

O POTENCIAL DA EPIGENÉTICA NA ESTIMATIVA DA IDADE EM CONTEXTO FORENSE

THE POTENTIAL OF EPIGENETICS IN FORENSIC AGE ESTIMATION

Autores

Mariana Cunha - Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias - Instituto Politécnico de Castelo Branco, BSc
Joana Liberal - Qualidade de Vida no Mundo Rural (QRural), Instituto Politécnico de Castelo Branco, PhD

Centro de execução do trabalho

Escola Superior de Saúde Dr. Lopes Dias
Instituto Politécnico de Castelo Branco

Conflitos de interesse

Não existem conflitos de interesse a declarar

Fontes de Financiamento

Não existiu qualquer fonte de financiamento de contribuição
para a realização do estudo

Contacto do autor responsável

Campus da Talagueira
Avenida do Empresário
6000-767 Castelo Branco
joanaliberal@ipcb.pt

Tipo de artigo

Artigo de Revisão

Resumo

Este trabalho pretende rever o uso da epigenética, particularmente da metilação do DNA, na predição de idade em contexto forense. Este mecanismo é caracterizado pela adição de um grupo metil na citosina, impedindo a expressão dos genes e criando padrões de metilação. Com o envelhecimento, observaram-se alterações nestes padrões, que tem sido investigadas em diferentes amostras com o intuito de se alcançar um modelo de estimativa de idade preciso.

Palavras-chave

Epigenética (D057890); Metilação de DNA (D019175); Envelhecimento (D000375); Ciências Forenses (D044707)

Abstract

This work aims to review the use of epigenetics, particularly DNA methylation, in the prediction of age in forensics. This mechanism is characterized by the addition of a methyl group to cytosine, inhibiting gene expression and creating methylation patterns. With aging, these methylation patterns change, which have been investigated in different samples in order to achieve a precise age estimation model.

Keywords

Epigenetics (D057890); DNA Methylation (D019175); Aging (D000375); Forensic Sciences (D044707)

Introdução

O exame *post-mortem*, para além de contribuir para a determinação das causas e do contexto de morte, avalia o género, as características corporais, a idade e as patologias que poderão estar associadas, ou não, ao processo de morte⁽¹⁾. Em contexto forense, a estimativa de idade é um dos elementos que auxilia na identificação dos restos cadavéricos que podem ser encontrados em decomposição, carbonizados, dilacerados ou na forma de ossadas⁽²⁾. Por exemplo, num desastre de massa a idade é um fator crucial para a correspondência da lista de desaparecidos com os restos mortais não identificados. No entanto, não é só utilizada em cadáveres, podendo ser requerida em tribunal sempre que não haja provas da idade de um indivíduo^(2,3).

A partir da idade estimada tenta-se chegar à data de nascimento aproximada para, posteriormente, serem consultados os registos e assim se obterem informações que possam levar à identificação dos indivíduos⁽⁴⁾. Contudo, é necessário ter em conta que o grau de desenvolvimento de um sujeito é influenciado por diversos fatores, como a genética, as patologias e os distúrbios metabólicos, que tornam a idade uma estimativa e não uma determinação exata.

Existem duas idades mensuráveis, a idade cronológica e a idade biológica. A primeira corresponde à idade do indivíduo, medida em meses ou anos, desde o nascimento até à sua morte. Enquanto que a idade biológica ou óssea se refere à idade do indivíduo baseada no desenvolvimento e saúde dos ossos⁽⁵⁾. Parte-se do pressuposto que a idade biológica está sensivelmente de acordo com a idade cronológica⁽⁴⁾, no entanto a primeira pode ser influenciada pelas variações de desenvolvimento, entre elas, a menarca, a altura, o peso e os distúrbios metabólicos e nutricionais⁽⁶⁾.

A idade biológica pode ser determinada através dos ossos ou dentes, sendo os dentes a amostra de eleição, pois conseguem-se manter, quase intactos, durante mais anos, suportando processos de decomposição e agressões externas⁽⁷⁾.

Existem diferenças na escolha da metodologia de estimativa de idade, consoante se trate de uma criança ou de um adulto, e quando se trata de um cadáver ou de um indivíduo vivo. Em crianças, pode ser estimada através de exames dentários e radiológicos. O desenvolvimento dos dentes, desde os decíduos até aos terceiros molares, e dos ossos da mão e pulso, são os dos parâmetros mais utilizados. Nos adultos, para além da dentição, são utilizadas radiologias, exames bioquímicos e histológicos para a estimativa da idade^(2,3). Consoante as circunstâncias deve ser escolhido, de entre os vários métodos à disposição, aquele que melhor se enquadra a cada caso.

Nas últimas décadas surgiu a necessidade de se encontrarem metodologias mais precisas para a estimativa da idade. Para tal os investigadores têm procurado determinar este parâmetro a partir do DNA, que apresenta como vantagem a possibilidade de extração a partir de uma mancha, fluido, ou tecido corporal. Para além disto, o DNA permite obter informações que poderão ser essenciais para a identificação do sujeito⁽⁸⁾.

Sabe-se que o processo de envelhecimento normal provoca um conjunto de alterações nos tecidos e órgãos que se acumulam ao longo da vida e que podem ser observados a nível molecular⁽⁹⁾. Deste modo, foram descritos mecanismos relacionados com o envelhecimento capazes de serem utilizados para estimar a idade, são eles o encurtamento dos telómeros a cada divisão celular; a quantidade de deleções no DNA mitocondrial devido à acumulação de danos no DNA; os rearranjos de DNA nas células T; a racemização do ácido aspártico e os produtos finais da glicosilação. Estes dois últimos pontos estão relacionados com as proteínas, enquanto os restantes com o DNA^(9,10). A principal vantagem destas metodologias moleculares para a estimativa de idade é poderem ser aplicadas a qualquer tipo de amostra, desde que contenham DNA⁽¹¹⁾. No entanto, alguns destes mecanismos não apresentaram bons resultados, pois obtiveram uma baixa precisão para a idade^(9,10).

Através da necessidade de encontrar uma boa metodologia que permitisse estimar a idade com

uma boa precisão, surgiu a metilação do DNA como biomarcador. Com o avançar dos estudos foi possível perceber que existem diferentes padrões de metilação em regiões genômicas relacionadas com o envelhecimento que provocam modificações a nível molecular, permitindo assim traçar um perfil de metilação que é específico de cada pessoa e que vai sofrendo alterações com o envelhecimento ⁽¹²⁾. Assim sendo, este estudo pretende fazer uma revisão do uso da epigenética, principalmente da metilação do DNA, na predição da idade em ciências forenses, fazendo um levantamento dos genes e dos modelos de predição desenvolvidos até ao momento.

Epigenética

A Epigenética é atualmente definida como o estudo das alterações mitóticas e meióticas hereditárias da função do gene ou fenótipo celular causadas por outros mecanismos para além das alterações na sequência de DNA ⁽¹³⁾.

Existem vários mecanismos epigenéticos que envolvem modificações funcionais, nomeadamente a metilação do DNA, as modificações das histonas, os RNAs não codificantes, os *loopings* da cromatina e a remodelação do nucleossoma. Estes processos não interferem na sequência de DNA, mas desempenham um papel importante na expressão e ativação dos genes. Estes mecanismos são essenciais para o controlo de funções celulares relevantes como a inativação génica, a inativação cromossómica X, o *imprinting*, a reprogramação e a carcinogénese ^(14,15).

Durante a divisão celular e a transcrição do DNA as características epigenéticas são preservadas, no entanto, podem sofrer alterações ao longo da vida de um indivíduo, isto devido a fatores ambientais como a alimentação, agentes infecciosos e tabagismo ⁽¹⁶⁾.

Recentemente a epigenética tornou-se num dos campos das ciências forenses, sendo utilizada para a estimativa da idade, determinação do tipo de tecido, diferenciação entre gémeos monozigóticos, determinação da causa e das circunstâncias de morte e autenticação das amostras de DNA, tudo a partir da análise dos padrões de metilação do DNA ^(14,16).

Metilação do DNA

A metilação do DNA é um processo essencial que ocorre no genoma e que permite o desenvolvimento normal da célula, mas também a manutenção dos tipos celulares. Consiste na adição de um grupo metil na posição 5' de uma citosina, passando a denominar-se de 5-metilcitosina, numa região rica em dinucleótidos CpG ⁽¹⁴⁾.

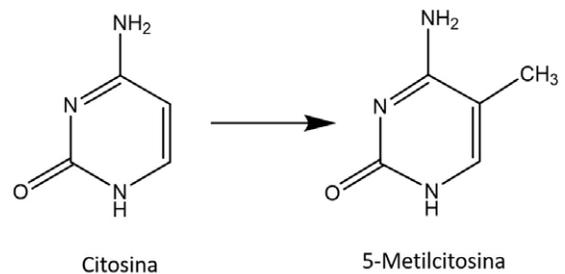


Figura 1- Estrutura química da Citosina e da 5-metilcitosina

A metilação é mediada por enzimas, as DNA metiltransferases (DNMTs), que utilizando a S-adenosil-L-metionina (SAM) alteram a ligação covalente dos dinucleótidos CpG permitindo a adição do grupo metil. Foram descritas três enzimas DNMTs, a DNMT1, a DNMT3a e a DNMT3b. A DNMT1 está envolvida na manutenção dos níveis de metilação do DNA que devem existir nas células, mas também controla a correta transcrição das zonas CpG metiladas do DNA. A DNMT3a e a DNMT3b são responsáveis pela diferenciação em diferentes tipos celulares no embrião, através da metilação *de novo* ^(17,18). Por outro lado, pode ocorrer a desmetilação do DNA através da enzima de translocação 10-11 (TET), este mecanismo permite a regulação dos padrões de metilação. Esta enzima adiciona um grupo hidroxilo à 5-metilcitosina transformando-a em 5-hidroximetilcitosina, que por sua vez é convertida em citosina. A metilação e desmetilação são mecanismos que permitem o desenvolvimento normal das células e por esse motivo estão sempre em equilíbrio ⁽¹⁹⁾.

A metilação do DNA é iniciada a partir da fecundação, isto porque ambos os gâmetas (paternos e maternos) possuem os padrões de metilação dos progenitores. Quando é formado o zigoto, o genoma e epigenoma paterno e materno ficam contidos numa só célula.

A seguir o epigenoma paterno inicia a desmetilação ativa do DNA, mantendo-se desmetilado durante várias fases da divisão celular. O epigenoma materno sofre uma desmetilação passiva do DNA, que ocorre gradualmente até que os níveis de DNA metilado sejam muito baixos, todo este processo é catalisado pela enzima TET^(19,20). Pensa-se que uma das principais funções deste mecanismo seja tentar eliminar a marcação genética (*imprints*) parental para que ocorra a redefinição do genoma do bebê⁽²⁰⁾.

Quando o embrião chega à fase de blastocisto são estabelecidos novos padrões de metilação através das enzimas DNMT3a e DNMT3b, chamada metilação *de novo*, com informação genética do embrião. Nas fases seguintes, durante a diferenciação cada célula adquire um padrão de metilação único que é mantido durante cada divisão celular e que é mediado pela enzima DNMT1⁽²⁰⁾.

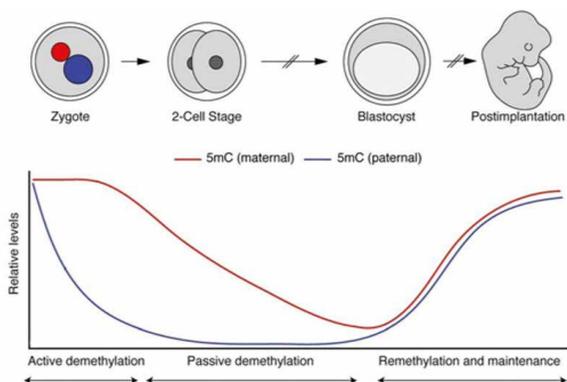


Figura 2-Desenvolvimento dos padrões de metilação desde a fecundação até à formação do embrião. Adaptado de Messerschmidt et al. (20)

A metilação do DNA está relacionada com a diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário, visto que todas as células possuem a mesma sequência de DNA, a razão da diferença entre elas são os genes que expressam. A diferenciação celular dá-se a partir de uma célula pluripotente que tem a capacidade de se diferenciar em qualquer tipo celular, no entanto, para que esse processo se concretize, é necessário que os genes que não correspondam àquele tipo celular sejam silenciados. Isto é possível através da metilação de CpG que faz com que certos genes de outros tipos celulares sejam silenciados, enquanto os do tipo celular para o qual a célula se está a diferenciar sejam expressos. Assim a célula possui padrões de metilação únicos

que são transmitidos às restantes células durante a diferenciação daquele tecido^(20,21).

A metilação está também envolvida na resistência da heterocromatina à nuclease e à inativação da expressão gênica. Numa célula adulta normal, na sequência de DNA existem regiões CpG metiladas e ilhas CpG, e durante a transcrição, as regiões metiladas vão impedir a expressão do gene, tornando-o inativo⁽²²⁾. As ilhas CpG são um conjunto de dinucleótidos CpG que estão presentes na zona promotora dos genes. Esta zona contém elementos regulatórios que controlam a transcrição permitindo a ligação do fator de transcrição e consequentemente levando à ativação dos genes^(12,17). A maioria das regiões CpG (60-90%) do genoma possuem um grande potencial de metilação podendo ser encontrados em genes, transposões e regiões intergênicas. Nestes locais as citosinas estão metiladas, impedindo a ligação do fator de transcrição à sequência do DNA que tem como finalidade o silenciamento dos genes^(14,17).

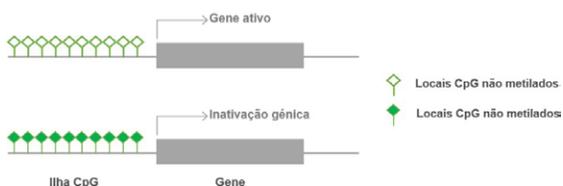


Figura 3-Representação de regiões CpG metiladas e não metiladas que levam à inativação ou à expressão do gene. Adaptado de Vidaki et al. (14)

As ilhas CpG são predominantemente hipometiladas, permitindo a transcrição ativa dos genes, enquanto os dinucleótidos ou locais CpG possuem um grande potencial para ocorrer metilação. Estas características são estabelecidas no início da divisão embrionária e mantidas ao longo da vida nas células⁽¹⁷⁾.

Com a idade os padrões de metilação vão sofrendo alterações, isto é, as zonas hipermetiladas vão ficando gradualmente hipometiladas e as ilhas CpG, que são hipometiladas tornam-se hipermetiladas. Estas mudanças não se encontram em locais específicos, ou seja, a sua localização difere e por este motivo as funções subjacentes a estes genes serão também diferentes^(23,24).

A hipometilação ocorre em sequências de DNA repetitivo, em regiões intrónicas e intergênicas⁽²⁵⁾.

No entanto, em zonas de codificação ou de regulação, como é o caso dos promotores e exões, 20% são regiões diferenciais de metilação (DMRs) e foi observado que mais de 80% destas tinham sido hipometiladas com o envelhecimento ^(23,26). Estas descobertas indicam que a hipometilação pode levar a mudanças na cromatina com grande relevância para a regulação transcricional. Este mecanismo foi dependente do teor em CpG, sendo mais comum nos promotores de genes específicos de tecidos do que nos promotores das ilhas CpG ou em genes *housekeeping* ⁽²³⁾.

Com a idade e devido à hipometilação do DNA, verificou-se que ocorre a ativação dos retrotransposões que em indivíduos jovens são epigeneticamente silenciados pela metilação ^(17,25). Estes são constituídos por milhares de pares de base, são rodeados por repetições terminais diretas e transportam genes para as enzimas transcriptase reversa e integrase ⁽²²⁾.

Por outro lado, o envelhecimento marca também o ganho progressivo de metilação do DNA que leva à perda de expressão de certos genes. A maioria dos locais hipermetilados, relacionados com idade, correspondem aos promotores das ilhas CpG, que levam à supressão da transcrição quando metilados. Este aspeto é de particular interesse pois confere às mudanças de metilação, que ocorrem com o envelhecimento, as características de uma reprogramação epigenética ⁽²³⁾.

Certos estudos sugerem que o envelhecimento pode predispor a um fenótipo patológico devido ao silenciamento genético relacionado com a metilação. Em doenças relacionadas com a idade foi observado que a hipermetilação afeta todos os locais CpG das ilhas CpG, enquanto, em jovens os padrões de metilação são parciais e heterogéneos. Deste modo, mudanças parciais da metilação acumuladas no genoma à medida que se envelhece podem predispor ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade, as quais são agravadas por mecanismos de disseminação da metilação ⁽²⁷⁾.

Os loci que exibem hipermetilação estão próximos de genes específicos do tecido, genes envolvidos na diferenciação e desenvolvimento, genes que codificam fatores de transcrição e locais de ligação dos fatores de transcrição ^(23,28). Estes genes localizam-se em regiões ativas do genoma, portanto

mudanças na regulação destes pode levar ao recrutamento das enzimas de metilação do DNA em grande quantidade. Este aumento enzimático faz com que grande parte dos locais de ligação dos fatores de transcrição sejam metilados e por isso, os fatores de transcrição não se conseguem ligar ao DNA e os genes são inativados ⁽²⁹⁻³²⁾.

A análise dos padrões de metilação apresenta-se como uma promissora metodologia para estimar a idade cronológica de um indivíduo. O estudo das regiões específicas do genoma que apresentam uma relação direta com as mudanças de metilação relacionadas com a idade, pode ser usada como um sistema informativo para estimar a idade ⁽¹⁷⁾.

Estimativa da idade através da metilação do DNA

Os estudos para a estimativa de idade através da metilação do DNA têm vindo a crescer nos últimos anos ⁽¹⁷⁾. Têm sido desenvolvidos modelos de predição de idade utilizando marcadores para genes que se localizam em regiões CpG relacionadas com a idade em amostras de sangue, dentes, saliva e sêmen ^(33,34). O objetivo da comunidade forense é chegar a um modelo universal para estimativa de idade, através da região CpG mais relacionada com o envelhecimento, mas também tendo em conta o tecido ou fluido encontrado, bem como a melhor tecnologia para se chegar ao resultado final ⁽¹⁷⁾.

A seguir são referenciados os mais recentes ensaios realizados para, a partir da metilação do DNA, estimar a idade em diferentes tecidos e utilizando vários genes e locais CpG.

Vidaki et al. ⁽³³⁾ estudaram o uso de redes neurais artificiais (ANN) para tentar minimizar o erro de predição e aumentar a precisão dos modelos de estimativa de idade. As ANNs são um grupo de algoritmos inspirado em sistemas biológicos que foram utilizados com sucesso para encontrar tendências em conjuntos de dados complexos. Existem vários tipos de ANNs e o modelo mais adequado depende da finalidade pretendida, neste caso foram utilizadas redes neurais de regressão generalizada (GRNN). Este modelo estatístico foi usado para prever a idade de 1156 amostras de sangue periférico e de 265 amostras de saliva, através da análise de 16 CpG (correspondente aos genes: CSNK1D, C21orf63, CASC4, SSRP1, FXN,

P2RXL1, RASSF5, ERG, TRIP10, FZD9, KLF14, NR2F2, VGF, NHLRC1, SCGN e C19orf30). Obteve-se como desvio absoluto médio (MAD) 3.8 anos e 3.18 anos, respetivamente. Foi estudado também a utilização da sequenciação de nova geração (NGS) não só para quantificar a metilação do DNA, mas também para permitir uma avaliação mais sensível e com um custo menor. Para esse efeito foram utilizadas 46 amostras de sangue, de indivíduos com idades entre os 11 e 76 anos, onde se estudaram 16 regiões CpG. Foi obtido um MAD de 7.45 anos. Ambos os ensaios apresentaram boa precisão tendo em conta os marcadores, os tecidos utilizados e também a metodologia.

Bekaert et al.⁽³⁴⁾ pretenderam determinar a idade em amostras de sangue e dentes utilizando regiões CpG de genes relacionados com a idade (ASPA, ITGA2B, PDE4C, EDARADD e ELOVL2). Quanto às amostras de sangue, 169 pertenciam a cadáveres e 37 a indivíduos vivos; primeiramente foram determinados os valores de metilação, para cada um dos genes, onde apenas um, o ITGA2B foi eliminado, por não se verificar correlação com a idade. Os restantes genes foram estudados e através de um modelo de regressão quadrático e obteve-se uma correlação significativa com a estimativa de idade, com um MAD de 3.75 anos. Nas amostras de dentes utilizaram-se os mesmos CpG das amostras de sangue, ASPA, PDE4C, EDARADD e ELOVL2 e através do modelo de regressão quadrática estimou-se a idade com um MAD de 4.86 anos. Tendo em conta os resultados obtidos neste ensaio e as propriedades altamente resistentes dos dentes, mais estudos deveriam ser realizados para que se encontrarem os genes mais adequados às amostras dentárias.

Florath et al.⁽³⁵⁾ efetuaram um estudo que foi dividido em três fases. Na primeira fase foram calculados os coeficientes de correlação entre os níveis de metilação e a idade em 480675 locais CpG de 400 indivíduos; tendo em conta os resultados, os CpG que obtiveram elevado valor de correlação foram selecionadas para nova avaliação do coeficiente de correlação (200 CpG). Na segunda fase testaram a associação da metilação e a idade com modelos de regressão linear tendo em conta o sexo, doenças e estilo de vida nos 200 CpGs anteriores. A terceira e última fase envolveu um *follow up* de 8 anos em 67 indivíduos, sem doenças, com o objetivo de comprovar as diferenças na metilação à medida que

se envelhece, nos 155 CpG relacionados com a idade. Considerando os resultados obtidos, os autores criaram um modelo de predição de idade baseado em 10 CpG e no gene mais associado à idade, o ELOVL2, tendo sido obtido um MAD de 2.6 anos.

Tendo em conta as amostras encontradas em locais de crime, Huang et al.⁽³⁶⁾ desenvolveram um ensaio para predição de idade utilizando a metilação do DNA em manchas de sangue e amostras sanguíneas. Foram utilizadas 89 amostras sanguíneas provenientes de indivíduos com idades entre 9 e 75 anos, de ambos os sexos. Destas foram utilizadas 20 para se criarem manchas de sangue e mais 6 amostras (idades entre 12 e 65 anos) que foram analisadas inicialmente e após 4 meses, como forma de avaliar a estabilidade da estimativa do ensaio. Foram escolhidos a partir de estudos realizados anteriormente em 6 genes (ASPA, ITGA2B, NPTX2, TOM1L1, ZDHHC22 e ZIC4) e foi obtido o valor de metilação utilizando a pirosequenciação do DNA. A predição da idade foi realizada utilizando um modelo de regressão linear, onde se observou um MAD de 7.87 anos para ambos os sexos. Quanto às manchas de sangue, não foram encontradas diferenças estatísticas na idade estimada utilizando amostras sanguíneas e manchas de sangue; as 6 amostras que ficaram armazenadas 4 meses apresentaram valores de MAD inferiores a 7.87, indicando que é possível obter uma previsão estável da idade, em amostras nestas condições. Os genes ASPA, ITGA2B e NPTX2 foram identificados como marcadores relacionados com a idade.

Zbieć-Piekarska et al.⁽³⁷⁾ utilizaram 41 regiões CpG de 8 genes relacionados com a idade, segundo estudos anteriores. Num total de 300 amostras com idades entre os 18 e 75 anos, foram obtidos os valores de metilação através da pirosequenciação, para os genes em estudo, ELOVL2, KLF14, C1orf132, F5, SLC6A4, FHL2, CCDC102B e TRIM59; a correlação entre a idade e o nível de metilação foi obtido através de uma regressão linear. O gene ELOVL2 teve a correlação mais alta (0.912), seguido do C1orf132 (0.889) e o terceiro gene com melhor estimativa de idade foi o TRIM59 (0.863); usando os genes anteriores e ainda o KLF14 e o FHL2 foi criado um método com precisão maior utilizando os cinco genes mais associados à idade, que obteve um MAD de 3.4 anos; posteriormente houve uma análise por categorias etárias que provou o aumento do MAD com a idade, tornando este modelo de 5 genes

(ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KFL14 e FHL2) preciso em relação à estimativa de idade.

Freire-Aradas et al. ⁽³⁸⁾ criaram um novo modelo de estimativa de idade utilizando uma análise de regressão quantílica a partir de amostras sanguíneas, com base em seis marcadores relacionados com a idade e os locais CpG correspondentes a estes; para esse efeito foram usadas 725 amostras de indivíduos com idades entre 18-104 anos. A partir de estudos anteriormente publicados, os autores selecionaram 18 CpGs localizados em 12 genes diferentes (EDARADD, NPTX2, Tom1L1, ELN, NHLRC1, CCDC105, GPR25, RAB36, ASPA, ITGA2AB, PDE4C e ELOVL2), posteriormente a seleção dos CpG com melhor correlação de idade foram escolhidos através dos níveis de metilação do DNA. Com base nestes resultados, os genes ASPA, PDE4C, ELOVL2, FHL2, CCDC102B e C1orf132 foram identificados como aqueles mais correlacionados com a idade, sendo selecionados para o estudo. Os valores de metilação obtidos anteriormente foram depois utilizados para construir o modelo de predição de idade, que forneceu correlações positivas da idade com um MAD de 3.07 anos.

Um método para estimar a idade utilizando amostras de sangue através da metilação do DNA foi descrito por Weidner et al. ⁽³⁹⁾ O modelo é baseado na análise por pirosequenciação dos níveis de metilação em 3 genes (ASPA, ITGA2B e PDE4C), que posteriormente foram correlacionados com a idade através de uma regressão linear. Foram utilizadas 82 amostras sanguíneas provenientes de indivíduos com idades entre os 0 e 78 anos. Observou-se forte correlação com a idade nos três genes, ASPA, ITGA2B e PDE4C, com um MAD de 5.4 anos, mostrando uma boa predição e como podem ser usados como marcador.

Ainda utilizando amostras sanguíneas Zbieć-Piekarska et al. ⁽⁴⁰⁾ avaliaram a utilidade da metilação do DNA nos CpG do gene ELOVL2, através da pirosequenciação. O modelo foi desenvolvido com base em 303 amostras a partir de uma regressão linear e a sua precisão foi testada usando 124 amostras divididas em conjuntos etários com idades entre 2-75 anos. Foram selecionados 7 CpG com forte associação à idade, no gene ELOVL2 e, utilizando os níveis de metilação, o modelo foi utilizado, prevendo a idade com um MAD de 5.03 anos em 303 amostras sanguíneas. De seguida a validação do modelo foi

realizada com 124 amostras divididas por quatro faixas etárias e o MAD foi ligeiramente superior (5.75 anos) validando o método. Estes resultados confirmam que a metilação verificada no gene ELOVL2 (nos 7 CpG) está relacionada com a idade, o que o tornam um bom preditor de idade no sangue.

Os esfregaços bucais são amostras muito usadas na medicina legal, visto tratar-se de um procedimento não invasivo e de colheita relativamente fácil. É através da saliva que a análise é realizada, deste modo, Eipel et al. ⁽⁴¹⁾ desenvolveram um método para estimativa de idade em 3 genes (ITGA2B, ASPA e PDE4C). Foram colhidas 55 amostras de esfregaços bucais de indivíduos com idades entre 1 e 85 anos, os níveis de metilação do DNA foram analisados por pirosequenciação e usada uma regressão linear para se obter a correlação entre idade cronológica e a estimada. O MAD foi de 4.3 anos, no modelo que utilizou os 3 genes. De seguida, estes genes foram estudados individualmente para se perceber a relação com este tipo de amostras e verificou-se que em amostra de saliva e de esfregaços bucais não se observa correlação com a idade e que não devem ser utilizados como biomarcador individualmente (ITGA2B E ASPA). Por outro lado, o gene PDE4C mostrou valores elevados de correlação com a idade e por isso foi estudado mais aprofundadamente, obtendo-se um MAD de 5.2 anos. Este último ensaio, permite o uso individual deste marcador, no entanto, os resultados foram melhores quando se utilizaram os três genes.

Bocklandt et al. ⁽⁴²⁾ investigaram os genes EDARADD, TOM1L1 e NPTX2 em 60 amostras de saliva de indivíduos com idades entre 18 e 70 anos, e a partir de uma regressão linear foi construído um modelo de estimativa de idade que foi capaz de prever a idade com um MAD de 5.2 anos a partir dos níveis de metilação do DNA obtidos por pirosequenciação. Este estudo mostra a utilidade e precisão destes genes para prever a idade em amostras de saliva.

Os esfregaços bucais foram analisados também por Fleckhaus et al. ⁽⁴³⁾ em 150 amostras provenientes de três grupos populacionais diferentes (50 por cada grupo), do Médio-Oriente, da Europa Central e do Oeste de África, usando 2 modelos de predição de idade diferentes. Cinco locais CpG pertencentes a 4 genes, ASPA, ITGA2B, PDE4C e ELOVL2 (este último estudado em diferentes regiões CpG),

correlacionados com a idade foram analisados. Destes, os genes ASPA e ITGA2B mostraram valores de correlação de 0.5, enquanto que os genes PDE4C e ELOVL2 obtiveram correlação alta entre 0.8 e 0.9. Este resultado evidencia a força de correlação entre a metilação e a estimativa de idade, bem como os locais CpG que poderão ser utilizados neste tipo de amostra.

Giulinani et al. ⁽⁴⁴⁾ testaram três genes (ELOVL2, FHL2 e PENK), em dentes, com o objetivo de explorar os seus padrões de DNA e perceber se podem ser adequados à estimativa da idade. Foram utilizados 22 dentes de indivíduos com idades entre 17 e 77 anos. Em cada um dos dentes, foi analisado o DNA extraído da polpa, do cimento e da dentina para avaliar a correlação dos perfis de metilação dos DNA com a idade e em relação à composição histológica do dente. Através da utilização da espectrofotometria de massa MALDI-TOF as regiões CpG pretendidas foram detetadas e pirosequenciadas para se obter os níveis de metilação de cada um dos genes. Posteriormente, a estimativa de idade para cada uma das camadas dentárias foi determinada com o uso de um modelo regressão linear. Foram testados os genes ELOVL2, FHL2 e PENK em diferentes locais CpG, e criado um modelo de predição de idade para cada um dos constituintes dos dentes. No estudo da polpa dentária utilizaram-se 13 locais de CpG (cinco no ELOVL2, cinco no FHL2, e três no gene PENK) e obteve-se um MAD de 2.25 anos. Para construir o modelo da dentina foram utilizados 5 locais CpG (três no ELOVL2, um no FHL2, e um no gene PENK) que deu um MAD de 7.07 anos. O modelo para o cimento foi conseguido através da metilação de 13 locais CpG (oito no ELOVL2, quatro no FHL2, e um no gene PENK), e alcançou um MAD de 2.45 anos. Por último, um modelo foi calculado pelo agrupamento das duas camadas que melhores resultados obtiveram na predição da idade, a polpa dentária e o cimento, analisando 8 locais CpG (três no cimento e cinco na polpa) de dois genes, ELOVL2 e FHL2, com um MAD de 1.20 anos. Este estudo ⁽⁴⁴⁾ demonstrou que a polpa e o cimento podem ser utilizados para prever a idade com maior precisão, ao contrário da dentina que não apresentou forte correlação e precisão com a idade. Por outro lado, o modelo criado com a junção da polpa e do cimento obteve uma maior precisão e predição e por isso poderá ser o modelo de eleição quando se trata de amostras dentárias.

Lee et al. ⁽⁸⁾ reportaram um modelo de regressão linear baseado em sémen usando níveis de metilação de DNA de 3 regiões CpG em dois genes, TTC7B e NOX4. As 12 amostras foram divididas em 4 grupos consoante a idade ^(20, 30, 40 e 50), destes o grupo dos 20 obteve um MAD de 2.9 anos, enquanto que o grupo dos 50 adquiriu um MAD de 7.2 anos; tendo em conta este resultado verificou-se que a precisão da estimativa da idade desce com o aumento da idade, neste tipo de amostras. Por outro lado, mostrou-se forte correlação entre a idade prevista e a cronológica com um MAD de 4.8 anos no total de amostras, quando foram utilizadas em conjunto, ou seja, sem divisão etária, sugerindo que o método e os genes utilizados podem ser usados para uma predição de idade mais precisa em amostras de sémen.

Com o objetivo de criar um modelo que poderia ser utilizado em amostras de sémen, os mesmos investigadores ⁽⁴⁵⁾ começaram por analisar 24 locais CpG em 31 amostras provenientes de indivíduos com idades entre os 20 e 67 anos, utilizando dois modelos de regressão linear; os níveis de metilação do DNA foram conseguidos através da técnica *HumanMethylation450k BeadChip*. A seleção das melhores variáveis para a construção do método foi conseguida através de uma regressão *stepwise*, que produziu um modelo linear composto por 3 CpG de 2 genes (TTC7B e NOX4) com um MAD de 4.2 anos. Para finalizar voltaram a testar o modelo, mas com 68 amostras de sémen (31 usadas anteriormente e mais 37 utilizadas na validação) que obtiveram um MAD de 4.7 anos, mostrando grande predição na estimativa de idade a partir dos genes TTC7B e NOX4.

A tabela 1 resume os estudos descritos anteriormente e que são considerados os mais relevantes no que diz respeito ao estudo da estimativa de idade, através de modelos baseados nos níveis de metilação do DNA encontrados em locais CpG associados ao envelhecimento, localizados em um ou mais genes. Através da análise dos valores da correlação e do desvio médio absoluto é possível perceber se os modelos testados conseguiram bons resultados e uma boa precisão.

Tabela 1- Modelos de predição de idade baseados em metilação do DNA, adaptado de Freire-Aradas et al (17)

Amostra	Metodologia	Idade; n° de amostras	CpG	Genes estudados	Modelo estatístico	R ²	MAD (anos)	Ref.
Sangue	<i>HumanMethylation BeadChip</i>	2-90 anos N= 1156	16 CpG	CSNK1D, C21orf63, CASC4, SSRP1, FXN, P2RXL1, RASSF5, ERG, TRIP10, FZD9, KLF14, NR2F2, VGF, NHLRC1, SCGN, C19orf30	ANN: GRNN	0.96	3.8	(33)
	NGS	11-76 anos N= 46				0.86	7.45	
	Pirosequenciação	0-91 anos N= 169 ind. mortos + 37 ind. vivos	4 genes	ASPA, PDE4C, EDARADD, ELOVL2	Regressão quadrática	0.95	3.75	(34)
	<i>HumanMethylation450 BeadChip</i>		17 CpG	ELOVL2, ZYG11A, LRRC23, CBX4, SFMBT1, NWD1 GPR62	Regressão linear	0.84	2.6	(35)
	Pirosequenciação (PyroMark)	2-75 anos N= 300	41 CpG 8 genes	ELOVL2, KLF14, C1orf132, F5, SLC6A4, FHL2, CCDC102B, TRIM59	Regressão linear	0.943	3.4	(37)
	MALDI-TOF	18-104 anos N=725	18 CpG	ASPA, PDE4C, ELOVL2, FHL2, CCDC102B, C1orf132	Regressão quantílica	0.939	3.07	(38)
	Pirosequenciação (PyroMark)	0-78 anos N= 82	3 genes	ASPA, ITGA2B, PDE4C	Regressão linear	—	5.4	(39)
	Pirosequenciação (PyroMark)	2-75 anos N= 303	7CpG 1 gene	ELOVL2	Regressão linear	0.859	5.03	(40)
Esfregaços bucais (Saliva)	Pirosequenciação (PyroMark)	N= 50 em cada grupo populacional	5 CpG 4 genes	ASPA, ITGA2B	—	0.5	—	(43)
				PDE4C, ELOVL2	—	0.8 e 0.9		
	Pirosequenciação	1-85 anos N= 55	3CpG 3 genes	ASPA, PDE4C, ITGA2B	Regressão linear	0.93	4.3	(41)
	Pirosequenciação	1-85 anos N= 55	1 CpG 1 gene	PDE4C	Regressão linear	0.91	5.2	(41)
Saliva	<i>HumanMethylation BeadChip</i>	21-55 anos N=265	16 CpG	CSNK1D, C21orf63, CASC4, SSRP1, FXN, P2RXL1, RASSF5, ERG, TRIP10, FZD9, KLF14, NR2F2, VGF, NHLRC1, SCGN, C19orf30	ANN: GRNN	0.96	3.18	(33)
	<i>HumanMethylation27 BeadChip</i>	18-70 anos N= 60	3 genes	EDARADD, TOM1L1, NPTX2	Regressão linear	0.83	5.2	(42)
Polpa	MALDI-TOF	17-77 anos N= 22	13 CpG	ELOVL2, FHL2, PENK	Regressão linear	0.93	2.25	(44)
Cemento			13 CpG			0.90	2.45	
Dentina			5 CpG			0.50	7.07	
Polpa + Cimento	MALDI-TOF	17-77 anos N= 22	2 genes	ELOVL2, FHL2	Regressão linear	0.97	1.20	(44)
Dentes	Pirosequenciação	19-70 anos N= 29	4 genes	ASPA, PDE4C, EDARADD, ELOVL2	Regressão quadrática	0.74	4.86	(34)
Sémen	PCR	24-57 anos N= 12	3 CpG 2 genes	TTC7B, NOX4	Regressão linear	0.907	4.8	(8)
	<i>HumanMethylation450 BeadChip</i>	20-73 anos N= 68	3 CpG 2 genes	TTC7B, NOX4	Regressão linear	0.906	4.7	(45)
Sangue e manchas sanguíneas	Pirosequenciação	9- 75 anos N= 89	6 genes	ASPA, ITGA2B, NPTX2, ZIC4, TOM1L1, ZDHHC22	Regressão linear	0.819	7.87	(36)

N: número de amostras

R²: Coeficiente de correlação com idade

MAD: desvio absoluto médio

Ref.: Referências bibliográficas

ANN: redes neurais artificiais

GRNN: redes neurais de regressão generalizada

Discussão e Conclusão

A identificação de cadáveres, suspeitos ou vítimas é uma das prioridades das autoridades. Quando não são conhecidas outras informações que possam auxiliar a resolução de crimes ou a identificação de suspeitos, a estimativa de idade é um dos parâmetros cruciais, pois consegue fornecer pistas importantes e assim orientar a investigação.

A estimativa de idade é um dos critérios utilizados nos desastres de massa e em estudos antropológicos, em contexto forense e legal. A sua determinação tem-se focado em metodologias mais antigas como exames dentários, radiológicos, bioquímicos e histológicos. No entanto, estas técnicas têm apresentado baixa precisão e por esse motivo surgiu a necessidade de se encontrarem novas metodologias mais precisas, neste caso, a partir do material genético.

A metilação do DNA mostrou ser um bom marcador para a estimativa da idade. Como descrito anteriormente existem diferentes regiões genómicas relacionadas com a idade. Estas ajudam a traçar um perfil de metilação que é específico de cada pessoa e que vai sofrendo alterações com a idade e é a partir da análise destes níveis de metilação do DNA que é possível estimar idade.

Nos últimos anos, os estudos para a estimativa de idade através da metilação do DNA têm vindo a aumentar, pois existe, por parte da comunidade forense, o objetivo de obter um modelo universal de predição de idade com elevada precisão. Com esse intuito, foram realizados vários ensaios com base em diferentes genes, tecidos e tecnologias.

A partir dos estudos aqui apresentados, quando se trata de uma amostra sanguínea, o melhor resultado foi obtido por Florath et al. ⁽³⁵⁾ com um MAD de 2.6 anos, este resultado está relacionado com o facto de que, um dos genes usado pelos autores, ter sido o ELOVL2, que tem sido relacionado com a idade. Por outro lado, quando foi estudado individualmente por Zbieć-Piekarska et al. ⁽⁴⁰⁾, o MAD de estimativa de idade foi de 5.03 anos, podendo indicar que, quando utilizado isoladamente, este gene não terá tanta capacidade de predição quanto o esperado, podendo funcionar melhor em conjunto com outros genes também associados à idade. Um possível

conjunto de genes foi estudado por Freire-Aradas et al. ⁽³⁸⁾ que, para além do gene ELOVL2, utilizaram também os genes ASPA, PDE4C, FHL2, CCDC102B e C1orf132. Este apresentou bons resultados com um MAD de 3.07, mostrando melhorias na predição quando utilizado o gene ELOVL2 em conjunto com outros genes. Um conjunto diferente de genes foi usado por Zbieć-Piekarska ⁽³⁷⁾ que criou um modelo com ELOVL2, C1orf132, TRIM59, KFL14 e FHL2, este obteve um MAD ligeiramente superior ao ensaio referido anteriormente (3.4 anos), no entanto, comparativamente aos restantes estudos foi um dos que registou melhor resultado. Mais ensaios clínicos com o intuito de encontrar o melhor conjunto de genes, a partir dos que foram aqui apresentados, será um bom ponto de partida para se conseguir chegar a um modelo de predição de idade que poderá ser utilizado em amostras sanguíneas.

Relativamente aos esfregaços bucais e amostras de saliva, o estudo realizado por Eipel et al. ⁽⁴¹⁾ obteve um bom resultado de predição quando utilizados os genes ITGA2B, ASPA e PDE4C. Por outro lado, os genes PDE4C e ELOVL2, quando analisados por Fleckhaus et al. ⁽⁴³⁾, tiveram bons valores de correlação (entre 0.8 e 0.9). A utilização destes genes poderá ser possível na criação de um modelo de estimativa de idade, no entanto, mais ensaios serão necessários para se chegar ao conjunto de genes ideal para este tipo de amostras.

Quanto a amostras de sémen, foram utilizados em ambos os estudos os genes, TTC7B e NOX4 ^(8,45), onde se verificou resultados muito próximos, indicando que estes genes poderão ser os mais apropriados quando se trata deste tipo de amostras. Ainda assim, mais investigações são necessárias para se conseguir melhorar ainda mais a precisão.

Tendo como amostras os dentes, o modelo apresentado por Giulinani et al. ⁽⁴⁴⁾ utilizando três camadas dentárias foi aquele que apresentou melhores resultados, com um MAD de 1.20 anos, principalmente quando foi estudada a polpa e o cimento num só modelo, utilizando os genes ELOVL2, FHL2 e PENK. Estes genes poderão ser os indicados para amostras dentárias visto que os resultados obtiveram uma elevada predição em relação à estimativa de idade, no entanto, é ainda necessário aprofundar os estudos sobre este modelo.

Referências Bibliográficas

1. James SH, Nordby JJ, Bell S. *Forensic Science: An Introduction to Scientific and Investigative Techniques*. Fourth Edi. CRC Press; 2014. 146–148 p.
2. Figueiredo JM. Comparação de Métodos Dentários de Estimativa da Idade no Adulto - Aplicação a uma Amostra da População Portuguesa. 2008;1895:238. Available from: <http://repositorio.ul.pt/handle/10451/1016>
3. Schmelting A, Dettmeyer R, Rudolf E, Vieth V, Geserick G. Forensic Age Estimation: Methods, Certainty, and the Law. *Dtsch Aerzteblatt Online* [Internet]. 2016;44–50. Available from: <https://www.aerzteblatt.de/10.3238/arztebl.2016.0044>
4. Villa C, Lynnerup N. Age estimation of skeletal remains: principal methods. *Res Reports Forensic Med Sci*. 2014;4:3–9.
5. Cunha E, Wasterlain S. Capítulo V: Estimativa da idade por métodos dentários. *Imprensa da Univ Coimbra*. 2018;
6. Priyadarshini C, Puranik MP, Uma SR. Dental Age Estimation Methods: A Review METHODS OF AGE ESTIMATION. *Int J Adv Heal Sci*. 2015;1(12):19–25.
7. Grover N, Puri N, Arora S, Singh S, Singh N. Age estimation from physiological changes of teeth: A reliable age marker? *J Forensic Dent Sci*. 2014;
8. Lee JW, Choung CM, Jung JY, Lee HY, Lim SK. A validation study of DNA methylation-based age prediction using semen in forensic casework samples. *Leg Med* [Internet]. 2018;31(January):74–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2018.01.005>
9. Meissner C, Ritz-Timme S. Molecular pathology and age estimation. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2010 Dec;203(1–3):34–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073810003488>
10. C.Zapico S, Ubelaker DH. Applications of physiological bases of ageing to forensic sciences. Estimation of age-at-death. *Ageing Res Rev* [Internet]. 2013;12(2):605–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2013.02.002>
11. Calloway CD, Reynolds RL, Herrin GL, Anderson WW. The Frequency of Heteroplasmy in the HVII Region of mtDNA Differs across Tissue Types and Increases with Age. *Am J Hum Genet* [Internet]. 2000 Apr;66(4):1384–97. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002929707601645>
12. Gršković B, Zrnc D, Vicković S, Popović M, Mršić G. DNA methylation: The future of crime scene investigation? *Mol Biol Rep*. 2013;40(7):4349–60.
13. Dupont C, Armant DR, Brenner CA. Epigenetics: Definition, mechanisms and clinical perspective. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2009.
14. Vidaki A, Daniel B, Court DS. Forensic DNA methylation profiling - Potential opportunities and challenges. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2013;7(5):499–507. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.05.004>
15. Barbosa J, Jeremias G, Marques S, Gonçalves FJ, Pereira JL. O papel da epigenética na compreensão das respostas dos organismos dulçaquícolas às flutuações ambientais: teria Lamarck razão? *Captar* [Internet]. 2018;7(1):1–17. Available from: <http://revistas.ua.pt/index.php/captar/article/view/9051>
16. Vidaki A, Kayser M. From forensic epigenetics to forensic epigenomics: Broadening DNA investigative intelligence. *Genome Biol*. 2017;18(1):1–13.
17. Freire-Aradas A, Phillips C, Lareu M V. Forensic individual age estimation with DNA: From initial approaches to methylation tests. *Forensic science review*. 2017.
18. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99(3):247–57.
19. Bogdanović O, Lister R. DNA methylation and the preservation of cell identity. *Curr Opin Genet Dev*. 2017;46:9–14.
20. Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev*. 2014;28(8):812–28.
21. Lee HJ, Hore TA, Reik W. Reprogramming the methylome: Erasing memory and creating diversity. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2014;14(6):710–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.05.008>
22. Stansfield W, Colomé J, Cano R. *Biologia Molecular e Celular*. McGraw-Hill, editor. 1998.
23. Zampieri M, Ciccarone F, Calabrese R, Franceschi C, Bürkle A, Caiafa P. Reconfiguration of DNA methylation in aging. *Mech Ageing Dev* [Internet]. 2015;151:60–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2015.02.002>
24. Marttila S, Kananen L, Häyrynen S, Jylhävä J, Nevalainen T, Hervonen A, et al. Ageing-associated changes in the human DNA methylome: Genomic locations and effects on gene expression. *BMC Genomics*. 2015;16(1):1–17.
25. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biol*. 2015;13(1):1–8.
26. Mcclay JL, Aberg KA, Clark SL, Nerella S, Kumar G, Xie LY, et al. A methylome-wide study of aging using massively parallel sequencing of the methyl-CpG-enriched genomic fraction from blood in over 700 subjects. *Hum Mol Genet*. 2014;23(5):1175–85.
27. Wong DJ, Foster S a, Galloway D a, Reid BJ. Progressive Region-Specific De Novo Methylation of the p16 CpG Island in Primary Human Mammary Epithelial Cell Strains during Escape from M 0 Growth Arrest Progressive Region-Specific De Novo Methylation of the p16 CpG Island in Primary Human Mammary Epit. 1999;19(8):5642–51.
28. Benayoun BA, Pollina EA, Brunet A. Epigenetic regulation of ageing: Linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2015;16(10):593–610. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm4048>
29. Booth LN, Brunet A. The Aging Epigenome. *Molecular Cell*. 2016.
30. Avrahami D, Li C, Zhang J, Schug J, Avrahami R, Rao S, et al. Aging-dependent demethylation of regulatory elements correlates with chromatin state and improved β cell function. *Cell Metab*. 2015;22(4):619–32.
31. Sun D, Luo M, Jeong M, Rodriguez B, Xia Z, Hannah R, et al. Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. *Cell Stem Cell*. 2014;14(5):673–88.

32. Yuan T, Jiao Y, de Jong S, Ophoff RA, Beck S, Teschendorff AE. An Integrative Multi-scale Analysis of the Dynamic DNA Methylation Landscape in Aging. *PLoS Genet*. 2015;11(2):1–21.
33. Vidaki A, Ballard D, Aliferi A, Miller TH, Barron LP, Syndercombe Court D. DNA methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2017;28:225–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.009>
34. Bekaert B, Kamalandua A, Zapico SC, Voorde W Van De, Bekaert B. Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers Improved age determination of blood and teeth samples using a selected set of DNA methylation markers. 2015;2294(November):922–30.
35. Florath I, Butterbach K, Müller H, Bewerunge-hudler M, Brenner H. Cross-sectional and longitudinal changes in DNA methylation with age: An epigenome-wide analysis revealing over 60 novel age-associated CpG sites. *Hum Mol Genet*. 2014;23(5):1186–201.
36. Huang Y, Yan J, Hou J, Fu X, Li L, Hou Y. Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2015;17:129–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.007>
37. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Parys-Proszek A, Makowska Z, Pateczka A, et al. Development of a forensically useful age prediction method based on DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;17:173–9.
38. Freire-Aradas A, Phillips C, Mosquera-Miguel A, Girón-Santamaría L, Gómez-Tato A, Casares De Cal M, et al. Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. *Forensic Sci Int Genet*. 2016;24:65–74.
39. Weidner CI, Lin Q, Koch CM, Eisele L, Beier F, Ziegler P, et al. Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biol*. 2014;15(2).
40. Zbieć-Piekarska R, Spólnicka M, Kupiec T, Makowska Z, Spas A, Parys-Proszek A, et al. Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Sci Int Genet* [Internet]. 2014;14:161–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.10.002>
41. Eipel M, Mayer F, Arent T, Ferreira MRP, Birkhofer C, Gerstenmaier U, et al. Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific DNA methylation signatures. *Aging (Albany NY)*. 2016;8(5):1034–48.
42. Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sánchez FJ, Sinsheimer JS, Horvath S, et al. Epigenetic predictor of age. *PLoS One*. 2011;
43. Fleckhaus J, Freire-Aradas A, Rothschild MA, Schneider PM. Impact of genetic ancestry on chronological age prediction using DNA methylation analysis. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser* [Internet]. 2017;6(September):e399–400. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigs.2017.09.162>
44. Giuliani C, Cilli E, Bacalini MG, Pirazzini C, Sazzini M, Gruppioni G, et al. Inferring chronological age from DNA methylation patterns of human teeth. *Am J Phys Anthropol*. 2016;159(4):585–95.
45. Lee HY, Jung SE, Oh YN, Choi A, Yang WI, Shin KJ. Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: A preliminary study. *Forensic Sci Int Genet*. 2015;19:28–34.