



Rev Mex Med Forense, 2019, 4(1):43-52

ISSN: 2448-8011

Predicción de edad mediante la metilación del ADN

Artículo de Revisión

Age prediction using ADN methylation

Ana Sandoval Rivera ¹, Teresa de Jesús Lagunes Torres ²,
Carolina Barrientos Salcedo ³

Recibido: 18 Noviembre 2018, Aceptado: 15 Diciembre 2018, Publicado: 15 Enero 2019

¹ Química Clínica, Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana

² Bióloga, Máster en Investigación Clínica, Doctora en Neurootología, Universidad Veracruzana

³ Bióloga, Máster en Biología Celular, Doctora en Biología Molecular, Universidad Veracruzana

Corresponding author: Ana Sandoval Rivera, ana.sandoval92@hotmail.com

RESUMEN

La predicción de edad es una parte fundamental para la ciencia forense; con la determinación de esta se puede establecer un perfil más estrecho para la búsqueda de sospechosos o para la identificación de un cadáver. En diversos artículos basados en el estudio del genoma se ha informado que la metilación del ADN promete ser un marcador de alta precisión para la estimación de edad cronológica. En el presente estudio se analizaron artículos que diseñaron modelos experimentales de predicción de edad por medio de los patrones de metilación de genes característicos relacionados por la literatura al envejecimiento. A pesar de ser pocos los análisis que se han enfocado en la metilación del ADN para determinar la edad, en la gran mayoría de ellos se obtuvieron resultados favorables con una estadística de regresión multivariante; se estudiaron algunos de los cientos de sitios CpG; aunque un mayor número de sitios CpG pueden proporcionar una mayor precisión que un menor número de ellos, no se puede aplicar dicho enfoque dado que las muestras comúnmente encontradas en la escena del crimen suelen ser limitadas.

Palabras Clave: ADN, Forense, Metilación, Edad, Saliva, HumanMethylation450

SUMMARY

Chronological age estimation is a fundamental part for forensic science; it is used to establish a narrower profile for the search of suspects or for the identification of a corpse. In several articles based on the study of the genome it has been reported that ADN methylation promises to be a high precision marker for chronological age estimation. In the present study, articles that designed experimental models of age prediction were analyzed, including methylation patterns of characteristic genes related to the aging. In spite of the few analyzes that have focused on ADN methylation to determine age, in the great majority of them favorable results were obtained with a multivariate regression statistic; some of the hundreds of CpG sites were studied; although a greater number of CpG sites can provide greater accuracy than fewer CpG sites, such an approach can not be applied since the samples commonly found at the crime scene are usually limited.

Keywords: ADN, Forensics, Methylation, Age, Saliva, HumanMethylation450.

INTRODUCCIÓN

La edad se considera como el mayor factor para una amplia gama de condiciones clínicas frecuentes en la actualidad; es innegable que la supervivencia de la vejez ha aumentado

considerablemente durante el último siglo. (Murgatroyd, 2010; Marioni, 2018; Bell, 2012).

El envejecimiento humano es un proceso complejo caracterizado por la disminución global en las funciones fisiológicas (Garagnani, 2012; Bjornsson,

2008) y no puede ser comprendido por completo en términos de configuración genética; la epigenética se deriva como un medio alternativo para explicar las alteraciones asociadas a la edad. (Heyn, 2012; Teschendorff, 2018).

Diversos estudios realizados en insectos, particularmente en abejas de miel de abeja, han revelado que el mismo genoma se puede programar para producir trabajadores de vida corta o reinas de vida larga. Poco a poco la evolución nos ha hecho darnos cuenta de que los rasgos característicos de los organismos están formados fundamentalmente por la interacción de factores intrínsecos y extrínsecos (Murgatroyd, 2010; Meissner, 2010).

EPIGENÉTICA Y METILACIÓN

La epigenética ha llegado a imponerse como una disciplina que desempeña un papel importante en la predicción de edad en áreas de importancia médico forense (Hamano, 2017). En la actualidad las características externas que se manifiestan fenotípicamente y que se observan a simple vista son aquellas relacionadas al pigmento como la coloración de ojos y pelo; sin embargo, la edad suele ser una característica digna de mencionar puesto que puede relacionarse a la etnicidad y predecir la apariencia. (Sae, 2017; Steegenga, 2014).

Para determinar la edad de una persona partiendo del Ácido Desoxirribonucleico (ADN) se han mencionado métodos moleculares que están basados en el análisis del acortamiento de telómeros y la delección del ADN mitocondrial; recientemente se

incluyeron los círculos de señalización conjunta de escisión del receptor de celular T (sjTREC) y la metilación del ADN como biomarcadores que prometen una alta precisión de predicción (Sae, 2017; Ward, 2018; Jung, 2017).

A nivel global, diversos estudios han demostrado que la metilación del ADN disminuye con el envejecimiento en los tejidos humanos como consecuencia de una pérdida progresiva de la ADN metiltransferasa tipo 1a (DNMT1a). Sin embargo, también se han reportado loci de genes específicos que sufren hipermetilación durante el envejecimiento. (McEwen, 2018).

Por otra parte, la metilación asociada a la edad, no solo está basada en el deterioro al azar durante el desarrollo odontológico; investigadores han podido relacionar la edad cronológica con cambios en la metilación del ADN y se han registrado algunos marcadores de metilación que prometen ser buenos predictores epigenéticos de envejecimiento (Shao, 2014; Bocklandt, 2011). En general, se cree que la presencia del ADN metilado provoca el silenciamiento de genes que afectan la estructura cromática, por lo que los sitios donde se observa metilación son críticos para las funciones celulares; por otro lado, también existen loci que son menos estables o que ya no es necesaria su expresión; estos loci suelen ser más propensos a cambios en su estado de metilación con el tiempo y debido a factores ambientales y modificaciones epigenéticas espontáneas. (Alghanim, 2017; Rakyan, 2018).

Hasta ahora la metilación es el mecanismo epigenético mejor caracterizado; la metilación se lleva a cabo mediante la unión de un grupo metilo (-

CH3) al nucleótido citosina de la cadena de ADN convirtiéndose en 5-metilcitosina; este proceso suele presentarse en sitios ricos en citosina y guanina unidos por un grupo fosfato (CpG); dicha unión se establece durante la ontogenia del mamífero y puede ser replicado durante la división celular por mantenimiento de ADN metiltransferasas tipo 1 (Bork, 2010; Hernandez, 2011).

IMPLICACIONES FORENSES

En el área forense, poder determinar la edad es una de las claves más importantes para los investigadores cuando se trata del seguimiento y resolución de un crimen; para la medicina forense, la estimación de edad exacta tiene un valor similar a las características visibles externamente o de ascendencia biogeográfica. (Zbiec, 2015; Vidaki, 2017).

La edad cambia la apariencia de un individuo notablemente, lo que influye y aporta información para la recreación de bocetos de sospechosos desconocidos; cambios como calvicie masculina o un ligero cambio de coloración en el pelo suelen de ser de importancia para estrechar el rango de búsqueda en casos criminales (Zbiec, 2015; Kayser, 2015).

La estimación de la edad humana ha sido motivo de investigación durante muchos años y la llegada de métodos moleculares ha logrado un gran impacto forense; esto se ha debido a que los métodos convencionales para estimación de edad se basan en técnicas antropológicas que analizan marcadores óseos como huesos y dientes, con un margen de error aceptable; sin embargo, las estimaciones se ven limitadas a la existencia del esqueleto, descartando

muestras comúnmente encontradas en escenas del crimen como fluidos corporales o cabello (Zbiec, 2015; Sae, 2018; Eipel, 2016).

La mayoría de los artículos analizados se basan en la predicción de edad cronológica mediante fluidos que son comúnmente encontrados en escenas del crimen (semen, sangre y saliva). Sae et al (2017) realizaron un estudio predictivo basado en muestras de saliva de 54 individuos, de los cuales se identificaron marcadores de CpG que mostraron una alta correlación entre la metilación y la edad. Debido a que los marcadores asociados a la edad de la saliva diferían de las de la sangre, se investigaron los patrones de metilación de ADN de 6 marcadores de CpG (cg00481951, cg19671120, cg14361627, cg08928145, cg12757011, y cg07547549 de los genes SST, CNGA3, KLF14, TSSK6, Tbr1, y SLC12A5 respectivamente) en un conjunto independiente de muestras de saliva de 226 individuos de 18 a 65 años. La saliva fue recogida con el kit de auto-colección Orangene, almacenados a temperatura ambiente; la extracción de ADN se realizó utilizando el QIAmp1 ADN Mini Kit para posteriormente realizar la metilación del ADN de todo el genoma de saliva usando la matriz HumanMethylation450 BeadChip (Sae, 2017).

Shao et al (2014) identificaron 8 fragmentos de genes obtenidos de muestras de sangre, en los que el grado de metilación estaba significativamente relacionado con la edad; las muestras analizadas fueron proporcionadas por 40 donantes voluntarios hombres y 25 donantes voluntarias mujeres con un rango de edad de entre 11 y 72 años. Los fragmentos de ADN aislados se clonaron en pMD 19-T Vector y posteriormente

cuantificados por secuenciación con bisulfito utilizando el kit EZ metilación del ADN y se secuenciaron con un analizador genético 3730. Para cada donante, 10 segmentos clonados de cada fragmento se aislaron y se secuenciaron; la fracción metilada de cada CpG se promedió entre los 10 segmentos clonados.

Heyn et al (2012) plantearon una duda razonable: ¿Los individuos en los puntos más extremos de sus vidas tenían diferencias en la metilación del ADN? Debido a ello realizaron la secuenciación con bisulfito de los genomas de recién nacidos y centenarios con un CpG microarray 450000. Las muestras de sangre en recién nacidos se obtuvieron del cordón umbilical utilizando ADN extraído de células T CD4 procesados a través de un analizador genómico Illumina Human-Omni5 Quad BeadChip. En este sentido, Hamano et al (2017) reportaron un modelo predictivo de edad basado en la metilación de citosina en sitios CpG obtenidos de muestras de sangre con 71 marcadores de metilación del Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip. Garagnani et al (2012) informaron un modelo predictivo basado en Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip con una pequeña cohorte de 64 individuos de diferentes edades.

En la literatura podemos encontrar artículos donde se analizaron diversas muestras que en su mayoría pertenecen a fluidos corporales; las muestras fueron obtenidas por donantes voluntarios recogiendo células bucales usando hisopos de algodón, obtención de sangre por pinchazo en el dedo recogiendo las células sanguíneas con cotonetes, o muestras de semen de voluntarios masculinos (Silva, 2016; Jenkins, 2018). En estudios donde se recolectaron exclusivamente muestras de sangre, como lo reportado por Park et al

(2016), JL. Y colaboradores, las muestras se obtuvieron de una cohorte compuesta de más de 300 hombres y 300 mujeres con una distribución de grupos de edad de 10 años cada grupo (rango entre 11 y 90 años). Para demostrar la versatilidad de los análisis moleculares basados en la metilación del ADN se encontraron artículos donde se analizaron células madre mesenquimales y fibroblastos para lograr determinar cambios asociados a la edad en tejidos primarios incluyendo dermis, epidermis o una citología cervical. (Koch, 2011).

Para seleccionar un conjunto de variables para el uso de la construcción de un modelo predictivo de edad se suelen utilizar los datos de 62 sitios CpG. El modelo de regresión explica el 96.9% de la varianza total en 54 varones con un error de 3.83 años. Un análisis posterior del gen *ptpn7* informó que dicho gen muestra muy bajo valor predictivo en sangre, pero un valor muy alto en las células epiteliales bucales (0,05 y 0,82, respectivamente).

En un conjunto independiente de 226 individuos utilizando un ensayo de metilación SNaPshot multiplex se reportó un patrón de metilación altamente relacionado con la edad, la cual puede explicar el 63.5% y 54.9% de la varianza de edad. Los sitios CpG más correlacionados se hallaron en el gen *KLF14* y *SLC12A5* (Sae, 2017). Heyn et al (2012) reportaron que las muestras de los individuos de la tercera edad mostraron una correlación menor en términos del estado de metilación de CpG en comparación con las muestras de recién nacidos dado que eran más homogéneamente metilados en CpG. Desde el punto de vista de los genes reguladores, una de las principales características de las muestras centenarias es su baja densidad de metilación del ADN

en promotores pobres en CpG; los hallazgos de Heyn et al fueron validados con una cohorte más amplia de individuos recién nacidos y nonagenarios utilizando un ADN CpG K microarray 450. Los resultados fueron una evidencia clara de la diferencia significativa entre los patrones de metilación de los extremos de la vida humana.

En los estudios de Hamano et al (2017) se observó que los perfiles de metilación de los genes ELOVL2 y EDARADD tienen una alta correlación con la edad y se utilizaron para predecir la edad con una regresión de vectores de soporte. Se informa por primera vez que el gen ELOVL2 es un marcador predictivo de edad para las muestras de saliva. El modelo de predicción evidenció una alta precisión de predicción de edad con una desviación media absoluta a partir de la edad cronológica de 5.96 años entre 197

muestras. El modelo fue validado con un estudio adicional de 50 muestras con una desviación media absoluta de 6.25 años. El modelo de predicción de edad se probó nuevamente en muestras de saliva obtenida de colillas de cigarrillos, representando una obtención de muestra recurrente en una escena del crimen real con una desviación media absoluta de 7.65 años; para estas muestras se reflejó un resultado ligeramente mayor a de las muestras de saliva que se recolectaron de manera intacta.

En la mayor parte de los estudios analizados se observó una correlación alta entre los patrones de metilación y la predicción de edad cronológica con una desviación media absoluta que no excede los 9.0 años en los modelos de predicción (Tabla 1)

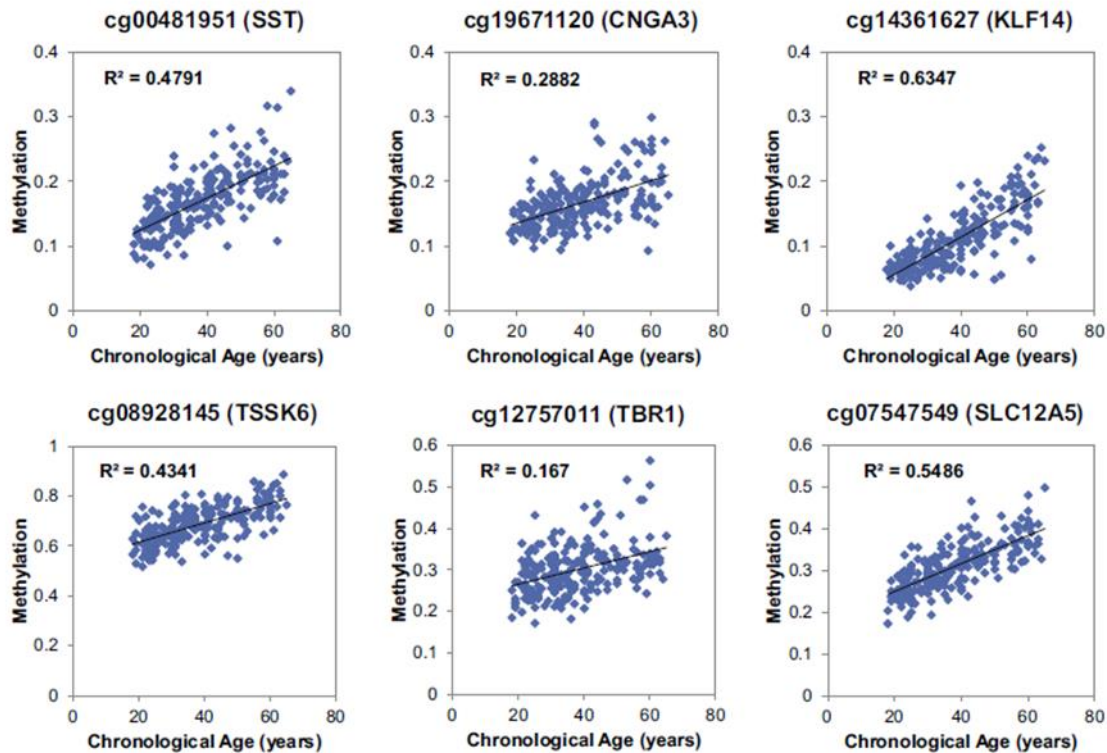


Tabla 1. Correlación entre la edad y la metilación en 6 sitios CpG, uno en cada uno de los genes SST, CNGA3, KLF14, TSSK6, TBR1 y SLC12A5 en 226 muestras de saliva. El nivel de metilación del ADN se determinó mediante la reacción SNaPshot de metilación multiplexada (tomada de Sae et al, 2017).

CONCLUSIÓN

Con base en los resultados favorecedores y prometedores en cuanto a la correlación de los patrones de metilación y la edad cronológica podemos concluir que los avances en la tecnología y la biología molecular pueden convertirse en herramientas de suma importancia para los estudios forenses.

En general, las investigaciones forenses dependen de las herramientas que puedan proporcionar información con respecto a las evidencias encontradas en la escena del crimen; en muchos de los casos donde los cadáveres no son identificados por el estado en el que se encuentran o debido a la severidad del crimen, resulta

imposible realizar las técnicas comunes de predicción de edad.

Los perfiles de ADN se comparan con sospechosos; sin embargo, en muchos países no se cuenta con una base de datos y en donde existen suelen ser incompletas. Es por ello por lo que se recurre a técnicas moleculares como marcadores epigenéticos para aportar información que ayude a la resolución de los casos forenses.

La metilación del ADN ha demostrado ser un marcador epigenético prometedor, con una alta precisión en modelos de predicción de ADN, el cual tiene la versatilidad de adaptarse para una gran gama de muestras recurrentes en escenas del crimen. Sin embargo, también

es importante mencionar que el proceso para la realización de modelos de predicción de edad por metilación del ADN requiere técnicas y equipos con los que los laboratorios forenses no suelen contar y/o realizar de manera cotidiana, lo que implica costos adicionales y capacitación adecuada del personal.

Otra condición importante que debe ser tomada en cuenta es que al ser la metilación un mecanismo epigenético regulador de la expresión génica, los análisis de predicción de edad no pueden basarse por completo en los resultados obtenidos de los estudios previos, ya que los grupos poblacionales se exponen a diversos factores ambientales que pudiesen cambiar la regulación génica y por lo tanto los patrones de metilación.

Cada grupo de población debe ser secuenciado y analizado para estandarizar no solo la técnica, sino también los parámetros de referencia a seguir para la interpretación de los resultados.

REFERENCIAS

1. Vidaki, et al., ADN methylation-based forensic age prediction using artificial neural networks and next generation sequencing, *Forensic Sci. Int. Genet.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.02.009>
2. Bell, JT., et al. (2012). Epigenome-Wide Scans Identify Differentially Methylated Regions for Age and Age-Related Phenotypes in a Healthy Ageing Population. *PLoS GENETICS*, 8, pp. 1-12.
3. Bjornsson, HT., et al. (2008). Intra-individual Change Over Time in ADN Methylation With Familial Clustering. *American Medical Association*, 299, pp. 2877-2883.
4. Bocklandt, S., et al. (2011). Epigenetic Predictor of Age. *PLoS one*, 6, pp. 1-6.
5. Bork, S., et al. (2010). ADN methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell*, 9, pp. 54-63.
6. Eipel, M., et al. (2016). Epigenetic age predictions based on buccal swabs are more precise in combination with cell type-specific ADN methylation signatures. *AGING*, 8, pp. 1034-1044.
7. Garagnani, P., et al. (2012). Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell*, 11, pp. 1132-1134.
8. Hamano, Y., Manabe, S., Morimoto, C., Fujimoto, S., & Tamaki, Keiji. (2017). Forensic age prediction for saliva samples using methylationsensitive high resolution melting: exploratory application for cigarette butts. *Scientific Reports*, 7, pp. 1-8.
9. Hernandez, DG., et al. (2011). Distinct ADN methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Human Molecular Genetics*, 20, pp. 1164-1172.
10. Heyn, H., et al. (2012). Distinct ADN methylomes of newborns and centenarians. *PNAS*, 109, pp. 10522-10527.

11. Hussain Alghanim, Joana Antunes, Deborah Soares Bispo Santos Silva, Clarice Sampaio Alho, Kuppareddi Balamurugan, Bruce McCord, Detection and evaluation of ADN methylation markers found at SCGN and KLF14 loci to estimate human age, *Forensic Science International: Genetics* <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.07.011>
12. Jenkins, TG., Aston, KI., Cairns, B., Smith, A., & Carrell, DT. (2018). Paternal germ line aging: ADN methylation age prediction from human sperm. *BMC Genomics*, 19, pp. 1-10.
13. Jung, SE., Shin, KJ., & Lee, Hwan, YL. (2017). ADN methylation-based age prediction from various tissues and body fluids. *BMB Reports*, 50, 546-553.
14. Kayser, M. (2015). Forensic ADN Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Science International: Genetics*, 18, pp. 33-48.
15. Koch, CM., & Wagner, W. (2011). Epigenetic-aging-signature to determine age in different tissues. *AGING*, 3, pp. 1-10.
16. Marioni, RE., Belsky, DW., Deary, IJ., & Wagner, W. (2018). Association of facial ageing with ADN methylation and epigenetic age predictions. *Clinical Epigenetics*, 10, pp. 1-3.
17. McEwen, LM., et al. (2018). Systematic evaluation of ADN methylation age estimation with common preprocessing methods and the Infinium MethylationEPIC BeadChip array. *Clinical Epigenetics*, 10, pp. 1-9.
18. Meissner, C., & Ritz-Timme. (2010). Molecular pathology and age estimation. *Forensic Science International*, 203, pp. 34-43.
19. Murgatroyd, C., Wu, Y., Bockmühl, Y., & Spengler, D. (2010). The Janus face of ADN methylation in aging. *AGING*, 2, pp. 107-110.
20. Park, JL., et al. (2016). Identification and evaluation of age-correlated ADN methylation markers for forensic use. *Forensic Science International: Genetics*, 23, pp. 64-70.
21. Rakyán, VK., et al. (2018). An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome Research*, 27, pp. 1518-1529.
22. Sae, RH., Kyoung, JS., Sang, EJ., Eun, HL., & Hwan, YL. (2018). Platform-independent models for age prediction using ADN methylation data. *Forensic Science International: Genetics*, 38, pp. 39-47.
23. Sae, RH., Sang, EJ., Eun HL., Kyoung, JS., Woo, IY., & Hwan YL. (2017). ADN methylation-based age prediction from saliva: High age predictability by combination of 7 CpG markers. *Forensic Science International: Genetics*, 29, pp. 118-125.

24. Shao, HL., Long, CX., Kun, M., Rong, ZY., & Dai, XH. (2014). Isolation and identification of age-related ADN methylation markers for forensic age-prediction. *Forensic Science International: Genetics*, 11, pp. 117-125.
25. Silva, D., Antunes, J., Balamurugan, K., Duncan, G., Alho, CS., & McCord, B. (2016). Developmental validation studies of epigenetic ADN methylation markers for the detection of blood, semen and saliva samples. *Forensic Science International: Genetics*, 23, pp. 55-63.
26. Steegenga, WT., et al. (2014). Genome-wide age-related changes in ADN methylation and gene expression in human PBMCs. *Springer*, 36, pp. 1523-1540.
27. Teschendorff, AE., et al. (2018). Age-dependent ADN methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Research*, 27, pp. 440-446.
28. Ward, C. et al. (2018). Age-related ADN methylation and hemostatic factors. *www.bloodjournal.org*, 132, p. 1736.
29. Zbiec-Piekarska, R. et al. (2015). Development of a forensically useful age prediction method based on ADN methylation analysis. *Forensic Science International: Genetics*, 17, pp. 173-179.
30. Zbiec-Piekarska, R. et al. (2015). Examination of ADN methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science. *Forensic Science International: Genetics*, 14, pp. 161-167.

