



Diferenciação Genética de Gêmeos Monozigóticos: Uma Importante Evidência para Área Forense

Genetic Differentiation of Monozygotic Twins: An Important Evidence for Forensic Area

Laís Ubaldo Antonio¹, Margaret Mitiko Inada Pereira¹,
Joyce Aparecida Martins Lopes Ferraz²

¹ Instituto Paulista de Estudos Bioéticos e Jurídicos, Ribeirão Preto, SP, Brasil

² Laboratório de Investigação de Paternidade, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, SP, Brasil

Received 01 April 2017

Resumo. Gêmeos monozigóticos (MZ) derivam de um único zigoto e geralmente são indistinguíveis pela realização do teste genético padrão, o qual avalia marcadores do tipo repetições curtas consecutivas (*Short Tandem Repeats, STR*) que apenas confirmam a monozigosidade destes indivíduos. Contudo, outros marcadores genéticos estão sendo analisados para a diferenciação dos mesmos. O objetivo do presente artigo é apresentar, através de uma revisão bibliográfica, as tecnologias utilizadas para se obter a diferenciação de gêmeos MZ e as evidências genéticas que corroboram tais dados. Para isso, foram selecionados 68 artigos científicos sendo que seis destes tratavam especificamente do referido tema, mostrando a deficiência de estudos nesta área. Os descritores utilizados foram DNA, gêmeos monozigóticos, genética e diferenciação celular. Apenas em um caso, um padrão tri-alelético extremamente raro no marcador STR vWA foi utilizado para solucionar um caso criminal com gêmeos MZ. Por outro lado, a análise de polimorfismos de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*) nucleares e do perfil de metilação do DNA têm se mostrado eficientes na diferenciação de gêmeos MZ. Além disso, a genotipagem do DNA mitocondrial também revelou diferentes perfis de SNPs entre estes indivíduos, com a vantagem do sequenciamento do genoma mitocondrial ser mais barato que o nuclear e ter maior possibilidade de tipagem em amostras com DNA degradado ou

ausente. A identificação de SNPs em diferentes tecidos possibilitou detectar mutações capazes de diferenciar gêmeos MZ auxiliando em investigações de paternidade pois tais mutações podem ser herdadas pelos filhos.

Palavras-Chave: DNA; Genética forense; Identificação humana; Gêmeos monozigóticos.

Abstract. Monozygotic (MZ) twins are derived from a single zygote and are generally indistinguishable by performing the standard genetic test, which evaluates short tandem repeats (STR) markers that only confirm the monozygosity of these individuals. However, other genetic markers are being analyzed for their differentiation. The objective of this paper is to present, through a bibliographic review, the technologies used to obtain the differentiation of MZ twins and the genetic evidences that corroborate such data. For this, 68 scientific articles were selected, six of which dealt specifically with this topic, showing the lack of studies in this area. The descriptors used were DNA, monozygotic twins, genetics and cell differentiation. In only one case, an extremely rare tri-allelic pattern on the STR vWA marker was used to solve a criminal case with MZ twins. On the other hand, the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) and the DNA methylation profile have been shown to be efficient in the differentiation of MZ twins. In addition, genotyping of mitochondrial DNA also revealed different SNP profiles among these individuals, with the advantage of mitochondrial genome sequencing being cheaper than nuclear and being more likely to be typed in samples with degraded or missing DNA. The identification of SNPs in different tissues made it possible to detect mutations capable of differentiating MZ twins by assisting in paternity investigations since such mutations can be inherited by the offspring.

Keywords: DNA; Forensic genetics; Human identification; Monozygotic twins.

1. Introdução

O perfil genético corresponde à sequência de ácido desoxirribonucléico (DNA) característica de um único indivíduo e sua alta variabilidade decorre de polimorfismos do genoma, sendo improvável a existência de dois indivíduos com o mesmo perfil genético, a não ser em caso de gêmeos univitelinos.

Os gêmeos são crianças nascidas no mesmo parto, ou seja, da mesma mãe e geralmente no mesmo dia. Eles podem ser de dois tipos: monozigóticos (MZ) e dizigóticos (DZ). Gêmeos MZ, também conhecidos como idênticos ou univitelinos, são consequência da fertilização de um único óvulo. Após esta etapa, ocorre a formação do zigoto, o qual sofre sucessivas clivagens até a formação da blástula, passando pelo estágio de mórula. Este estágio se caracteriza por uma esfera maciça de células que sofre separação no início do desenvolvimento embrionário,

originando os gêmeos MZ. Por outro lado, gêmeos DZ, também conhecidos como fraternos ou bivitelinos, são consequência da fertilização de dois óvulos diferentes no mesmo ciclo ovariano, podendo ser do mesmo sexo ou de sexos diferentes e são parecidos tanto quanto dois irmãos quaisquer.

Em relação à diferenciação de gêmeos MZ, a identificação humana pela análise das impressões digitais permite tal diferenciação, uma vez que a formação destas se inicia no sétimo mês de gestação e é influenciada pelo fluxo de fluidos amnióticos em volta do feto e a posição deste dentro do útero. Assim, as células das pontas dos dedos crescem em um micro-ambiente que é ligeiramente diferente de mão para mão e de dedo para dedo¹. Em estudos dermatológicos, embora gêmeos MZ possuam a máxima similaridade entre impressões digitais; estima-se que apenas 95% das características destas sejam iguais nestes indivíduos².

No caso da análise genética, em virtude do DNA estar presente em todas as células nucleadas do organismo humano e da sua estabilidade química, considerando-se os diferentes tipos de amostras biológicas passíveis de serem deixadas em cena de crime, tal análise é o método mais poderoso na investigação forense. Atualmente, utiliza-se de 16 a 24 *loci* do tipo repetições curtas consecutivas (*Short Tandem Repeats, STR*) para se estabelecer relações de parentescos, bem como identificar uma amostra biológica deixada em cena de crime^{3,4}. No entanto, gêmeos MZ geralmente possuem perfis idênticos para os STRs e, assim, casos de paternidade ou criminais envolvendo tais indivíduos como alegados pais e suspeitos, respectivamente, não podem ser solucionados por esta tecnologia.

Considerando-se que a probabilidade de gêmeos MZ é de, aproximadamente, 3 em 1.000 nascimentos⁵ e taxa semelhante (3,5 e 4 para cada mil nascimentos) foi observada por Trevisan e Tunes (2014)⁶, diferenciar tais indivíduos geneticamente é de extrema relevância para o campo forense. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão da literatura a fim de se apresentar evidências genéticas que confirmam a diferenciação de gêmeos monozigóticos, bem como tecnologias utilizadas para se obter tais dados.

2. Métodos

Para a realização do levantamento bibliográfico foi adotada a pesquisa de artigos científicos em periódicos nacionais e internacionais, no período de 1977 a 2015, disponíveis nas bases de dados pertencentes à Biblioteca Virtual em Saúde (BVS),

Scientific Electronic Library Online (SCIELO), PubMed e Google Acadêmico. Os descritores utilizados foram: DNA; gêmeos monozigóticos; genética; diferenciação celular.

3. Revisão bibliográfica

Um total de seis trabalhos científicos voltados para a aplicação forense foram selecionados. Dentre estes, a diferenciação genética de gêmeos MZ foi realizada pelo estudo de marcadores SNP e do padrão de metilação de regiões genéticas, havendo apenas um caso raro envolvendo STRs.

3.1 Tecnologias

As tecnologias aplicadas para a discriminação alélica do SNP foram o sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*, NGS), cujos resultados foram confirmados pelo sequenciamento de Sanger. No caso do padrão de metilação, este foi avaliado pela Análise de Curva de Dissociação de Alta Resolução (*High-Resolution Melting Curve Analysis*, HRMA), pelo NGS por pirosequenciamento do DNA metilado ou pelo NGS por síntese do DNA metilado imunoprecipitado (*Methylated DNA Immunoprecipitation*, MeDIP). Tais metodologias são apresentadas a seguir.

3.1.1 Sequenciamento de Sanger

Consiste na síntese enzimática de cadeias truncadas a partir de um fragmento de DNA molde^{1,7}. A síntese das cadeias truncadas é realizada pelo uso de didesoxirribonucleotídeos trifosfatados (ddNTPs), os quais não possuem o grupo 3'-OH presente nos desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) e necessário para a incorporação de novo nucleotídeo a fita que está sendo sintetizada⁷.

Cada fita de DNA será sequenciada separadamente, utilizando-se fragmento de DNA molde, *primer* (iniciador), nucleotídeos ddNTPs e dNTPs, enzima DNA polimerase⁷. O sequenciamento será realizado em vários ciclos em que, inicialmente, há a desnaturação do fragmento de DNA de dupla cadeia, originando-se as cadeias molde para a síntese in vitro do DNA, o primer é anelado a sua cadeia específica e a enzima incorpora o ddNTP ou dNTP à nova fita. Quando, aleatoriamente, um ddNTP é colocado na posição do dNTP correspondente, tem-se o término da polimerização da respectiva fita. A inclusão de marcadores

fluorescentes com diferentes cores para cada tipo de ddNTP permite a distinção das cadeias truncadas pela respectiva fluorescência⁷.

3.1.2 Sequenciamento de nova geração

Trabalhos selecionados neste estudo para avaliar a diferenciação genética de gêmeos MZ utilizaram o sequenciamento de nova geração (NGS) por pirosequenciamento ou síntese (plataforma *Illumina Genome Analyser-HiSeq*).

No NGS por pirosequenciamento, o fragmento de DNA em simples fita é anelado ao *primer* de sequenciamento, iniciando-se a extensão da nova fita. Cada um dos quatro nucleotídeos é adicionado individualmente na reação e, quando este é complementar a base do DNA molde fita simples, a DNA polimerase o incorpora à fita em crescimento, liberando um pirofosfato. Este, por sua vez, é convertido em uma molécula de adenosina trifosfato (ATP) que é utilizada pela enzima luciferase para oxidar a luciferina e produzir luz, detectada e registrada pelo equipamento na forma de um pico. A altura do pico é proporcional ao número do respectivo nucleotídeo incorporado à fita em síntese⁸.

No NGS por síntese (plataforma *Illumina Genome Analyser-HiSeq*), as sequências a serem determinadas são convertidas numa biblioteca de sequenciamento especial, na qual os fragmentos de DNA são ligados a adaptadores em suas extremidades. Oligonucleotídeos fixados em uma célula de fluxo se hibridizam a tais adaptadores nos fragmentos de DNA simples fita e por um processo de amplificação por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) em ponte (*bridge PCR*) há a síntese da nova molécula de DNA. Esta amplificação é repetida várias vezes e cria aglomerados de cópias da sequência original, as quais serão sequenciadas por método semelhante ao Sanger⁹.

3.1.3 Metilação do DNA

A metilação do DNA consiste no acréscimo de grupos metil normalmente à posição do carbono 5 do anel da citosina, levando à formação de 5-metilcitosina¹⁰. Nos mamíferos, em geral esta adição ocorre à citosina do dinucleotídeo CG, conhecidos como CpG (citosina-fosfato-guanina)¹¹. Algumas regiões do DNA são ricas em sequências dinucleotídicas CpG, formando as chamadas ilhas CpG¹¹.

A identificação do padrão de metilação do DNA pode ser realizada em nível de um específico gene ou do genoma¹⁰. No primeiro caso, o DNA extraído é tratado

com bissulfito, promovendo a conversão de todas as citosinas não metiladas em uracilas, e citosinas metiladas resistem à conversão. O DNA tratado (convertido e não convertido) será amplificado por PCR pelo uso de *primers que* flanqueiam uma região de interesse e que não possuem sítios CpG, mas possuem citosinas não CpG para a amplificação específica tanto do DNA convertido como do não convertido¹². No *amplicon*, as citosinas não metiladas (convertidas em uracilas) serão representadas por timina na fita direta e, as citosinas metiladas (não convertidas), por citosina na fita direta.

Os *amplicons* podem então ser analisados por Curva de Dissociação de Alta Resolução (*High-Resolution Melting Curve Analysis*, HRMA) ou NGS por pirosequenciamento¹. No HRMA, a amplificação da região de interesse do DNA tratado com bissulfito é realizada pela reação de PCR quantitativo em tempo real (*quantitative real time PCR*, qPCR), na presença de um intercalante fluorescente de DNA dupla fita (exemplo: SYBR Green). Posteriormente, o produto amplificado é submetido ao aumento gradativo da temperatura, liberando o intercalante na dissociação da fita dupla de DNA para fita simples e, conseqüentemente, diminuindo a emissão de fluorescência. A temperatura de dissociação ou *melting temperature* corresponde à temperatura em que 50% das fitas duplas de DNA estão dissociadas em fita simples.

Uma vez que no DNA timina está ligada à adenina por duas pontes de hidrogênio e citosina à guanina por três pontes de hidrogênio, quanto maior o conteúdo de citosina e guanina no *amplicon*, maior será sua temperatura de dissociação. Desta forma, sequências de DNA não convertidas por bissulfito (regiões metiladas) apresentam maiores temperaturas de dissociação do que as convertidas (regiões não metiladas). Portanto, diferentes padrões de metilação em um específico gene produz diferentes temperaturas de dissociação, as quais podem ser utilizadas na discriminação de gêmeos monozigóticos. No entanto, não é possível identificar o padrão de metilação em cada sítio CpG e sim na região amplificada como um todo.

Na análise do padrão de metilação de uma região específica do DNA pelo método NGS por pirosequenciamento, o DNA tratado com bissulfito é amplificado para a região de interesse pela PCR, na qual o *primer* reverso está marcado com biotina, possibilitando que o *amplicon* biotinilado seja posteriormente purificado por esferas de estreptavidina e desnaturado para gerar a simples fita de DNA necessária no NGS por pirosequenciamento.

O padrão de metilação em nível genômico pode ser identificado pelo NGS por síntese do DNA metilado imunoprecipitado (*Methylated DNA Immunoprecipitation*, MeDIP). Neste método, o DNA extraído é sonicado, produzindo randômicos fragmentos de 200 a 900 pb. Estes fragmentos são preparados para a elaboração de bibliotecas genômicas, realizando-se a reparação das extremidades dos fragmentos, adição de adenina na extremidade 3' e ligação do fragmento à adaptadores terminais. O fragmento de DNA ligado ao adaptador é imunoprecipitado por um anticorpo primário monoclonal de camundongo anti 5-metilcitosina; posteriormente, o complexo formado pelo DNA metilado-anticorpo é capturado por partículas magnéticas revestidas com um anticorpo secundário anti-IgG e o DNA não ligado é descartado no sobrenadante mediante várias lavagens. Um tampão com proteinase K é utilizado para digerir o anticorpo e liberar os fragmentos de DNA metilados, os quais são amplificados por PCR com um par de *primers* que se anela à sequência dos adaptadores terminais. Os *amplicons* são separados por eletroforese em agarose para seleção de fragmentos com 300 a 1.000 pb, os quais serão utilizados no NGS por síntese¹³.

3.2 Evidências genéticas da diferenciação de gêmeos monozigóticos

Para que as mutações tenham a capacidade de diferenciar gêmeos MZ, estas devem ser produzidas após a divisão da mórula ou antes da separação desta, porém, com exclusiva presença nas células que mais tarde irão pertencer apenas a um dos gêmeos^{14,15}. Além disso, somente quando a mutação está presente nas células germinativas de um indivíduo é que esta poderá ser herdada pelo seu filho, possibilitando o estabelecimento da relação de paternidade¹⁵.

Potenciais mutações, presentes em células somáticas e germinativas, estas transferidas ao filho, foram estudadas no trabalho de Weber-Lehmann et al. (2014)¹⁴, o qual envolveu um par de gêmeos e o filho de um deles com sua respectiva mãe. Para tanto, utilizou-se o método NGS com confirmação dos dados por meio da PCR seguida de sequenciamento por Sanger¹⁴. Foram reportados 12 SNPs específicos do gêmeo pai e seu filho, sendo que cinco destes foram considerados potenciais, pois os demais apresentaram a sequência ao redor do respectivo SNP (em torno de 100 pb) mais de uma vez no genoma.

Pelos dados genotípicos obtidos, pode-se concluir que as mutações na criança não foram herdadas da mãe e o perfil não mutado do gêmeo tio confirmam

que as mesmas foram geradas logo após a divisão do zigoto, permitindo a diferenciação dos gêmeos MZ. Além disso, a presença das mutações em diferentes tecidos do gêmeo pai auxiliaram no conhecimento da história de formação destas. Assim, mutações presentes no esperma e mucosa bucal (3 dos 5 SNPs), mas não no sangue, indicam que estas foram formadas após a gastrulação (etapa que procede a blastulação, formando-se as três camadas germinativas: ectoderme, mesoderme e endoderme), mas antes da separação em células da mucosa bucal e precursores do esperma. Além disso, uma vez que a maioria das mutações foram encontradas na mucosa bucal e esperma, e por ser legalmente e eticamente aceita a amostragem bucal na prática forense, tais autores sugerem este material como o primeiro a ser analisado na diferenciação de gêmeos MZ¹⁴.

Como mencionado, marcadores STR apresentam alto poder de discriminação e estabilidade, sendo os *loci* de escolha em exames de DNA, no entanto, não permitem diferenciar gêmeos MZ. Em um caso de estupro seguido de assassinato e envolvendo um suspeito gêmeo MZ, coletou-se amostra de sêmen na cena do crime, não havendo outros materiais biológicos disponíveis para análise. Genotipagem de amostra sanguínea dos gêmeos para 15 *loci* STR e o *locus* amelogenina revelou um padrão tri-alélico raro para o marcador vWA (alelos 16, 18 e 19) no irmão gêmeo do suspeito, mas não no mesmo, permitindo diferenciá-los e excluindo o irmão gêmeo do suspeito do referido caso. A mutação foi confirmada no esperma e mucosa bucal do irmão gêmeo, sugerindo que a mesma ocorreu após a divisão do blastocisto, mas antes da gastrulação¹⁶.

Os dados reportados por Weber-Lehmann et al. (2014)¹⁴ e Wang et al. (2015b)¹⁶, mostram que o esperma e a mucosa bucal foram tecidos afetados por mutações após a divisão do zigoto, as quais geralmente ocorreram antes destes tecidos se diferenciarem. Segundo Weber-Lehmann et al. (2014)¹⁴, há probabilidade de 83% de que uma prole de um pai gêmeo MZ carregue uma mutação germinativa, detectada em uma amostra de esperma do respectivo pai biológico, mas não no sêmen do irmão gêmeo, permitindo a resolução de casos de investigação da paternidade.

Diferenças nos padrões epigenéticos em indivíduos geneticamente idênticos poderiam ser explicados pela influência de fatores externos e internos. Hábitos de fumar, atividade física ou dieta, entre outros, são fatores externos que foram propostos para ter uma influência a longo prazo sobre estas modificações. No

entanto, é possível que pequenos defeitos na transmissão de informações epigenéticas através de sucessivas divisões celulares, ou mantê-lo em células diferenciadas, se acumulam em um processo que poderia ser considerado como uma "deriva epigenética" associada com o processo de envelhecimento¹⁷.

Através de estudos epigenéticos, observou-se que pela metilação do DNA é possível encontrar potenciais ilhas CpG como marcadores forenses para a diferenciação dos gêmeos MZ¹⁸. Assim, Xu et al. (2015)¹⁹ avaliaram o poder de discriminação da metilação de três sítios de CpG do marcador LINE-1 em gêmeos MZ. Para tanto foram analisadas amostras sanguíneas de 176 pares de gêmeos, sendo 119 pares MZ, dos quais 50 pares também cederam amostras bucais, e o método utilizado consistiu no tratamento do DNA por bissulfito, seguido de amplificado para a região LINE-1 e reação de pirosequenciamento.

Foram diferenciados 15 pares (12,6%) de gêmeos MZ pelas 3 ilhas CpG, sendo que a ilha CpG1 foi a mais discriminativa seguida pela CpG3 e CpG2. Além disso, amostras sanguíneas e bucais de um mesmo indivíduo mostraram significativa diferença no padrão de metilação e este não se relacionou com a idade do indivíduo para amostras sanguíneas, mas houve relação no caso das amostras bucais, para as quais houve aumento da metilação com o avanço da idade¹⁹.

É possível a diferenciação de gêmeos MZ pela análise do perfil de metilação e diferenças no nível de metilação de diferentes tecidos podem auxiliar na identificação do tipo de tecido em uma amostra biológica forense; porém, podem levar a uma falsa exclusão em uma investigação, sendo necessária a análise do mesmo tipo de tecido¹⁸. Além disso, a relação entre idade e metilação podem estimar a idade em investigações forenses, porém, o padrão de metilação no indivíduo pode ser significativamente diferente do obtido em uma mancha que tenha sido estocada por um período de tempo, podendo levar à falsa exclusão¹⁹.

Du et al. (2015)¹³ realizaram uma varredura no genoma de quatro pares de gêmeos MZ por meio da imunoprecipitação de DNA metilado, seguida pelo NGS por síntese deste DNA. Ilhas CpG foram agrupadas dentro de três classes com base na distância delas em relação a sequência do gene: ilhas promotoras, intragênicas e intergênicas. No estudo foram reportadas de 17.926 a 25.140 regiões diferencialmente metiladas (*Differentially Methylated Regions*, DMRs) entre os gêmeos MZ, sendo a maioria destas, 10.229 a 12.998, em ilhas CpG, seguidas

pelos regiões promotoras e, com baixo índice, dentre os genes com sequência referência superior a 3 kb de comprimento (corpo do gene). Dentre as classes de ilhas CpG, a maioria das DMRs ocorreram nas ilhas promotoras (6.364 a 7.854), seguida pelas intergênicas e intragênicas. O mesmo padrão foi observado ao considerar DMRs que se mostraram não metilada em um dos gêmeos MZ e parcialmente ou completamente metilada no outro gêmeo do par, denominadas principais DMRs (*Main* DMR, MDMRs), capazes de diferenciar gêmeos MZ. Foram identificadas 1.772 a 3.766 MDMRs, a maioria também localizada nas ilhas CpG (1.711 a 3.405), seguida pelas regiões promotoras e gênica e, dentre as classes de ilhas CpG, a maioria das MDMRs ocorreram nas ilhas promotoras (1.053 a 2.121)¹³.

Além disso, foram identificadas 38 MDMRs comuns a todos os pares de gêmeos MZ, todas localizadas nas ilhas CpG, 17 nas promotoras, 17 na intergênica e 4 na intragênica¹³. Os resultados apresentados por tais autores revelam que as ilhas CpG promotoras, seguidas pela intergênicas, são as melhores candidatas na discriminação de gêmeos MZ.

No trabalho de Stewart et al. (2015)²⁰, o método HRMA foi avaliado quanto a capacidade de detectar possíveis diferentes padrões de metilação do DNA em gêmeos MZ. Para isso, amostras bucais de cinco pares de gêmeos MZ foram submetidas à extração do DNA, seguindo-se com o tratamento por bissulfito. Posteriormente, duas regiões do DNA tratado (*Alu-E2F3*, contendo 2 CpGs; e *Alu-SP*, com 17 CpGs) foram especificamente amplificadas por qPCR e os produtos desta reação foram submetidos ao método HRMA com o reagente SYBR *Green* no equipamento de PCR em tempo real.

O marcador *Alu-E2F3* apresentou diferenças significativas entre as temperaturas de dissociação obtidas dentre os cinco pares de gêmeos MZ, enquanto o *Alu-SP* foi eficiente em quatro dos cinco pares. Além disso, o par de gêmeos mais velho (53 anos) mostrou uma relevante diferença nas suas temperatura de dissociação para ambos os marcadores, porém, não foi possível observar uma tendência relacionada à idade para os demais pares estudados (dos 20 aos 40 anos)²⁰.

Portanto, o método HRMA foi capaz de identificar diferentes padrões de metilação em gêmeos MZ e, comparado a análise de SNPs, é mais barato e exige equipamentos menos sofisticados, podendo ser utilizado com um teste preliminar à análise de SNPs. No entanto, considerando-se que para determinados marcadores o

padrão de metilação pode ser alterado em função da idade e do ambiente ao qual o indivíduo é exposto, gêmeos MZ mais jovens podem não apresentar temperaturas de dissociação suficientemente diferentes, assim como gêmeos MZ que foram expostos ao mesmo ambiente durante a vida²⁰.

O DNA mitocondrial (mtDNA) é herdado apenas da mãe e, portanto, é idêntico não apenas em gêmeos MZ, mas entre os indivíduos de uma família relacionados por via materna. No entanto, este DNA apresenta maior taxa de mutação que o nuclear, em virtude da baixa fidelidade da DNAm polimerase e a aparente falta de mecanismos de reparo do DNAm²¹.

Por este motivo, estudos^{22,23} sugerem que o mtDNA possui variabilidade significativa entre indivíduos aparentados, pois todos devem ter heteroplasmia, que consiste na presença de mais de um tipo de mtDNA dentro de um indivíduo e pode ser observada no mesmo tecido ou em tecidos diferentes; neste último caso o indivíduo exibe um tipo de mtDNA em um tecido e um tipo diferente em outro tecido. Além disso, o indivíduo pode ser heteroplásmico em uma amostra de tecido e homoplásmico em outra amostra do mesmo tecido^{24,25}.

O sequenciamento de Sanger tem sido utilizado para identificar SNPs do mtDNA em cada região hipervariável HV1, HV2 e HV3^{26,27}, bem como na sequência total da região controle²⁸. No entanto, o sequenciamento completo deste genoma provavelmente aumenta sua capacidade de discriminação entre os indivíduos e, assim, sua aplicação na prática forense.

Wang et al. (2015a)²⁹ aplicaram a tecnologia NGS para identificar pequenas diferenças do mtDNA em dez pares de gêmeos MZ. Pontos heteroplásmicos (*Point heteroplasmy*, PHP) foram considerados quando o nucleotídeo em menor proporção ocorreu em frequência igual ou superior a 5%. Oito pares dos gêmeos apresentaram de dois a quatro PHP em que a base principal (maior ou único componente) foi a mesma exibida pelo par, totalizando 16 PHPs. Destes oito pares, seis apresentaram pelo menos uma posição em que apenas um dos gêmeos foi heteroplásmico, auxiliando na diferenciação deles²⁶. Além disso, em cinco pares de gêmeos MZ detectou-se uma variação no SNP identificado como G15301A. Nestes pares, o nucleotídeo A foi o maior componente em um dos gêmeos, enquanto o G foi dominante no outro, consistindo em um SNP de alta relevância na diferenciação de gêmeos MZ²⁹.

Das 16 PHPs reportadas, seis pertencem às regiões HV1 e HV2 e dez estão localizadas na região codificadora do mtDNA²⁹. Tais achados confirmam a hipervariabilidade da região controle e demonstram a importância em se analisar, também, a região codificadora deste genoma. Uma vez que a frequência da heteroplasmia pode diferir entre os diferentes tecidos, pode ser necessário a análise do mesmo tecido em ambos os gêmeos MZ; ainda, o sequenciamento NGS do mtDNA pode não diferenciar tais indivíduos. No entanto, o estudo do mtDNA pelo NGS é mais barato que o sequenciamento de todo o genoma nuclear, sendo sugerido como triagem para a diferenciação de gêmeos MZ²⁹.

Ademais, o mtDNA pode ser uma ótima alternativa para a tipagem genética quando o DNA nuclear está degradado ou ausente (exp. fio de cabelo sem raiz), tendo em vista o seu maior número de cópias por célula em comparação ao DNA nuclear.

4. Conclusão

A tipagem do DNA pode ser empregada em qualquer investigação criminal que apresente material biológico passível de análise, apresentando a capacidade de ligar pessoas e objetos à cena do crime com um alto grau de confiabilidade, além de ser de extrema importância em investigações de parentescos. Sua descoberta é recente e, embora existam técnicas e kits padronizados para diferentes tipos de materiais biológicos e situações de investigação, são inúmeras as pesquisas visando o aprimoramento destas técnicas e sistemas marcadores. Os tradicionais marcadores genéticos utilizados na prática forense são os STRs, os quais possuem alta variabilidade e estabilidade, além de fácil metodologia para genotipagem. Estes *loci* não permitem diferenciar gêmeos MZ e escaneá-los no genoma nunca é considerado para tal finalidade; ao contrário, estes marcadores são utilizados para confirmar a monozigosidade dos gêmeos MZ. No entanto, um caso raro de padrão tri-alélico em STR identificou o assassino entre gêmeos MZ.

Por outro lado, análise de SNPs nucleares e do perfil de metilação do DNA têm se mostrado eficientes na diferenciação de gêmeos MZ. Além disso, a genotipagem do mtDNA também revelou diferentes perfis de SNPs entre estes indivíduos, com a vantagem do sequenciamento do genoma mitocondrial ser mais barato que o nuclear e ter maior possibilidade de tipagem em amostras com DNA degradado ou ausente.

A identificação de SNPs em diferentes tecidos providenciou informações a respeito do momento em que estes foram gerados; sendo que as mutações capazes de diferenciar os gêmeos MZ estavam presentes, geralmente, em amostra do esperma e mucosa bucal, sugerindo-se que esta última seja utilizada como o primeiro material a ser analisado em tais situações. Além disso, os estudos comprovam que os SNPs potenciais na diferenciação dos gêmeos MZ podem auxiliar em investigações da paternidade envolvendo tais indivíduos como supostos pais, pois estas mutações podem ser herdadas pelos filhos.

O padrão de metilação do DNA demonstrou ser uma ferramenta poderosa na diferenciação de gêmeos MZ, porém é necessário avaliar sua variação em diferentes tipos de tecido de um mesmo indivíduo, bem como sua relação com a idade e diversos fatores ambientais.

As pesquisas relacionadas à diferenciação de gêmeos MZ são um grande avanço para genética forense, contudo, há a necessidade de realização de novos estudos para a identificação de mais marcadores que possam contribuir para o desenvolvimento de sistemas genéticos com elevado poder de discriminação nestes indivíduos, bem como para a maior compreensão da origem destas diferenças genéticas e da forma como elas se apresentam em diferentes tecidos.

Referências

1. Costa LR, Obelheiro RR, Fraga JS. "Introdução à Biometria". In: Livro-texto dos Minicursos, VI Simpósio Brasileiro em Segurança da Informação e de Sistemas Computacionais (SBSeg'2006). Santos: SP; 2006. p.103-151.
2. Maltoni D, et al. Handbook of Fingerprint Recognition. Springer Verlag. New York: USA; 2003.
3. Butler JM. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing. J. Forensic Sci. 2006; 51: 253-265. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2006.00046.x>
4. Butler JM. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. Biotechniques. 2007; 43: ii-v. <https://doi.org/10.2144/000112582>
5. Bortolus R, et al. The epidemiology of multiple births. Hum.Reprod. Update. 1999; 5:179-187. <https://doi.org/10.1093/humupd/5.2.179>
6. Trevisan R, Tunes S. Casos de Gêmeos duplicam no mundo; especialistas explicam. Uol 2014. Disponível em: <http://mulher.uol.com.br/gravidez-e>

filhos/noticias/redacao/2014/07/16/casos-de-gemeos-duplicam-no-mundo-especialistas-explicam.htm. Acesso em 03 nov. 2015.

7. Zaros LG, et al. Apostila de Sequenciamento de DNA. 2008. Disponível em: <file:///C:/Users/La%C3%ADs/Downloads/Sequenciamento.pdf>. Acesso em 16 fev 2015.
8. Royo JL, Hidalgo M, Ruiz A. Pyrosequencing protocol using a universal biotinylated primer for mutation detection and SNP genotyping. *Nat Protoc.* 2007; 2: 1734-9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.244>
9. Kircher M, Kelso J. High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. *Bioessays.* 2010; 32: 524-36. <https://doi.org/10.1002/bies.200900181>
10. Griffiths AJF, et al. Introdução à Genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.
11. Costa EBO, Pacheco C. Epigenética: regulação da expressão gênica em nível transcricional e suas implicações. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde.* Londrina; 34 (2): 125-136.
12. Reece K. DNA Methylation Mechanisms and Analysis Methods to Study this Key Epigenetic Control. Promega, 2012. Disponível em: <https://www.promega.com/~media/files/promega%20worldwide/north%20america/promega%20us/webinars%20and%20events/epigeneticwebinarsept2012.pdf?la=en>. Acessado em 27 de jan. 2016.
13. Du Q, et al. A Genome-Wide Scan of DNA Methylation Markers for Distinguishing Monozygotic Twins. *Twin Research and Human Genetics.* 2015; 18 (6): 670–679. <https://doi.org/10.1017/thq.2015.73>
14. Weber-Lehmann J, et al. Finding the needle in the haystack: Differentiating “identical” twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2014; 9: 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2013.10.015>
15. Krawczak M, Cooper DN, Fändrich F, Engel W, Schmidtke J. How to distinguish genetically between an alleged father and his monozygotic twin: a thought experiment. *Forensic Sci Int Genet.* 2012; 6: 129-130. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2011.11.003>
16. Wang LF, et al. Tri-allelic pattern of short tandem repeats identifies the murderer among identical twins and suggests an embryonic mutational origin. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2015b; 16: 239-245. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.01.010>
17. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, et al. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci. USA;* 2005; 102: 10604-10609. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500398102>
18. Li C, Zhao S, Zhang N, Zhang S, Hou Y. Differences of DNA methylation profiles between monozygotic twins' blood samples. *Mol Biol Rep.* 2013; 40: 5275-5280. <https://doi.org/10.1007/s11033-013-2627-y>

19. Xu J, et al. LINE-1 DNA methylation: A potential forensic marker for discriminating monozygotic twins. Elsevier. 2015; 19: 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.07.014>
20. Stewart L, et al. Differentiating between monozygotic twins through DNA methylation-specific high-resolution melt curve analysis. Elsevier. 2015; 476: 36-39. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.02.001>
21. Lee HR, Johnson KA. Fidelity of the human mitochondrial DNA polymerase. J. Biol. Chem. 2006; 281: 36236-36240. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607964200>
22. Just RS, Irwin JA, Parson W. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. Forensic Sci. Int. Genet. 18: 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.05.003>
23. Naue J, et al. Evidence for frequent and tissue-specific sequence heteroplasmy in human mitochondrial DNA. Mitochondrion. 2015; 20: 82-94. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.12.002>
24. Alonso A, et al. Results of the collaborative exercise and proficiency testing program on mitochondrial dna of the GEP-ISFG: an inter-laboratory study of the observed variability in the heteroplasmy level of hair from the same donor. Forensic Sci. Int. 2002; 125: 1-7. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(01\)00602-8](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(01)00602-8)
25. He Y, et al. Heteroplasmic mitochondrial DNA mutations in normal and tumour cells. Nature. 2010; 464: 610-4. <https://doi.org/10.1038/nature08802>
26. Paneto GG. Análise de Polimorfismo do DNA mitocondrial em indivíduos residentes na grande São Paulo para aplicação na identificação humana. [Tese Doutorado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2010.
27. De Camargo MA, et al. No relationship found between point heteroplasmy in mitochondrial DNA control region and age range, sex and haplogroup in human hairs. Mol. Biol. Rep. 2011; 38: 1219-1223. <https://doi.org/10.1007/s11033-010-0220-1>
28. Sanches NM. Mitochondrial DNA control region diversity in a population from Espírito Santo state, Brazil. Mol. Biol. Rep. 2014; 41: 6645-6648. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3547-1>
29. Wang Z, et al. Differentiating between monozygotic twins through next-generation mitochondrial genome sequencing. Analytical Biochemistry, 2015a; 490: 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.08.024>