas à idade, pretende se transformar num método de investigação forense, capaz de prever a idade do doador a partir de diversas amostras biológicas.

Reference ID	Gene	Age-associated R-values					
		all samples of training group	dermis	epidermis	cervical smear	CD14 ⁺ monocytes	CD4 ⁺ T-cells
cg06572160	KCNC3	0.70	0.73	0.87	0.24	0.41	0.50
cg07533148	TRIM58	0.69	0.68	0.76	0.35	0.38	0.52
cg20616414	WNK2	0.67	0.66	0.87	0.31	0.32	0.33
cg17861230	PDE4C	0.67	0.92	0.91	0.42	0.38	0.22
cg25302419	CTNND2	0.67	0.65	0.68	0.33	0.59	0.55
cg25802093	SPAG6	0.64	0.63	0.82	0.34	0.31	0.72
cg06458239	ZNF549	0.63	0.88	0.85	0.15	-0.13	0.45
cg27009703	HOXA9	0.63	0.66	0.90	0.29	0.30	0.56
cg02844545	GCM2	0.63	0.75	0.77	0.35	0.66	0.47
cg01683883	CMTM2	0.63	0.83	0.80	0.17	-0.18	0.21
cg01530101	KCNQ1DN	0.63	0.91	0.67	0.16	0.33	0.45
cg12799895	NPTX2	0.62	0.78	0.75	0.04	0.46	0.35
cg21907579	TBX5	0.62	0.74	0.73	0.25	0.21	0.35
cg00107187	FLJ42486	0.62	0.89	0.65	0.25	0.45	0.44
cg16313343	BRF1	0.62	0.79	0.74	0.17	-0.12	0.25
cg25148589	GRIA2	0.62	0.90	0.91	0.52	0.25	0.34
cg23290344	NEF3	0.61	0.68	0.71	0.26	0.44	0.52
cg02681442	FOXG1B	0.60	0.68	0.79	0.08	0.35	0.41
cg03158400	FAM3B	0.60	0.71	0.70	0.37	0.13	0.66
cg23571857	BIRC4BP	-0.45*	-0.66	-0.84	-0.18	-0.11	-0.40

Figura V.2: Regiões de CpG com as mudanças mais significativas associadas à idade. Tabela apresentada no trabalho de Koch & Wagner, 2011.

Regiões de 19 ilhas CpG revelaram hipermetilação com um coeficiente de correlação R de Pearson > 0,6 em todas as amostras dos conjuntos de análise. Correlações significativas associadas à idade também foram observadas na maioria dos dados individuais. As regiões CpG, da assinatura epigenética da idade, estão indicadas a cor cinza. *Uma região CpG hipometilada adicional (cg23571857) foi incluída no modelo de Koch & Wagner.

V.2.1.6. Epigenética na identificação de gêmeos monozigóticos

Gêmeos monozigóticos compartilham o mesmo genótipo, no entanto com o avanço da idade várias são as diferenças fenotípicas visíveis, assim como a existência de diferentes suscetibilidades para doenças.

Algumas explicações têm sido apontadas nos últimos anos, em diversos estudos decorridos, nomeadamente variações nas sequências de ADN, que não foram reparadas e que passaram após o ciclo celular meiótico; repetições de segmentos da sequência de ADN e ainda a existência de diferenças epigenéticas (Fraga *et al.*, 2005). Dos vários estudos publicados com o propósito de atribuir uma distinção entre gêmeos monozigóticos, destacam-se quatro trabalhos de investigação.

Um dos primeiros estudos sobre mecanismos epigenéticos em gêmeos monozigóticos examinou as diferenças globais na metilação do ADN e na acetilação das histonas de um grupo voluntário de gêmeos monozigóticos em amostras de células de linfócitos (Fraga *et al.*, 2005). Fraga e seus colaboradores descobriram que, apesar de os gêmeos serem epigeneticamente indistinguíveis durante os primeiros anos de vida, gêmeos monozigóticos mais velhos apresentaram diferenças marcantes no padrão geral de metilação de ADN, nomeadamente na distribuição genómica da citosina metilada e na acetilação de histonas, afetando os seus perfis de expressão génica dos gêmeos (Figura V.3 e Figura V.4).

A descoberta destes achados revelou uma lacuna em relação aos conceitos da epigenética sobre a compreensão de como diferentes fenótipos podem ser originados a partir do mesmo genótipo. Essas diferenças de perfis epigenéticos encontrados em gêmeos monozigóticos podem ser explicadas pela influência de fatores externos e internos. O hábito de fumar, atividade física, dieta, são fatores externos que podem influenciar as modificações epigenéticas (Fraga *et al.*, 2005).

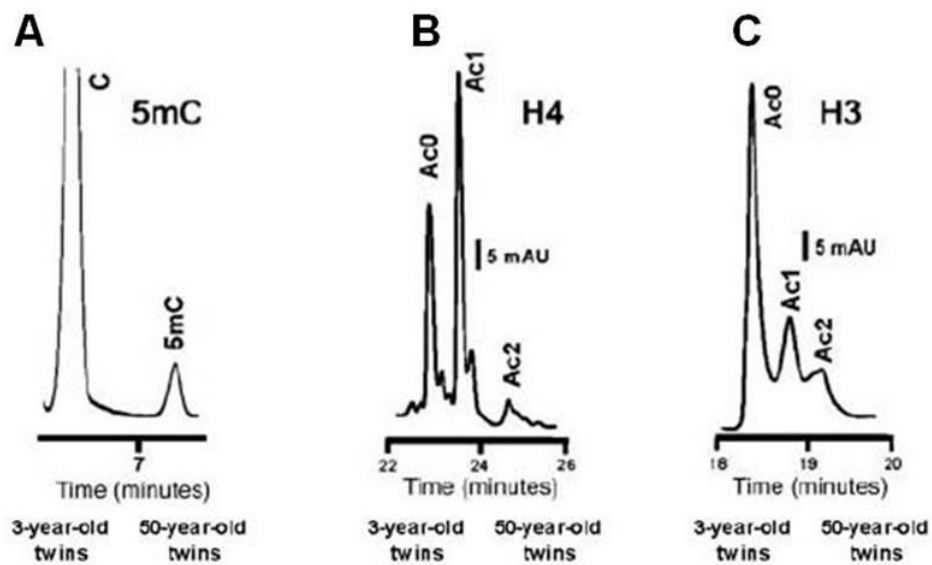


Figura V.3: Quantificação do conteúdo total das marcas epigenéticas entre os irmãos de cada par de gémeos monozigóticos com idades compreendidas entre os 3 e 50 anos, imagem presente no trabalho de Fraga *et al.*, 2005.

Nível de metilação do ADN (A); níveis de acetilação das histonas H4 (B); e níveis de acetilação da histona H3 (C) por HPLC e eletroforese capilar de alta performance.

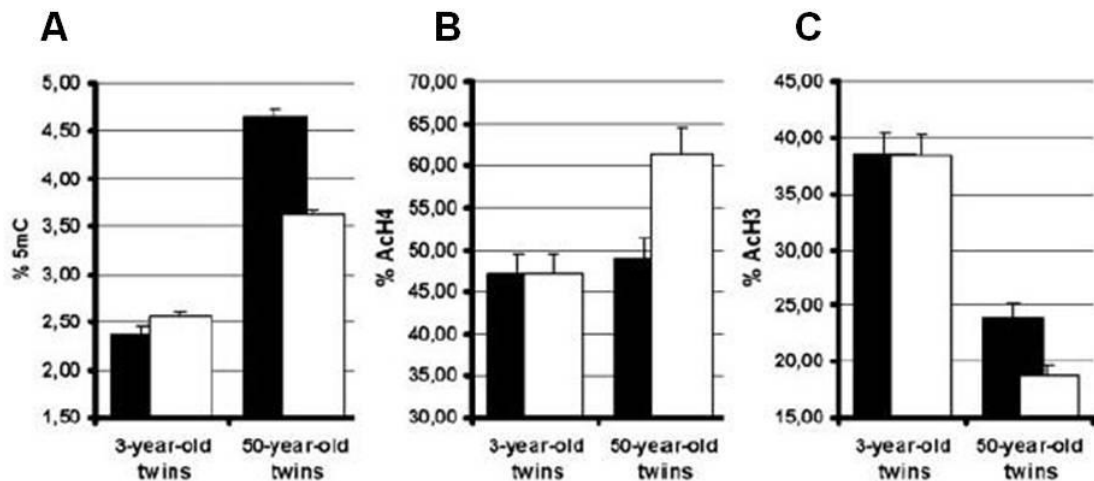


Figura V.4: Comparação dos valores epigenéticos entre os irmãos de cada par de gémeos monozigóticos com idades compreendidas entre os 3 e 50 anos, imagem presente no trabalho de Fraga *et al.*, 2005.

Metilação do ADN (A); acetilação das histonas H3 (B); acetilação das histonas H4 (C).

Em 2010, outro estudo de um grupo de investigadores conduzidos por Wong, debruçou-se sobre a quantificação dos níveis de metilação em regiões específicas do genoma, nomeadamente nas regiões promotoras do gene recetor de dopamina 4 (DRD4), o gene transportador de serotonina (SLC6A4/SERT) e o gene ligado ao X da monoamina oxidase A (MAOA). As experiências conduzidas utilizaram amostras de ADN de 46 pares de gémeos monozigóticos e 45 pares de gémeos dizigóticos, com idades compreendidas entre os 5 e 10 anos. Os resultados obtidos, revelaram diferenças no padrão de metilação do ADN, na infância mesmo entre os gémeos monozigóticos, e ainda que as diferenças individuais no padrão de metilação do ADN, não é estável ao longo do tempo (Figura V.5).

O estudo do autor sugere ainda que as influências ambientais são fatores importantes na contribuição das diferenças dos padrões de metilação interindividual do ADN, e que essas influências não afetam o genoma (Wong *et al.*, 2010).

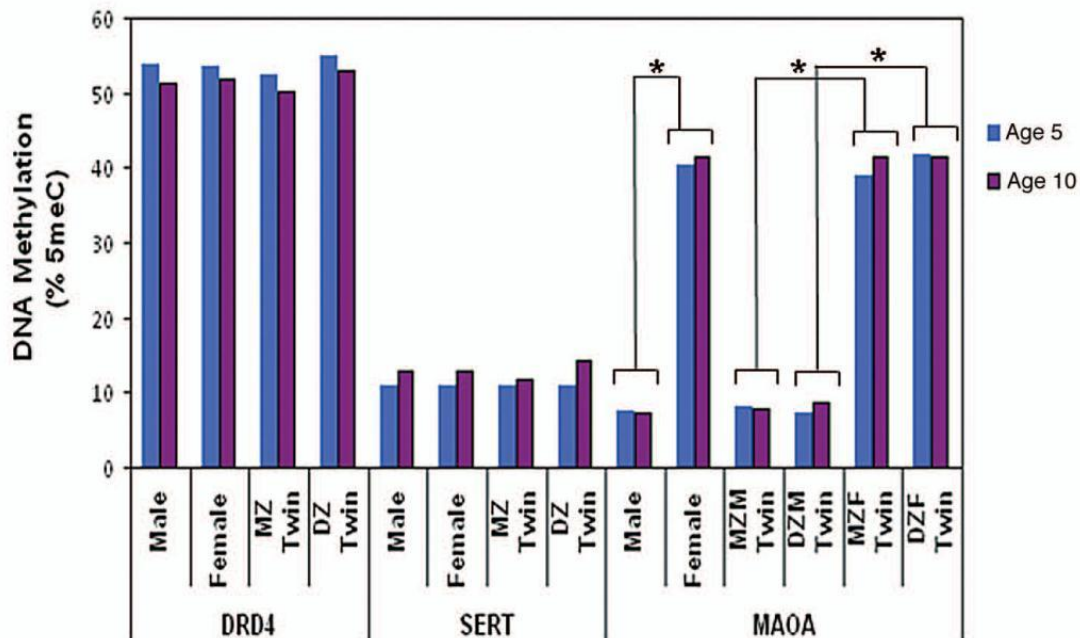


Figura V.5: Nível médio do padrão de metilação do ADN nas regiões promotoras dos genes DRD4, SERT e MAOA em idades compreendidas entre os 5 e os 10 anos, imagem do trabalho de Wong *et al.*, 2010.

Gémeos monozigóticos (MZ); gémeos dizigóticos (DZ); gémeos monozigóticos do sexo masculino (MZM); gémeos monozigóticos femininos (MZF); gémeos dizigóticos do sexo masculino (DZM); e gémeos dizigóticos do sexo feminino (DZF).

Recentemente, em 2011, foram apresentados dois novos estudos em gémeos monozigóticos na continuação dos estudos anteriores.

Li e seus colaboradores, apresentaram um estudo realizado com um grupo de 22 pares de gémeos monozigóticos adultos. Tal como os outros grupos de investigação, Li analisou o padrão de metilação de ADN, utilizando a técnica do tratamento com bissulfito. 27,000 ilhas CpG foram analisadas, e os resultados revelaram diferenças notáveis no padrão de metilação da citosina nos genomas dos gémeos monozigóticos. Deste, Li decidiu eleger de acordo com critérios de seleção, um conjunto de 377 locais de ilhas CpG, por serem as regiões que apresentam diferenças significativas nos padrões de metilação, apesar de os estudos revelarem apenas uma estabilidade parcial nos padrões de metilação de ADN. Os resultados iniciais deste estudo sugerem fortemente que a metilação em ilhas CpG pode ser um biomarcador para distinguir gémeos monozigóticos (Li *et al.*, 2011).

Ainda em 2011, um outro estudo foi apresentado, com o objetivo de analisar a variação e herdabilidade dos padrões de metilação do ADN (Gervin *et al.*, 2011). Uma vez mais o tratamento com bissulfito, seguido de sequenciação foi o método selecionado, e o estudo debruçou-se sobre a análise de 1,760 ilhas CpG em 186 regiões codificantes do complexo de *major* de histocompatibilidade humana (MHC) em linfócitos de 49 pares de gémeos monozigóticos e 40 pares de gémeos dizigóticos. Os resultados mostraram que indivíduos apresentam grandes variações no padrão de metilação do ADN, tanto entre genes e assim como dentro das regiões codificantes do complexo MHC. Além disso, muitas regiões revelaram um padrão de metilação complexo e variável (Gervin *et al.*, 2011).

As análises revelaram menores diferenças entre pares de gémeos monozigóticos do que entre os pares de gémeos dizigóticos, sugerindo algumas influências genéticas sobre a variação do padrão de metilação do ADN, sendo que a maior parte da variância encontrada foi atribuída a fatores não genéticos. Deste modo, o estudo conclui que em geral, as estimativas de herança de metilação do ADN são reduzidas (Gervin *et al.*, 2011).

CAPITULO VI

CONSIDERAÇÕES FINAIS

VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desafios e considerações práticas sobre a aplicação forense de marcadores e metodologias epigenéticas

A análise de ADN para fins forenses no processo de atribuição de uma identidade é o procedimento considerado ideal por excelência, não só devido às características particulares do ADN como também devido à estabilidade da própria molécula.

A utilização de marcadores epigenéticos em parceria com os marcadores moleculares genéticos existentes poderá ser consideravelmente útil em diversos estudos de investigação forense, tal como referido em diversos trabalhos desenvolvidos nos últimos dez anos.

As aplicações de marcadores epigenéticos na medicina legal são imensas, nomeadamente no auxílio de identificações, em casos de paternidade complicados como incestos ou situações de órfãos, em casos de identificação biológica a partir de vestígios mínimos, identificação de características físicas como a idade, recriação de eventos de um cenário de crime a partir do reconhecimento do tipo de vestígios biológicos, diferenciação de perfis de identificação para gémeos monozigóticos, entre tantas outras possíveis aplicações que possam contribuir para ajudar a constituir um perfil capaz de ser identificado.

São várias as técnicas que servem para validar resultados, no entanto na sua maioria estas metodologias ainda necessitam de quantidades consideráveis de amostra biológica para que se possa fazer uma análise. Felizmente, existirem já avanços no sentido de reduzir a quantidade inicial de amostra, tal como a técnica de análise de padrões de metilação de ADN por tratamento de bissulfito seguido de pirosequenciação.

Para além da consideração das técnicas a aplicar, também devem ser selecionados com muita cautela os marcadores epigenéticos a serem utilizados. Análise de padrões epigenéticos em: histonas controladoras de expressão génica; regiões de ilhas CpG; genes e *loci* específicos para tecidos específicos devem estar reconhecidos como sempre metilados ou nunca metilados, para que se possa construir um padrão epigenético com aplicação fiável.

Com base na literatura, nos trabalhos apresentados e ainda com base nos resultados experimentais obtidos, fatores ambientais podem modificar esses padrões de marcas epigenéticas. Por isso, devido à influência do ambiente externo, e às próprias influências internas como o avançar da idade, a seleção dos marcadores utilizados deve ser testada

não só por várias metodologias, como em vários tecidos em diferentes estágios de idade, por forma a assegurar a sua validade e estabilidade, tal como alguns autores tem tentado demonstrar.

Outra característica importante é a herança epigenética ou também denominada de memória epigenética. Reconhecendo quais os mecanismos envolvidos e quais as regiões de metilação identificadas como marcadores epigenéticos, doenças do foro neurológico e psiquiátrico poderão ser atenuadas. Tal como referenciado por alguns autores e como demonstraram os ensaios experimentais realizados neste trabalho, inseridos no âmbito de dissertação do Mestrado em Medicina Legal, a adição de substâncias específicas pode atenuar ou até mesmo superar falhas em mecanismos de regulação. Mecanismos esses que podem comprometer a saúde e sobrevivência de um individuo como também dos seus descendentes.

Deste modo, não devem ser descartados as descobertas e os avanços realizados até ao momento, pois todos revelam uma diversidade de possíveis aplicações e contributos em diversas áreas, desde a medicina, psicologia, psiquiatria, nutrição, genética, entre outras ciências incluindo a medicina legal.

Continuam ainda por esclarecer diversas questões em investigações criminais. Por isso com a ajuda de avanços na otimização de metodologias e seleção de marcadores específicos, a Epigenética num futuro não muito distante, fará parte do vasto conjunto de ciências forenses que auxiliam investigações no âmbito da medicina legal.

CAPITULO VII

REFERÊNCIAS

VII. REFERÊNCIAS

Allis, C. D., Jenuwein, T., and Reinberg, D.(2007) Epigenetics. ISBN New York 13:978-0-87969-724-2.

Amorim, A., and Pereira, L. (2005). Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic Sci Int.* 150:17-21.

Andrew J. Pakstis, Rixun Fang, Manohar R. Furtado, Judith R. Kidd, Kenneth K. Kidd, (2012) Mini-haplotypes as lineage informative SNPs (LISNPs) and ancestry inference SNPs (AISNPs). *European Journal of Human Genetics.* 20:1148-1154.

Bell, J. T., and Spector, T. D. (2011) A twin approach to unraveling epigenetics. *Trends Genet,* v. 27, n. 3:116-25.

Best, J. D., and Carey, N. (2010). Epigenetic therapies for non-oncology indications. *Drug Discovery Today,* 15:1008-1014.

Biesecker, L.G., Bailey-Wilson, J.E., Ballantyne, J., Baum, H., Bieber, F.R., Brenner, C., Budowle, B., Butler, J.M., Carmody, G., Conneally, P.M., Duceman, B., Eisenberg, A., Forman, L., Kidd, K.K., Leclair, B., Niezgoda, S., Parsons, T.J., Pugh, E., Shaler, R., Sherry, S.T., Sozer, A., and Walsh, A. (2005) Epidemiology. DNA identifications after the 9/11 World Trade Center attack. *Science.* Nov 18;310:1122-3.

Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M., Sanchez, F., Sinsheimer, J., Horvath, S., Vilain, E. (2011) Epigenetic predictor of age, *PLoS ONE,* e14821:1–6.

Borovik, C.L., Tajara E., Rocha J.C., Farah, L.M.S., Naccahe, N.F., Netto, R.C.M., Joffe, R. (2010) Guia de boas práticas laboratoriais em citogenética e genética molecular humana - comitê de normatização e recomendações para procedimentos utilizados em laboratórios que prestam serviços na área de genética humana.

Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Huhne, J., Rolf, B. (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet.* 62:1408-1415.

Butler, J. (2009) Overview and History of DNA Analysis Typing in *Fundamentals of Forensic DNA Typing.* Elsevier Academix Press. 43-78,

Carracedo, A. (2013) *Forensic Genetics: History.* Elsevier. 206–210.

Carracedo, A., Salas, A., and Lareu, M.V. (2010) Problemas y retos de futuro de la genética forense en el siglo XXI. *Cuad. med. forense*, Sevilla. 16:1-2.

Chuang, J.C., and Jones, P.A. (2007) Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res*, v. 61, n. 5: 24-29.

Collas, P., and Dahl, J. A. (2008) ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation. *Front Biosci*, v. 13: 929-43.

Collas, P., and Dahl, J. A., (2008) ChIP it, check it: the current status of chromatin immunoprecipitation. *Front Biosci*, v. 13: 929-43.

Daskalos, A., Nikolaidis, G., Xinarianos, G., Savvari, P., Cassidy, A., Zakopoulou, R., Kotsinas, A., Gorgoulis, V., Field, J.K., and Liloglou, T. (2009) Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*: 124(1):81–87.

Dodge, J.E., Okano, M., Dick, F., Tsujimoto, N., Chen, T., Wang, S., Ueda, Y., Dyson, N., and Li, E. (2005) Inactivation of Dnmt3b in mouse embryonic fibroblasts results in DNA hypomethylation, chromosomal instability, and spontaneous immortalization. *J Biol Chem*: 280(18):17986–17991.

Dolinsky, L. C., and Pereira, L. M. (2007) DNA Forense, Saúde e Ambiente em Revista, Duque de Caxias, v2, nº 2: 11-22.

Drummond, D.C., Noble, C.O., Kirpotin, D.B., Guo, Z., Scott, G.K., and Benz, C.C. (2005) Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 495–528.

Duarte, F., Perez, A., Pena, S., De Barros, M., Rossi, E. (2001) A avaliação do DNA como prova forense. *Ribeirão Preto: FUNPEC*: 283.

FAO (2009) Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Fernandez, A. F., Assenov, Y., Martin-Subero, J.I., Balint, B., Siebert, R., Taniguchi, H., Yamamoto, H., Hidalgo, M., Tan, A.C., Galm, O., Ferrer, I., Sanchez-Cespedes, M., Villanueva, A., Carmona, J., Sanchez-Mut, J.V., Berdasco, M., Moreno, V., Capella, G., Monk, D., Ballestar, E., Ropero, S., Martinez, R., Sanchez-Carbayo, M., Prosper, F., Agirre, X., Fraga, M.F., Graña, O., Perez-Jurado, L., Mora, J., Puig, S., Prat, J., Badimon, L., Puca, A.A., Meltzer, S.J., Lengauer, T., Bridgewater, J., Bock, C., and Esteller, M. (2012) A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. *Genome Res*, v. 22, n. 2: 407-19.

Figueiredo, D.D., Barros, P.M., Cordeiro, A.M., Serra, T.S., Lourenco, T., Chander, S., Oliveira, M.M., and Saibo, N.J. (2012) Seven zinc-finger transcription factors are novel regulators of the stress responsive gene OsDREB1B. *Journal of Experimental Botany*. In press. 63(10): 3643-3656.

Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., and Benitez, J. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 102, n. 30: 10604-10609.

Franklin, T. B., and Mansuy, I. M. (2010) Epigenetic inheritance in mammals: Evidence for the impact of adverse environmental effects. *Neurobiology of Disease*, 39: 61-65. a)

Franklin, T. B., Russig, H., Weiss, I. C., Gräff, J., Linder, N., Michalon, A., and Mansuy, I. M. (2010). Epigenetic transmission of the impact of early stress across generations. *Biological Psychiatry*, 68: 408-415. b)

Fridman, C., and Koiffman, C. (2000) Genomic imprinting: genetic mechanisms and phenotypic consequences in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4: 715-724.

Frumkin, D., Wasserstrom, A., Budowle, B., and Davidson, A. (2011) DNA methylation-based forensic tissue identification, *Forensic Sci. Int. Genet.* 5: 517-524.

Frumkin, D., Wasserstrom, A., Davidson, A., Graft, A., (2010) Authentication of forensic DNA samples, *Forensic Sci. Int. Genet.* 4: 95–103.

Gale, M.D., and Devos, K.M. (1998) Plant comparative genetics after 10 years. *Science* (New York, N.Y.) 282: 656-659.

Gardner, R.M. (2009) *Practical Crime Scene Processing and Investigation*. Second Edition (Practical Aspects of Criminal & Forensic Investigations) [Hardcover].

Ge, J., Eisenberg, A., and Budowle, B. (2012) Developing criteria and data to determine best options for expanding the core CODIS loci. *Investig Genet*, v. 3: 1.

Gervin, K., Hammero, M., Akselsen, H.E., Moe, R., Nygard, H., Brandt, I., Gjessing, H.K., Harris, J.R., Undlien, D.E., and Lyle, R. (2011) Extensive variation and low heritability of DNA methylation identified in a twin study. *Genome Res*, v. 21, n. 11: 1813-1821.

Goedecke, N., McKenna, B., El-Difrawy S., Carey, L., Matsudaira ,P., Ehrlich, D. (2004) A high-performance multilane microdevice system designed for the DNA forensics laboratory. *Electrophoresis*. V.25, n. 10-11: 1678–1686.

Goldberg, A. D., Allis, C. D., and Bernstein, E. (2007) Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*, v. 128, n. 4: 635-638.

Gomes, F., Kohlmeier, P.M., and Schneider (2011) Genetic markers for body fluid and tissue identification in forensics, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 3: 469–470.

Gomes, M. (2007) Pesquisa do padrão de imprinting genômico em crianças concebidas por técnicas de reprodução assistida. Tese de Doutorado em Ciências pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo.

Gruntman, E., Qi, Y., Slotkin, R.K., Roeder, T., Martienssen, R. a, and Sachidanandam, R. (2008) Kismeth: analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. *BMC Bioinformatics* 9: 371.

Gunn, A. (2009) *Essential forensic biology*. Second Edition.

Hall, J.G. (1990) Genomic imprinting: review and relevance to human diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 46: 857-873.

He, G., Elling, A., and Deng, X.W. (2011) The epigenoma and plant development. *Annual Review of Plant Biology* 62: 411-435.

Hirayama, T., and Shinozaki, K., (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 61: 1041-1052.

Huang, D., Kin, X., Chen, H., Yang, H., Jie, Y., Zhai, X., and Yin, H. (2008) Parentally imprinted allele(PIA) typing in the differentially methylated region upstream of the human H19 gene, *Forensic Sci. Int. Genet.* 2: 286–291.

Humphreys, E., Tuong, T.P., Bennet, J., Dawe, D., Dittert, K., Dobermann, A., Facon, T., Fujimoto, N., Gupta, R., Haefele, S., (2007) Rice: feeding the billions. In *Water for Food. Water Life. A Comprehensive Assessment of Water Management in Agriculture*. 515-549.

Jablonka, E., and Raz, G. (2009) Transgenerational epigenetic inheritance: prevalences, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. *The Quarterly Review of Biology* 86:131-176.

James, S., Nordby, J.J., and Bell, S. (2009) *Forensic Science: An Introduction to Scientific and Investigative Techniques*. CRC Press. Third Edition.

Jeffreys, A., Wilson, V., and Thein, S. (1985) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature*, 314: 67-79.

Jeon, J.S., Lee, S., Jung, K.H., Jun, S.H., Jeong, D.H., Lee, J., Kim, C., Jang, S., Yang, K., Nam, J., An, K., Han, M.J., Sung, R.J., Choi, H.S., Yu, J.H., Choi, J.H., Cho, S.Y., Cha, S.S., Kim, S.I., and An, G., (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *The Plant Journal* 22: 561– 570.

Kenneth K. Kidd, Judith R. Kidd, William C. Speed, Rixun Fang, Manohar R. Furtado, Fiona C. Hyland, and Andrew J. Pakstis (2012) Expanding data and resources for forensic use of SNPs in individual identification. *Forensic Science International: Genetics*. 6:646-652.

Kloetema, C.S., Vermetten, E., Geuze, E., Kavelaars, A., Heijnen, C.J., and Westenberg, H.G.M. (2006) Assessment of HPA-axis function in posttraumatic stress disorder: Pharmacological and non-pharmacological challenge tests, a review. *Journal of Psychiatric Research*. Volume 40, Issue 6: 550-567

Koch, A., and Michelsen, F. (2008) The use of molecular biology techniques in forensic genetics: a review: *RBAC*, vol.40: 17-23.

Koch, C. M., and Wagner, W. (2011) Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *Aging*, v. 3, n. 10: 1018-1027.

Le Bouc, Y., Rossignol, S., Azzi, S., Brioude, F., Cabrol, S., Gicquel, C., and Netchine, I. (2010) Epigenetics, genomic imprinting and developmental disorders. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine (Paris)*. 194: 287-297.

Lee, H., Park, M., Choi, A., An, J., Yang, W., and Shin, K. (2012) Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification, *Int. J. Legal. Med.* 126: 55–62.

Lee, H.S., Lee, J.W., Han, G.R., and Hwang, J.J. (2000) Motherless case in paternity testing. *Forensic Sci. Int.* 114:57–65.

Li C., Zhang, S., Que, T., Li, L., and Zhao, S. (2011) Identical but not the same: the value of DNA methylation profiling in forensic discrimination within monozygotic twins, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 3: 337–338.

Madi, T., Balamurugan, K., Bombardi, R., Duncan, G., and McCord, B. (2012) The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfate modification and pyrosequencing, *Electrophoresis* 33. 1736–1745.

- Marques, C.J., Vaz, B., Costa, P.** (2007) Alteração transmissível do Imprinting Genômico em pacientes inférteis por Oligozoospermia e Axoospermia. *Arq Med*, vol.21, n°2: 41-45.
- Mayr, W.R.** (1983) Paternity testing with unavailable putative father or mother. In: Walker R editors. *Inclusion Probabilities in Parentage Testing*. Arlington VA: American Association of Blood Banks: 377.
- McGowan, P. and Szyf, M.** (2010) The epigenetics of social adversity in early life: Implications for mental health outcomes. *Elsevier. Neurobiology of Disease* 39, 66-72.
- McGowan, P., Sasaki, A., D'Alessio, A., Dymov S., Labonté B., Szyf, M., Turecki, G., and Meaney, M.** (2009) Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience* 12, 342 – 348.
- Miranda, T. B. and Jones, P. A.** (2007) DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *Journal of cellular physiology*, v. 213, n. 2: 384-390.
- Mozayani, A., and Noziglia, C.** (2006) *The Forensic Laboratory Handbook – Procedures and Practice - Human Press.*
- Mund, C., and Lyko, F.** (2010). Epigenetic cancer therapy: Proof of concept and remaining challenges. *Bioessays*, 32: 949-957.
- Naito E., Dewa, K., Fukuda, M., Sumi, H., Wakabayashi, Y., Umetsu, K., Yuasa, I., and Yamanouchi, H.** (2003) Novel paternity testing by distinguishing parental alleles at a VNTR locus in the differentially methylated region upstream of the human H19 gene, *J.Forensic Sci.* 48: 1–5.
- Nakayashiki, N., Takamiya, M., Shimamoto, K., and Aoki, Y.** (2009) Analysis of the methylation profiles in imprinted genes applicable to parental allele discrimination, *Legal Med.* 11: 471–472. a)
- Nakayashiki, N., Takamiya, M., Shimamoto, K., Aoki, Y., and Hashiyada M.** (2008) Studies on differentially methylated parental allele in imprinted genes, *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.* 1: 572–573.
- Nakayashiki, N., Takamiya, M., Shimamoto, K., Aoki, Y., and Hashiyada M.** (2009) Investigation of the methylation status around parent-of-origin detectable SNPs in imprinted genes, *Forensic Sci. Int. Genet.* 3: 227–232. b)
- Ohno, Y., Sebetan, I.M., and Akaishi, S.** (1982) A simple method for calculating the probability of excluding paternity with any number of codominant alleles. *Forensic Sci. Int.* 19: 93–98
- Oliveira, N., Planello, A., Andia, D., and Pardo, A.** (2010) Metilação de DNA e Cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.56, n.4: 493-499.

- O'Neill, L.P., and Turner, B. M.** (2003) Immunoprecipitation of native chromatin: NChIP. *Methods*. San Diego, Calif. 31: 76–82.
- O'Neill, L.P., VerMilyea, M.D., and Turner, B.M.** (2006) Epigenetic characterization of the early embryo with a chromatin immunoprecipitation protocol applicable to small cell populations". *Nature Genetics* 38: 835–41.
- Pena, S.** (2005) Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. In: *Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas*, v. 20: 447 – 460.
- Pinheiro, M. F. (2008)** CSI Criminal, Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Pinheiro, M. F. (2010)** Genética Forense, Perspectivas da Identificação Genética, Universidade Fernando Pessoa, Porto.
- Pogribny, I. P.** (2010). Epigenetic events in tumorigenesis: Putting the pieces together. *Experimental Oncology*, 32:132-136.
- Portela, A., and Esteller, M.** (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28:1057-1068.
- Riken** (2008) Inhibition of histone deacetylation by trichostatin A. *Research*, V.3 Issue 10.
- Rissech, C., García, M., and Malgosa, A.** (2007). Sex and age diagnosis by ischium morphometric analysis. *Forensic Science International*. 188–196.
- Rocha, P. B.** (2009) O estudo do comportamento do material genético humano (DNA nuclear) em tecido ósseo sob a ação de diversas temperaturas. Dissertação de Mestrado. UNICAMP.
- Rodriguez-Rodero, S., Fernández-Morera, J.L., Menéndez-Torre, E., Calvanese ,V., Fernández ,A.F., and Fraga, M.F.** (2011) Aging genetics and aging. *Aging Dis*, v. 2, n. 3: 186-95.
- Rothstein, M.A., Cai, Y., and Marchant, G.E.** (2009) The ghost in our genes: Legal and ethical implications of epigenetics. *Health Matrix Clevel*. 19: 1-62.
- Sahin, K., Yilmaz, S., Temel, A., Gozukirmizi, N.,** (2011) DNA methylation analyses of monozygotic twins, *Abstr./Cur. Opin. Biotech*. 22: 15–152.
- Salas, A., Lareu, M.V., and Carracedo, A.** (2001) Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. *Int. J. Legal Med.*,v. 114: 186- 190.

- Santos, A.P., Figueiredo, D.D., Barros, P., Lourenc, T., Chander, S., Oliveira, M.M., and Saibo, N.J.M.** (2011) Transcription Regulations of Abiotic Stress Responses in Rice: A Combined Action of Transcription Factors and Epigenetic Mechanisms. 15.
- Seck, P.A., Diagne, A., Mohanty, S., and Wopereis, M.C.S.** (2012). Crops that feed the world 7: Rice. *Food Security* 4: 7-24.
- Shankar, S., and Srivastava, R.K.** (2008) Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol. Advances in Experimental Medicine and Biology* 615: 261–98.
- Sobrino, B., Brión, M. and Carracedo, A.** (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int.* 154:181-194.
- Thompson, T., and Black, S.** (2006) *Forensic Human Identification, An Introduction.* CRC Press.
- Thomson, T., and Black, S.** (2007). *Forensic Human Identification - An introduction.* London: CRC Press.
- Toth Z., Maglinte D.T., Lee S.H., Lee H.R., Wong L.Y., Brulois K.F., Lee S., Buckley J.D., Laird P.W., Marquez V.E., and Jung J.U.** (2010) Epigenetic analysis of KSHV latent and lytic genomes. *PLoS Pathog.*
- Van Montfoort, A.P.** (2012) Assisted reproduction treatment and epigenetic inheritance. *Hum Reprod Update*, v. 18, n. 2:171-97.
- Vanhaecke, T., Papeleu, P., Elaut, G., and Rogiers, V.** (2004) Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr Med Chem* 11: 1629–1643.
- Vidaki, A., Daniel, B., and Syndercombe, D.** (2013) Forensic DNA methylation profiling—Potential opportunities and challenges. *Forensic Science International: Genetics* 7:499–507.
- Wasserstrom, A., Frumkin, D., Davidson, A., Shpitzen, M., Herman, Y., and Gafny, R.** (2013) Demonstration of DSI-semen – a novel DNA methylation-based forensic semen identification assay, *Forensic Sci. Int. Genet* 7: 136–142.
- Watanabe, Y., and Maekawa, M.** (2010). Methylation of DNA in cancer. *Advances in Clinical Chemistry*, 52: 145-167. Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F., D'Alessio, A., Sharma, S., Seckl, J., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M.
- Weaver, I.C., Cervoni, N., Champagne, F., D'Alessio, A., Sharma, S., Seckl, J., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M.** (2009) Epigenetic regulation of the

glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience* 12: 342 – 348.

Weiss, I. C., Franklin, T. B., Vizi, S., and Mansuy, I. M. (2011). Inheritable effect of unpredictable maternal separation on behavioral responses in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 5, 3.

Wong, C.C., Caspi, A., Williams, B., Craig, I.W., Houts, R., Ambler, A., Moffitt, T.E., and Mill, J. (2010) A longitudinal study of epigenetic variation in twins. *Epigenetics*, v. 5, n.6: 516-26.

Wu, C. and Morris, J.R. (2001) Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science*: 293(5532): 1103–1105.

Xiao, J., Xin X., Luan, X., Wei, D., and Yang, S., (2004) A modified simple RFLP-PCR method for single nucleotide polymorphism (SNP) typing. *Genetics and Molecular Biology*. v. 29, n. 3: 562 – 565.

Xiong, W., Conway, D., Lin, E., and Holman, I. (2009) Potential impacts of climate change and climate variability on China's rice yield and reproduction. *Climate Research*: 40: 23-35.

Yang, A. S., Estécio, R. H., Doshi, K., Kondo, Y., Tajara, E., Issa, J.P. (2004) A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Res*, v. 32, n. 3: 38.

Yehuda, R. and Bierer, L. (2009) The Relevance of Epigenetics to PTSD: Implications for the DSM-V. *J Trauma Stress*. 22(5): 427–434.

Yehuda, R., Bierer, L., Andrew, R., and Schmeidler, J. (2009) Enduring effects of severe developmental adversity, including nutritional deprivation, on cortisol metabolism in aging Holocaust survivors. *J Psychiatr Res*.43(9):877-83.

Yehuda, R., Engel, S., Brand, S., Seckl, J., Marcus, S., Berkowitz, G. (2009) Transgenerational Effects of Posttraumatic Stress Disorder in Babies of Mothers Exposed to the WORLD TRADE Center Attacks During Pregnancy. National Emergency Training Center, **Journal of Psychiatric Research** Volume 43, Issue 9: 877-883.

Yong H., Lu, Z., Lin, Z., Jun, L., Shibin, H., Kun, Z., Fei, Y., Min, H., Li, J., Lijia, L. (2011) Trichostatin A Selectively Suppress the Cold-induced Transcription of ZmDREB1B Gene in Maize. *PLoS One* 6(7): e22132.

Yoshida, M., and Horinouchi, T., (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays*.

Yoshida, S., Foorno, D.A., Cock, J.H., and Gomez, K.A. (1976) Laboratory manual for physiological studies of rice. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.

Zaratiegui, M., Irvine, D.V., and Martienssen, R.A. (2007) Noncoding RNAs and gene silencing. *Cell*.128(4): 763–776.

Zhao, G., Yang, Q., Huang, D., Yu, C., Yang, R., Chen, H., and Mei, K. (2005) Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics. *Forensic Science International*. 154: 122–127.

Documentário (2006) The Ghost in Your Genes, BBC, 2006/06/08.