

MESTRADO EM MEDICINA LEGAL

**Previsão do aspeto físico de suspeitos criminais ou de cadáveres
irreconhecíveis a partir de amostras biológicas em Portugal.
Repercussões éticas**

Cláudia Raquel Tavares da Conceição

M
2020



Cláudia Raquel Tavares da Conceição. Previsão do aspeto físico de suspeitos criminais ou de cadáveres irreconhecíveis a partir de amostras biológicas em Portugal. Repercussões éticas.



M.ICBAS 2020

Previsão do aspeto físico de suspeitos criminais ou de cadáveres
irreconhecíveis a partir de amostras biológicas em Portugal.
Repercussões éticas.

Cláudia Raquel Tavares da Conceição



CLÁUDIA RAQUEL TAVARES DA CONCEIÇÃO

Previsão do aspeto físico de suspeitos criminais ou de cadáveres irreconhecíveis a partir de amostras biológicas em Portugal. Repercussões éticas.

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

Orientadora – Doutora Maria de Lurdes Pontes Rebelo

Afiliação – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P

Co-Orientadora – Doutora Maria Strecht Monteiro Mata de Almeida

Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Agradecimentos

No fim de mais uma etapa de superação pessoal e de desenvolvimento académico, torna-se imprescindível agradecer a todos os envolvidos no decorrer deste desafio. Deste modo, na tentativa de expressar por palavras o meu profundo agradecimento, obrigada:

À Doutora Lurdes Pontes Rebelo, pela dedicação, disponibilidade e partilha de conhecimentos, tanto na elaboração desta tese, como no estágio no âmbito de licenciatura, que me incentivou a prosseguir uma formação académica na área da Genética Forense. Foi claramente rápida, e sensata, a escolha de uma orientadora para a realização da dissertação de mestrado!

À Doutora Maria Strecht pelo auxílio na redação do capítulo de implicações éticas, bem como pela atenção dada ao restante texto, por todos os conhecimentos transmitidos e por todas as correções sugeridas.

À Doutora Maria José Pinto da Costa, dirigente do mestrado em Medicina Legal, pelos conhecimentos transmitidos em todas as aulas, pela presença assídua e pelo esclarecimento informal de todas as questões que surgiram ao longo destes dois anos.

Aos meus melhores amigos, tanto os de faculdade como os de infância, por já não existirem palavras para agradecer todo o companheirismo e por sempre me fazerem acreditar que tudo iria correr bem.

Às colegas de mestrado, que se tornaram facilmente amigas, pela criação de um grupo virtual em que desabafávamos todas as inseguranças relativas a este percurso, partilha de trabalhos, esclarecimento de dúvidas académicas ou de procedimentos concursais e, cima de tudo, pela camaradagem ao longo destes anos. Foi muito bom percorrer este caminho convosco, meninas, sempre lado a lado!

Ao Vitor Silva por não entender absolutamente nada de ciências e mesmo assim aceitar ler e rever todos os meus trabalhos e ouvir todas as minhas apresentações ao longo dos últimos 6 anos. O teu apoio incondicional foi imprescindível para a superação de várias etapas da minha vida e a conclusão deste ciclo de estudos deveu-se, e muito,

ao teu carinho e companheirismo. Obrigada por nunca me deixares desanimar e fazeres acreditar que sou capaz de tudo!

Por último, mas não menos importante, à minha família por todo o apoio incondicional em todas as minhas decisões, e um agradecimento especial aos meus pais e avó Preciosa, dois deles que agora apoiam de outro lugar, pelo amor, dedicação e todos os esforços que me permitiram concluir esta nova etapa e tornar na mulher que sou hoje.

“Uma pessoa é tão feliz quanto a profundidade da sua gratidão.”

John Miller

Obrigada a todos por me fazerem profundamente feliz!

Lista de abreviaturas e siglas

CEV – Característica Externamente Visível

CODIS – *Combined DNA Index*

CNPD – Comissão Nacional de Proteção de Dados

DNA – *Deoxyribonucleic Acid*

EDNAP – *European DNA Profiling Group*

EXOC2 – *Exocyst Complex Component 2*

FBI – *Federal Bureau of Investigation*

FDP – *Forensic DNA phenotyping*

GWAS – *Genome-wide Association Studies*

HGDP – *Human Genome Diversity Project*

IRF4 – *Interferon regulatory factor 4*

MC1R – *Melanocortin 1 receptor*

mtDNA – *Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid*

nuDNA – *Nuclear Deoxyribonucleic Acid*

bp – *Base Pair*

RNA – *Ribonucleic Acid*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

STR – *Short Tandem Repeat*

SWGAM – *Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*

UE – União Europeia

UV – Ultravioleta

Sumário

Um dos principais objetivos da investigação criminal forense é identificar indivíduos responsáveis por cometer crimes ou identificar cadáveres que se encontrem em avançado estado de putrefação, sendo esse objetivo alcançado com o auxílio de uma recente ciência forense, a Genética Forense.

No âmbito desta ciência, especialmente no contexto criminal, e de modo a suprir lacunas na investigação forense, recorre-se a técnicas já denominadas de clássicas, que usam sobretudo marcadores do tipo *Short Tandem Repeat* (STR). Uma vez que em alguns casos, o uso exclusivo de STRs impossibilitava o alcance dos objetivos já referidos, foi desenvolvida uma metodologia promissora, entre outras que vão sendo desenvolvidas, designada por fenotipagem forense. Esta metodologia permite a previsão de características individuais externamente visíveis (CEVs) a partir do DNA (*deoxyribonucleic acid*) extraído de amostras biológicas, uma vez que permite calcular a probabilidade de certas características fenotípicas externamente observáveis serem expressas num determinado indivíduo. As características estudadas são sobretudo as que dizem respeito à diferente pigmentação da pele, olhos ou cabelo humano e que podem, ou não, estar associadas a certos grupos populacionais. Assim, estando na posse desta informação fenotípica, a investigação criminal poderia desenvolver-se de forma diferente, permitindo, em alguns casos, reduzir o universo de suspeitos, e noutros casos facilitar a identificação de restos humanos esqueletizados ou de cadáveres recuperados a partir de locais onde ocorrem desastres de massa.

Deste modo, o objetivo deste trabalho consistiu, além de proceder a uma revisão bibliográfica sobre este tema, propor um método que permita prever estas CEVs a partir de diferentes tipos de amostras biológicas, quer de amostras encontradas em locais de crime, quer de amostras recolhidas de cadáveres em avançado estado de degradação fisicamente irreconhecíveis. Pretende-se ainda realizar uma reflexão sobre algumas questões éticas relacionadas com o tema proposto, uma vez que Portugal não possui legislação específica que regule o uso deste tipo de metodologia e/ou marcadores alternativos. A existência de argumentação contra este tipo de legislação poderá também não apoiar facilmente a sua introdução como meio complementar de investigação.

Palavras-chave: *Irisplex*, *HirisPlex*, genética forense, previsão da cor de olhos e cabelo, fenotipagem de DNA, previsão da aparência humana, ética e regulação da fenotipagem de DNA.

Summary

One of the main purposes of forensic criminal investigation is to provide a genetic identification of an individual responsible for committing a crime or a corpse that is in an advanced state of putrefaction, being this objective achieved with the contribution of a recent forensic science, the Forensic Genetics.

In the scope of this science, especially in the criminal field, in order to fill some gaps in forensic investigation, classic techniques which apply Short Tandem Repeat (STR) markers are being used. In some cases, the exclusive use of STRs made it impossible to achieve the objectives already mentioned so, in order to decrease this limitation, a promising methodology was developed, among others, named forensic phenotyping (FDP). This methodology allows the prediction of externally visible individual characteristics (EVC) from DNA (deoxyribonucleic acid) extracted from biological samples, since it allows to determinate the probability of certain phenotypic characteristics being expressed in an individual. The studied characteristics are mainly those that refer to the different pigmentation of the skin, eyes or human hair and may or may not be associated with certain population groups. Thus, with the knowledge of this phenotypic information, a criminal investigation could develop in a different way allowing, in some cases, to reduce the universe of suspects, or identify skeletonized human remains or a corpse recovered from a place where mass disasters occurred.

Thereby, the objective of this study consisted in a bibliographic review on FDP aiming to propose a forensic protocol that allows the prediction of these EVCs from different types of biological samples, whether found in crime places or collected from dead bodies that are physically unrecognizable due to an advanced state of degradation. It is also intended to discuss some ethical issues related to the proposed theme, since Portugal does not have specific legislation that regulates the use of this type of methodology and/or its alternative markers. The existence of arguments against this type of legislation also does not easily support its introduction as a complementary means of investigation.

Key words: Irisplex, HirisPlex, forensic genetics, predicting eye and hair color, DNA phenotyping, predicting human appearance, DNA phenotyping ethics and regulation.

Índice

1. Objetivos.....	1
2. Introdução	2
2.1. Marcadores genéticos.....	4
2.1.1. Marcadores <i>Short Tandem Repeat</i>	4
2.1.2. Os marcadores <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	7
2.2. Fenotipagem forense	9
2.2.1. A cor dos olhos	12
2.2.2. A cor do cabelo	14
2.2.3. A cor da pele.....	17
3. Os sistemas <i>IrisPlex</i> e <i>HirisPlex</i>	20
4. Aplicação da fenotipagem em Portugal	29
5. Reflexão sobre implicações éticas e legais	33
5.1. Legislação existente relativa à FDP	34
5.2. Argumentação subjacente à inclusão de FDP na investigação criminal	37
6. Materiais e Métodos	43
6.1. Metodologia.....	43
6.2. Protocolo sugerido	44
6.2.1. SNPs escolhidos	47
7. Conclusões.....	51
8. Referências bibliográficas	55

1. Objetivos

O presente estudo pretende atingir os seguintes objetivos:

- Fazer uma revisão bibliográfica sobre marcadores genéticos de fenotipagem, entre os quais os marcadores presentes no sistema *Hirisplex*;
- Sugerir um protocolo para a aplicação de um conjunto de SNPs de fenotipagem em laboratórios forenses portugueses;
- Discutir algumas implicações éticas e legais da fenotipagem de CEVs em sede da investigação criminal nacional.

2. Introdução

A investigação criminal é o processo que permite averiguar a veracidade de um crime, quem e em que circunstância o cometeu, levar à responsabilização dos autores e tentar identificar e proteger as vítimas ("Investigação Criminal," 2017). Entre todas estas perícias que competem às autoridades forenses, identificar um autor de crime ou um cadáver é uma das etapas mais importantes no decorrer de uma investigação criminal. Contudo, contrariamente ao processo de identificação da maioria dos indivíduos vivos ou cadáveres humanos frescos não mutilados, a identificação visual pode não ter utilidade no caso de cadáveres mutilados, cadáveres em avançado estado de decomposição ou cadáveres esqueletizados (Pinheiro, 2010).

Nestes casos, a Genética Forense pode ser uma importante ferramenta no âmbito da identificação humana. Esta ciência auxilia as investigações criminais referentes a casos de filiação, criminalística biológica e identificação individual (genética) e tem como principal objetivo realizar perícias em amostras biológicas de natureza diversa (sangue, sémen, pêlos, saliva, células epiteliais), colhidas em distintos suportes (corpo da vítima ou do suspeito, peças de vestuário, roupa de cama, entre outros), no contexto da investigação da prática de um crime a fim de se estabelecer um perfil genético (Pinheiro, 2010).

O uso da Genética Forense para fins de identificação humana baseia-se em duas teorias. A primeira, designada por Teoria Celular, fundamenta-se na exclusividade, igualdade e invariabilidade do DNA (*deoxyribonucleic acid*), ou seja, que o núcleo de uma única célula contém a informação genética completa sobre esse organismo e essa informação é invariável ao longo da sua vida (M'Charek, 2008). A segunda, a Teoria de *Locard*, também denominada por Princípio de troca de *Locard*, fundamenta que o contato entre dois objetos obriga a uma troca de substâncias entre eles, de modo a que um agressor retire material da cena do crime e deixe vestígios da sua presença no mesmo local (Kowalczyk, Zawadzka, Szewczuk, Gryzinska, & Jakubczak, 2018) .

A identificação genética de um indivíduo desconhecido, independentemente de ser um cadáver ou um indivíduo vivo, é sempre um ato de natureza comparativa. Esta comparação poderia ser facilmente realizada com o perfil genético do próprio indivíduo, caso existisse uma base de dados de perfis de DNA que integrasse todos os indivíduos nacionais ou, em alternativa, como acontece atualmente em Portugal, a comparação realiza-se a partir de perfis genéticos de familiares, principalmente em linha reta, do suposto indivíduo. Por este motivo, o número de exames de identificação de cadáveres desconhecidos em Portugal é pouco elevado uma vez que apenas se realizam tais

perícias quando existem familiares que reconheçam o cadáver e, simultaneamente, quando estes livre e esclarecidamente fornecem amostras biológicas suas para posterior comparação (António Amorim, 2013).

Contudo, este método de comparação comum em Portugal, bem como numa grande parte dos países dispersos pelos diferentes continentes, pode apresentar limitações quando não existem amostras passíveis de ser comparadas com o suspeito de crime, ou não existe nenhum familiar que procure um parente desaparecido (António Amorim, 2013).

Para além da identificação individual, a Genética Forense é importante nas perícias de investigação de paternidade de modo a determinar se um indivíduo é ou não excluído da possibilidade de ser o pai biológico de outro. Estas investigações de parentesco são o tipo de exames mais frequentemente solicitados nas Delegações de Medicina Legal e Ciências Forenses em Portugal uma vez que, devido à reforma de 1977, do Código Civil Português de 1976, nomeadamente na alteração do artigo 1864º, é obrigatório proceder à averiguação oficiosa de paternidade nos casos em que os filhos são registados apenas com o nome da mãe (António Amorim, 2013).

Nestas perícias, tal como nas de identificação individual, a prova é baseada na comparação de perfis genéticos, que podem ser definidos como sendo o conjunto de características hereditárias ou padrões fenotípicos que um indivíduo possui para um determinado número de marcadores genéticos, detetáveis em qualquer amostra biológica que lhe pertença (Shuai *et al.*, 2014).

Contudo, antes de se fazer a valorização bioestatística em qualquer das perícias já referidas, ter-se-á que estudar os marcadores genéticos a usar, na população em causa e, por fim, proceder então à valorização dos resultados obtidos (Christiansen *et al.*, 2019).

2.1. Marcadores genéticos

2.1.1. Marcadores Short Tandem Repeat

Nas células nucleadas humanas existem dois tipos de DNA, o DNA nuclear (nuDNA) e o DNA mitocondrial (mtDNA), que apresentam diferenças estruturais e de tamanho, e ainda formas distintas de herança, uma vez que o nuDNA é herdado de ambos os progenitores, à exceção do cromossoma Y que é de herança uniparental paterna, e o mtDNA de herança uniparental materna (Corte-Real, Vieira, & Pinheiro, 2015)

A identificação genética de amostras biológicas baseia-se na caracterização de polimorfismos do DNA, também denominados de marcadores genéticos, das regiões não codificantes do genoma humano e, atualmente, para a conclusão das perícias forenses usa-se preferencialmente o nuDNA, especialmente com recurso a marcadores do tipo STR, podendo em circunstâncias especiais utilizar-se o mtDNA (Corte-Real *et al.*, 2015).

Aproximadamente 3% do genoma humano é constituído por repetições em *tandem* (sequências de DNA não codificante que se repetem sucessivamente) cuja diferenciação entre indivíduos da mesma espécie reside no número de repetições que cada indivíduo apresenta para um determinado *locus* de um par de cromossomas homólogos (Butler, Coble, & Vallone, 2007). Assim, este DNA repetitivo, excetuando o DNA satélite que se encontra nas proximidades dos centrómeros dos cromossomas, é classificado em dois grupos, minissatélite e microsatélite, de acordo com o tamanho da sequência de repetição (unidade de repetição) (Corte-Real *et al.*, 2015).

São, principalmente, as regiões microsatélite do genoma humano que constituem a base da identificação genética. Como já foi referido, atualmente, o método comparativo mais utilizado para a identificação de um autor de um determinado crime, a partir de material biológico encontrado numa cena do crime, recorre à metodologia de tipagem de marcadores do tipo STR que consistem em sequências de DNA de 2-7 pb (do inglês, *base pair*; em português: par de bases) dispersas pelo genoma, que se repetem em *tandem* e cujo tamanho dos alelos é inferior a 350 pb (António Amorim, 2013). Estes marcadores genéticos são comumente utilizados em laboratórios portugueses de modo a historiar a origem e *background* familiar de um indivíduo, localizar genes com suscetibilidade para doenças, monitorizar transplantes, e ainda, em perícias forenses, auxiliar em investigações de paternidade, criminalista biológica e identificação humana (Corte-Real *et al.*, 2015).

Uma das características importantes dos STR é o seu elevado polimorfismo. Esses polimorfismos podem residir no número de repetições, no tamanho da unidade de repetição, ou ainda na composição da unidade de repetição, sendo que esta última é dividida em repetições simples, compostas, complexas e complexas hipervariáveis. As repetições simples contêm unidades de repetição com tamanho idêntico que se repetem ao longo de toda a sequência, as repetições compostas compreendem 2 ou mais unidades de repetição que se repetem ao longo da sequência, as repetições complexas contêm vários blocos de unidades de repetição variáveis com tamanho variável, e por fim as repetições complexas hipervariáveis contêm vários alelos não consensuais que diferem em tamanho e sequência. Nem todos os alelos contêm unidades de repetição completas, podendo ter somente 1, 2 ou 3 nucleótidos no final da repetição, pelo que adquirem o nome de microvariantes (Butler, 2007).

Assim, as principais vantagens dos STRs prendem-se, fundamentalmente, com o facto de possuírem alelos próximos, o que possibilita a realização da análise de marcadores polimórficos em simultâneo (*multiplex*) e a capacidade de gerarem produtos de amplificação de pequeno tamanho, o que é benéfico, tendo em consideração a análise de DNA de amostras degradadas. Tal facto, proporciona o aumento do poder de discriminação e a diminuição do tempo de análise, bem como das quantidades de DNA e de reagentes a usar. (Bulbul & Filoglu, 2018).

As perícias de investigação biológica de paternidade, na sua maioria constituídas pelos chamados trios, ou seja, pretense pai/mãe/filho(a), são realizadas nos Laboratórios de Genética Forense, essencialmente, através do estudo de cerca de 24 STRs pelos sistemas *PowerPlex® Fusion 6C System (Promega)* e/ou *GlobalFiler™ (Applied Biosystems)*. Embora os já referidos trios sejam os casos mais comuns, são, também, solicitadas investigações biológicas de paternidade em que estão envolvidos dois ou mais pretendidos pais, ou com dois ou mais pretendidos filhos, bem como outros casos onde, por vezes, a impossibilidade do estudo do pretense pai por estar ausente ou falecido, torna os casos bastante mais complexos. Nestas situações, recorre-se à investigação de paternidade envolvendo indivíduos comprovadamente familiares do pretense pai, o que pode conduzir ao estudo dos pretendidos avós, de pretendidos tios ou de filhos do pretense pai, ou seja pretendidos irmãos, com possibilidade ou não do estudo das respetivas mães. Contudo, embora o laboratório forense disponha de tecnologia adequada para este tipo de investigações biológicas de parentesco, pode ser necessário proceder à análise de marcadores genéticos adicionais ou recorrer ao estudo de outros familiares do pretense pai, preferencialmente em linha reta, e ainda à exumação do seu cadáver para a recolha de material biológico ainda disponível, frequentemente reduzido a ossos e/ou dentes, de modo a realizar uma investigação de paternidade direta. Embora os 24 STRs

autossômicos sejam os marcadores por excelência para este tipo de investigações, por vezes, em casos mais complexos, como já referido, pode ser necessário aumentar o número destes marcadores, recorrendo a outros sistemas *multiplex* utilizados nas perícias forenses (A. Amorim & Pereira, 2005).

Contudo, nem sempre é possível (ou conclusiva) a comparação de amostras biológicas de DNA analisadas desta forma convencional. Deste modo, podem surgir várias situações para as quais é difícil dar uma solução, como é o caso das seguintes: se não existirem testemunhas oculares ou se o depoimento destas for afetado por memórias subjetivas ou influenciadas por uma ideologia preconceituosa; Se os cadáveres encontrados apresentarem um elevado estado de decomposição e a sua identificação visual não for possível; Se o número de suspeitos ou pessoas desaparecidas for elevado e as investigações ficarem sem rumo pela inexistência de amostras de comparação.

Nestes casos, se não existir correspondência entre o perfil de STR da amostra biológica recolhida e o suspeito, ou as quantidades de DNA forem reduzidas ou muito degradadas, os STRs não fornecem qualquer informação adicional à investigação e seria vantajoso providenciar, às autoridades de investigação forense, informações relativas às características fenotípicas externamente observáveis dos indivíduos em investigação, sobretudo as que estão relacionadas com características visíveis, tais como a cor dos olhos, cor de pele, cor de cabelo, entre outras, de modo a descrever o melhor possível a aparência do indivíduo suspeito de crime, e ainda em casos de pessoas desaparecidas onde um cadáver é recuperado decomposto visualmente irreconhecível, ajudando as autoridades a encontrar as amostras *ante-mortem* certas ou familiares para uma identificação final com STRs (Bulbul & Filoglu, 2018; Walsh *et al.*, 2013).

Assim, alterações pontuais num único nucleótido, que usam a mesma tecnologia de tipagem, ou seja, a sequenciação ou a determinação de perfis de STRs, são também marcadores que, atualmente, começam a ser utilizados, com muito êxito na prática forense, para complementar investigações complexas de parentesco. Deste modo, a implementação e surgimento destes novos marcadores, irá permitir a rápida sequenciação de grandes segmentos do genoma humano, e custos cada vez menores, o que contribuirá para aumentar o poder de análise genética nos casos de investigação biológica de parentesco (A. Amorim & Pereira, 2005).

Para auxiliar na obtenção dessas informações, marcadores do tipo *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) são usados pois apresentam boa solução para a identificação de material genético degradado, uma vez que, apesar de apresentarem um poder de discriminação muito menor do que os marcadores STR (estima-se que são necessários 40-60 SNPs para igualar o poder de discriminação de 15 STRs), são polimorfismos muito mais estáveis, com uma menor taxa de mutação, e que geram

produtos de amplificação de tamanho reduzido, o que permite a análise de amostras degradadas. O uso deste tipo de marcadores permite ainda conduzir a uma previsão de origem biogeográfica do contribuidor das amostras em análise, e fornecer informações fenotípicas (Brookes, 1999; Kidd *et al.*, 2012).

2.1.2. Os marcadores *Single Nucleotide Polymorphism*

Geneticamente, os SNPS são alterações pontuais na sequência de DNA, podendo corresponder a substituições, deleções ou inserções de um único nucleótido (*single nucleotide*). Sob ponto de vista forense, podem ser classificados em:

(1) SNPs de identificação humana, que fornecem dados para a distinção entre indivíduos (*Identity-testing SNPs*);

(2) SNPs informativos de linhagem, que são marcadores de haplótipos úteis na identificação pessoas desaparecidas através da análise de parentesco (*Lineage informative SNPs*);

(3) SNPs informativos de ancestralidade, que permitem obter informação indicativa da ascendência biogeográfica de um indivíduo (*Ancestry informative SNPs*);

(4) SNPs informativos de fenótipos, que são usados para inferir a probabilidade de um indivíduo possuir características fenotípicas externamente observáveis particulares, também denominadas por CEVs (Características Externamente Visíveis) como por exemplo a cor dos olhos, da pele e do cabelo (*Phenotype informative SNPs*). Este tipo de SNP tem sido o foco de recentes estudos para a identificação de cadáveres e suspeitos, e o polimorfismo principal para o desenvolvimento de estudos de diferentes grupos de trabalho, como os realizados por Budowle & Van Daal, em 2008, entre outros (Budowle & van Daal, 2008).

Assim, estes marcadores genéticos são aplicados com muito sucesso em perícias forenses de identificação de vítimas de locais de desastres em massa, ou achados arqueológicos que contêm quantidades muito reduzidas e/ou degradadas de amostra biológica. Com já foi referido, e especialmente nestes casos de achados arqueológicos, a utilização de SNPs concede à genética forense a capacidade de determinar as características fenotípicas externamente observáveis de um indivíduo através dessa mesma amostra biológica (Biesecker *et al.*, 2005).

Um dos primeiros casos em que se recorreu à utilização de SNPs, de modo a identificar cadáveres vítimas de um desastre de massa, neste caso concreto, de um ataque terrorista, foi no conhecido ataque ao *World Trade Center*, no dia 11 de Setembro de 2001. No decorrer desta investigação, os cientistas recorreram a um painel de 13

STRs nos quais se baseia a base de dados do FBI (*Federal Bureau of Investigation*) – CODIS (*Combined DNA Index System*) –, contudo, devido à degradação das amostras biológicas, os resultados foram inconclusivos. Assim, numa segunda abordagem recorreram à tipagem de SNPs. Usando estes últimos marcadores foi possível obter melhores resultados, tendo sido possível identificar mais de 17 mil indivíduos (Biesecker *et al.*, 2005).

Outro caso em que se recorreu à utilização de SNPs de modo a desvendar um *cold case* nos Estados Unidos da América, foi o mediático caso de April Tinsley., uma menina de 8 anos que no caminho para casa foi violada e estrangulada até à morte, em 1988. Em 2018, o sémen degradado colhido do cadáver da jovem, que anteriormente apresentava resultados de identificação inconclusivos, foi enviado novamente para análises e comparado, por meio de SNPs, com o DNA presente em preservativos colhidos do caixote do lixo do suspeito. Assim, trinta anos depois, e graças ao desenvolvimento da Genética Forense, o caso da jovem April ficou resolvido judicialmente e o suspeito finalmente detido (Scott & Skellern, 2010).

Deste modo, pode-se afirmar que os SNPs são marcadores genéticos que constituem uma mais-valia no âmbito da investigação forense na qual o seu uso pode beneficiar vários fins como a identificação, inferência da ascendência e previsão de fenótipos de indivíduos cuja identidade e aparência são desconhecidas. (Bulbul & Filoglu, 2018; Kowalczyk *et al.*, 2018).

2.2. Fenotipagem forense

Em grande parte, muitas das características fenotípicas externamente observáveis, também denominadas por CEVs, são determinadas pelo genótipo do indivíduo e manifestam-se na sua aparência física. De modo a fundamentar a sua associação genética, alelos de interesse para estudo devem ser sujeitos a uma investigação funcional que inclui testes bioquímicos para diferenciar proteínas codificantes normais e mutadas, alterações na regulação de elementos que afetam os níveis de expressão da transcrição de genes, ou estabilidade do RNA (*ribonucleic acid*) mensageiro, ou estabilidade pós-tradução (Sturm, 2009).

As CEVs podem ser consideradas simples, caso sejam determinadas pela expressão de apenas um gene, ou complexas, caso resultem da interação de vários fatores como, por exemplo, diferentes genes interagindo entre si e ainda por ação do meio ambiente (Pulker, Lareu, Phillips, & Carracedo, 2007). A maior parte das CEVs são consideradas características complexas, o que dificulta a identificação dos genes envolvidos na sua expressão (Kayser & Schneider, 2009). No entanto, vários estudos relacionados com SNPs do tipo informativo de fenótipos têm sido desenvolvidos e centrados nas características da pigmentação humana uma vez que a hereditariedade destas é elevada e consegue-se facilmente obter informação fenotípica de interesse (Budowle & van Daal, 2008; Kayser, 2015).

A previsão das CEVs através da análise de DNA é denominada de fenotipagem molecular ou FDP (*Forensic DNA Phenotyping*). Esta técnica fornece informação para estimar a aparência física de um indivíduo utilizando marcadores genéticos associados a fenótipos, incluindo os que relacionam a ascendência biogeográfica com CEVs. Deste modo é possível inferir a probabilidade de certas características serem expressas em relação a outras, prever a ascendência biogeográfica, e ainda a aparência do dador desconhecido de uma amostra de DNA, facultando pistas forenses às autoridades responsáveis pela investigação, que não seriam passíveis de desvendar utilizando métodos comparativos de perfis de DNA (Bulbul & Filoglu, 2018; Kayser, 2015)

Esta metodologia de análise forense, ao permitir obter informação sobre características visíveis de um indivíduo, funciona como uma “testemunha biológica” e pode orientar uma investigação criminal, contribuindo para limitar o número de potenciais suspeitos, identificar pessoas desaparecidas ou vítimas de desastres, quando não se dispõe de amostras de referência *ante-mortem* ou de parentes próximos. Pode também ser útil em estudos de antropologia, contribuindo para a reconstrução facial de restos humanos desconhecidos, e utiliza-se muitas vezes com o objetivo de desvendar as CEVs

de figuras históricas ou a aparência dos antepassados da espécie humana. (Bulbul *et al.*, 2016; Candille *et al.*, 2012; Kayser, 2015).

Pode acontecer que as autoridades de investigação forense tenham que enfrentar uma dificuldade adicional, que é a possibilidade de um criminoso poder alterar as suas características físicas para não ser identificado, como pintar e alterar a aparência do seu cabelo, usar lentes de contacto com cores, ou ainda recorrer a cirurgias plásticas. Contudo, esta possibilidade é pouco provável e, por esse motivo, não se apresenta como uma grande limitação à FDP uma vez que, nesse caso, os autores de crime precisariam ocultar a sua aparência tanto durante o ato criminoso, como perpetuar essa modificação depois do crime. Além disso, seria também necessário procederem à alteração de documentos detentores de fotografias, tais como o Cartão de Cidadão, Carta de Condução, passaportes, e de saírem da sua área residencial habitual, uma vez que existiria uma grande probabilidade de ser reconhecido por alguém segundo as suas características originais (Kayser, 2015).

A FDP da cor de pele, cabelo e olhos, baseia-se na teoria que a pigmentação destas 3 CEVs é determinada principalmente pela quantidade, tipo, e distribuição da melanina. A produção deste biopolímero ocorre em células denominadas de melanócitos, que se encontram na camada basal da epiderme, bulbo capilar e íris, e é sintetizada em organelos celulares denominados melanossomas. O tipo de melanina, bem como o número, tamanho e distribuição dos melanossomas, são responsáveis por regular a pigmentação da pele e do cabelo. No caso dos olhos, a sua cor determina-se a partir do tipo, distribuição e quantidade de melanina presente na íris (Sturm, 2009).

A melanina é produzida a partir de tirosina (Figura 1), um aminoácido essencial que sofre ação da enzima tirosinase. Na presença de oxigénio molecular, a tirosinase oxida a tirosina em dioxifenilalanina e, posteriormente, em dopaquinona (Sturm & Frudakis, 2004). Na etapa seguinte, dois compostos podem ser formados (Figura 1) dependendo da presença de outro aminoácido, a cisteína. Na ausência de cisteína, a dopaquinona sofre uma série de reações originando a eumelanina (tipo mais comum de melanina, com coloração castanha ou preta); na presença de cisteína, ocorre uma reação entre a dopaquinona e a cisteína que, no final de uma sequência de reações, conduz à formação de feomelanina (tipo menos comum de melanina, de coloração vermelha ou laranja e frequente em seres humanos ruivos) (Sturm, 2009).

Diversos grupos de investigação forense, que se têm dedicado à descoberta dos melhores marcadores fenotípicos, concluíram que os marcadores ideais serão aqueles a que corresponde um genótipo pouco complexo, fácil de ser estudado, que estejam presentes nos indivíduos desde a altura do seu nascimento, que tenham elevada

probabilidade de se manifestar (>75%), que sejam minimamente influenciados por fatores externos e o mais discriminativos possível (Pulker *et al.*, 2007).

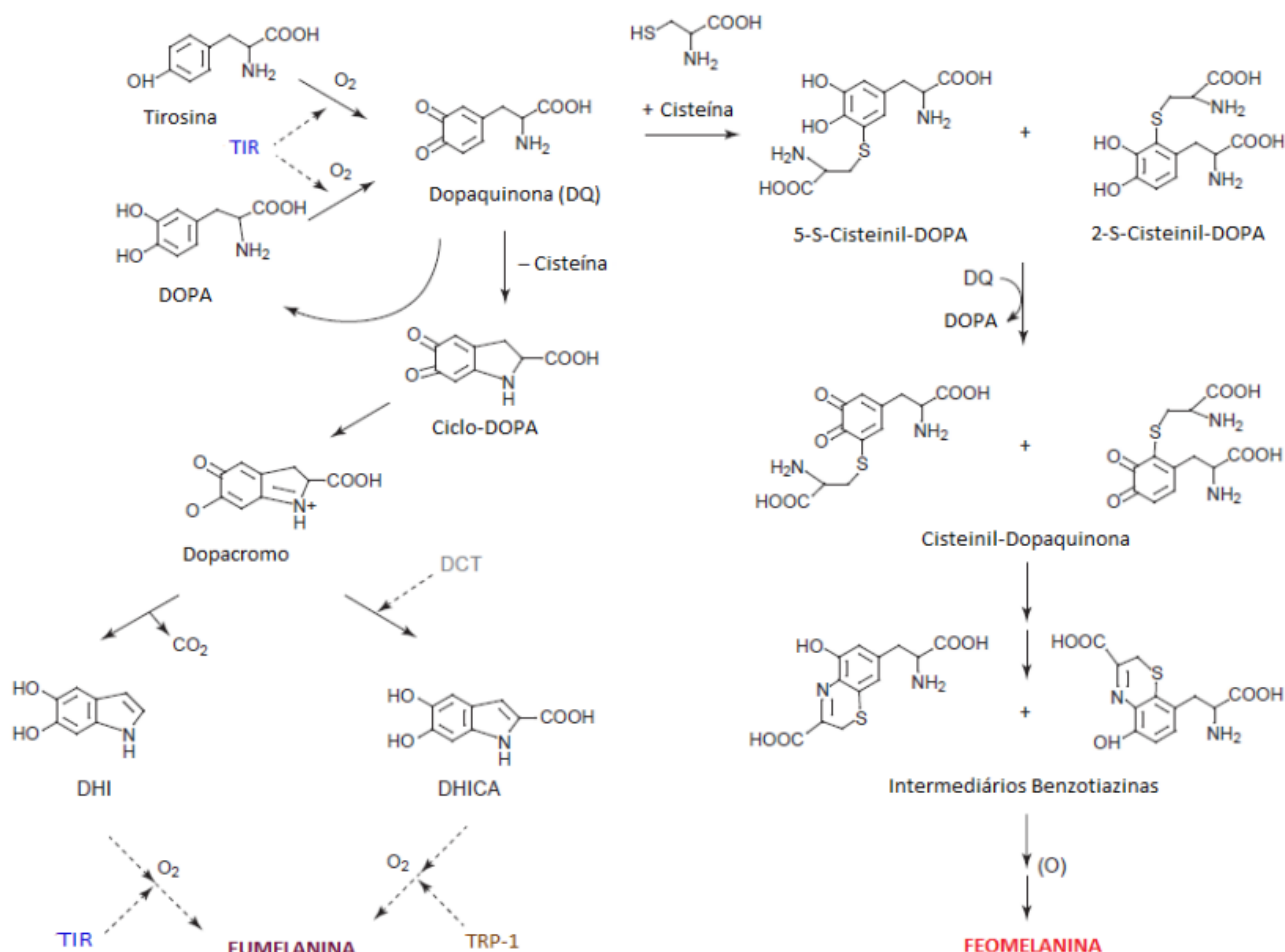


Figura 1: Síntese do pigmento melanina. **TIR** – tirosinase; **TRP-1** – Proteína relacionada à tirosinase 1; **DCT** – DOPAcromo tautomerase; **DHI** – 5,6- Dihidroxiindol; **DHICA** – 5,6-Dihidroxiindol-2-Carboxílico. **Adaptado de:** Sturm, R. A., & Frudakis, T. N. (2004).

Assim, até ao momento, os marcadores fenotípicos suficientemente discriminativos de modo a poderem ser aplicados imediatamente nas investigações forenses são os que se relacionam com a cor dos olhos e a cor do cabelo (Walsh *et al.*, 2014). Para além destes, existem outros marcadores possíveis de serem usados num futuro próximo, sendo que, alguns deles são mais promissores e interessantes do que outros, como por exemplo os que se referem à cor da pele. Outros ainda estão muito longe de ser completamente compreendidos e estudados por serem mais complexos, como por exemplo, os que se relacionam com a estatura do indivíduo, aqueles que contribuem para a determinação da idade, para a tipologia do fio de cabelo, entre outros (Kayser, 2015).

2.2.1. A cor dos olhos

A cor dos olhos, considera-se uma característica para a determinação da qual se dispõe do(s) melhor(es) marcador(es) fenotípico(s). Esta não só depende da quantidade e do tipo de distribuição de melanócitos presentes no estroma da íris e da quantidade de melanina que contêm, mas também da espessura e densidade da própria íris (Mengel-From, Borsting, Sanchez, Eiberg, & Morling, 2010). Apesar da íris poder expressar uma variada gama de cores, verificou-se que esta resulta em 98% do genótipo. Sendo uma característica pouco dependente de fatores externos constitui um excelente marcador a incluir num método de fenotipagem de DNA (Andersen *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2013).

A íris humana pode apresentar uma variada gama de cores que engloba desde todos os tons mais claros (azuis) aos tons mais escuros (castanho-escuro ou preto). Os estudos genéticos normalmente separam a cor dos olhos em diferentes categorias, sendo que, na maior parte deles, se resume a três: castanho, azul, e verde ou intermédio (Sturm & Frudakis, 2004). Os olhos castanhos distribuem-se pela maior parte da população humana mundial, enquanto os olhos azuis e verdes são praticamente exclusivos de europeus e seus descendentes (Kayser *et al.*, 2008).

Como já foi referido anteriormente, a cor que os nossos olhos expressam é determinada pelo tipo, quantidade e distribuição de melanina na camada externa da íris. Deste modo, os olhos de tom castanho apresentam elevados níveis do pigmento eumelanina e grande quantidade de melanossomas; os olhos esverdeados apresentam níveis moderados de melanina e de melanossomas; e os olhos de tom azul apresentam baixa concentração tanto de melanina quanto de melanossomas (Sturm & Frudakis, 2004). Além disso, de todos os estudos relacionados com a predição de CEVs associadas à pigmentação, a predição da cor dos olhos é a que tem apresentado melhores resultados e maior precisão, principalmente quando os indivíduos em estudo têm ancestralidade europeia. Estes resultados foram possíveis após se realizarem GWAS (do inglês, *genome-wide association studies*; em português: estudos de associação genómica) que permitiram selecionar dezenas de SNPs (Tabela 1) como os melhores marcadores genéticos para inferir a variação da cor dos olhos nos europeus (Kayser *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009).

Tabela 1: SNPs utilizados em testes para a predição de características fenotípicas externamente observáveis relacionadas a pigmentação. **Adaptado de:** M.B. Virmond et al., Rev. Bras. Crimin. 5(2), 37-47, 2016

SNPs	Gene ¹	Cromossomo	Localização ou consequência funcional	Relacionada a pigmentação de
rs2378249	ASIP	20	Íntron ²	Cabelo
rs6119471	ASIP	20	Íntron	Olho e pele
rs6058017	ASIP	20	Variante na extremidade 3'UTR; Íntron	Olho e pele
rs4959270	EXOC2	6	Íntron	Cabelo
rs12913832	HERC2	15	Íntron	Olho, pele e cabelo
rs12203592	IRF4	6	Íntron	Olho, pele e cabelo
rs10777129	KITLG	12	Íntron	Pele
rs12821256	KITLG	12	Região intergênica ³	Olho e cabelo
N29insA	MC1R	16	Éxon	Cabelo e pele
Y152OCH	MC1R	16	Éxon	Cabelo e pele
rs11547464	MC1R	16	Missense ⁴	Cabelo e pele
rs885479	MC1R	16	Missense	Olho, pele e cabelo
rs1805008	MC1R	16	Missense	Olho, pele e cabelo
rs1805005	MC1R	16	Missense	Cabelo e pele
rs1805006	MC1R	16	Missense	Cabelo e pele
rs1805007	MC1R	16	Missense	Olho, pele e cabelo
rs1805009	MC1R	16	Missense; variante upstream do gene	Cabelo e pele
rs2228479	MC1R	16	Missense	Olho, pele e cabelo
rs1110400	MC1R	16	Missense	Cabelo e pele
rs1545397	OCA2	15	Íntron	Olho e pele
rs4778138	OCA2	15	Íntron	Olho
rs1800407	OCA2	15	Missense	Olho, pele e cabelo
rs1448484	OCA2	15	Íntron	Pele
rs12896399	SLC24A4	14	Íntron	Olho e cabelo
rs2402130	SLC24A4	14	Íntron	Cabelo e pele
rs1426654	SLC24A5	14	Missense	Olho, pele e cabelo
rs13289	SLC45A2	5	Variante upstream do gene	Pele
rs26722	SLC45A2	5	Íntron; missense; variante em gene não codificante	Olho
rs16891982	SLC45A2	5	Missense; Variante na extremidade 3'UTR; variante em gene não codificante	Olho, pele e cabelo
rs28777	SLC45A2	5	Variante downstream do gene; Íntron	Cabelo e pele
rs3829241	TPCN2	11	Íntron; missense; variante em gene não codificante	Pele
rs1393350	TYR	11	Íntron	Olho, pele e cabelo
rs1042602	TYR	11	Missense	Olho, pele e cabelo
rs1408799	TYRP1	9	Região intergênica	Olho e pele

Legenda 1: Nome dos genes (em inglês): **ASIP**- *Agouti Signaling Protein*; **EXOC2** - *Exocyst Complex Component 2*; **HERC2** - *E3 ubiquitin-protein ligase*; **IRF4** - *interferon regulatory factor 4*; **KITLG** - *KIT Ligand*; **MC1R** - *melanocortin 1 receptor*; **OCA2** - *oculocutaneous albinism II*; **SLC24A4** - *Solute Carrier Family 24, Member 4*; **SLC24A5** - *Solute Carrier Family 24 , Member 5*; **SLC45A2** - *Solute carrier family 45, member 2*; **TPCN2** - *two pore segment channel 2*; **TYR** – *tyrosinase*; **TYRP1** - *Tyrosinase-related protein 1*.

O gene OCA2, localizado no cromossoma 15, é responsável por codificar a proteína P – importante na síntese das proteínas dos melanossomas – e quando sofre uma mutação, desencadeia várias alterações no percurso da pigmentação, tais como o albinismo oculocutâneo tipo II (Brilliant, 2001; Walsh, Liu, *et al.*, 2011). Até recentemente, acreditava-se que este era o principal gene relacionado com a pigmentação da íris humana. Porém, um estudo posterior demonstrou que a origem da aparente associação poderia ser externa. Essa hipótese foi corroborada por estudos que demonstraram que o gene HERC2, localizado próximo ao OCA2, é o gene mais importante na codificação da

cor dos olhos. Além disso, variações neste gene regulam a expressão do OCA2 (Duffy *et al.*, 2007).

Em 2008, estudos paralelos de Eiberg *et al.* (2008) e Sturm *et al.* (2008) concluíram que o SNP rs12913832, no gene HERC2, era o marcador com maior poder de predição da cor dos olhos (Eiberg *et al.*, 2008; Sturm *et al.*, 2008).

Kayser *et al.* (2008) estudaram 3 SNPs para a predição da cor dos olhos (Tabela 1): o rs916977 situado no gene HERC2, e o rs11855019 e o rs7495174 situados no gene OCA2. Estes investigadores destacaram o SNP rs916977, também no gene HERC2, como o mais informativo, sugerindo grande potencial do mesmo para aplicações forenses (Kayser *et al.*, 2008).

Posteriormente, Spichenok *et al.* (2011) utilizaram 7 SNPs (Tabela 1), localizados próximos ou dentro de genes conhecidos pela sua importância na pigmentação, com o objetivo de conseguir prever a cor de olhos e cabelo em mais de 550 amostras de diversas populações (europeia e não europeias), obtendo resultados satisfatórios na predição de cor dos olhos em 6 dos 7 SNPs estudados: rs12913832 (HERC2), rs1545397 (OCA2), rs16891982 (SLC45A2), rs885479 (MC1R), rs6119471 (ASIP), e rs12203592 (IRF4). Assim, os autores concluíram que estes poderiam ser marcadores úteis para utilização em perícias forenses, uma vez que são aplicáveis a todas as populações, independentes da origem étnica, com elevada precisão (Spichenok *et al.*, 2011; Walsh, Liu, *et al.*, 2011).

Um outro trabalho muito importante, foi desenvolvido por Liu *et al.* (2009) com o objetivo de investigar o poder de predição da cor dos olhos em mais de 6000 holandeses. Para tal, inicialmente foram estudados 37 SNPs situados em 8 genes distintos. No final do estudo, foram selecionados 6 dos 37 SNPs situados em 6 dos 8 genes estudados (Tabela 1), ou seja, rs12913832 (HERC2), rs1800407 (OCA2), rs12896399 (SLC24A4), rs16891982 (SLC45A2), rs1393350 (TYR), e rs12203592 (IRF4), que se destacaram dos restantes. Estes marcadores permitiram obter os valores de relação entre sensibilidade e especificidade mais elevados até ao momento, sendo os tons castanhos previsíveis com 93%, os tons azuis com 91% e os tons intermédios com 72%. Este trabalho de investigação impulsionou todas os outros que levaram à produção de *kits* de fenotipagem do DNA para a cor dos olhos, entre eles o *IrisPlex* (Liu *et al.*, 2009).

2.2.2. A cor do cabelo

Ao contrário da cor dos olhos, a cor do cabelo pode sofrer alterações ao longo dos anos, uma vez que tons claros na infância podem escurecer durante a adolescência, e

com o decorrer da vida adulta ocorre o aparecimento de fios brancos. Essas alterações podem estar relacionadas com fatores hormonais, género do indivíduo, idade, exposição solar e inflamações, sendo a genética o principal determinante da cor natural do cabelo. Esta depende da presença de melanossomas no bolbo capilar, e a sua panóplia de tons (loiro, ruivo, castanho e preto), como já foi referido, ocorre pela variação da quantidade, tamanho, composição e distribuição desses melanossomas (Frudakis, 2008).

A presença de melanossomas com elevada densidade de eumelanina desencadeia a expressão de fios de cabelo castanhos e pretos, sendo estes mais escuros quanto maior o tamanho do melanossoma e maior a densidade do pigmento depositado. A presença de melanossomas menores e com menor quantidade do pigmento eumelanina desencadeia a expressão de fios de cabelo loiro. Por sua vez, a deposição de outro pigmento – a feomelanina – ou, em alguns casos, de eumelanina oxidada resultando num tom amarelo/avermelhado semelhante ao produzido pela feomelanina, desencadeia a expressão de fios de cabelo ruivo. Por último, quando ocorre uma redução dos melanócitos, e os que ainda persistem apresentam significativa diminuição de melanina, os fios perdem a sua tonalidade natural e apresentam uma cor branca (Frudakis, 2008).

Apesar dos melanócitos da pele e do cabelo apresentarem a mesma origem embrionária, os genes que afetam estas pigmentações podem expressar-se de forma independente gerando diferentes combinações de cores de pele e de cabelo. O gene alvo de estudos de associação e descrito como o maior contribuidor na variação normal da pigmentação em humanos é o MC1R – recetor de melanocortina 1 (Mandey, Schneiders, Koster, & Waterham, 2006). Este localiza-se no braço longo do cromossoma 16 e é responsável por codificar o receptor de MC1R acoplado à proteína G, presente na membrana dos melanócitos (Branicki, Brudnik, Kupiec, Wolanska-Nowak, & Wojas-Pelc, 2007). É um gene altamente polimórfico e que possui efeito pleiotrópico, ou seja, expressa uma multiplicidade de efeitos fenotípicos, e ainda desempenha um papel fundamental no controlo da melanogénese (Flanagan *et al.*, 2000; Rees, 2000).

A associação do gene MC1R com o cabelo ruivo foi inicialmente descrita em 1995 como sendo um gene que, quando ocorre uma mutação, funciona como um interruptor da produção de eumelanina, controlando a melanogénese. Este processo permite a produção excessiva de feomelanina, que se manifesta no cabelo ruivo e pele clara, fenótipo quase exclusivo da população europeia (Flanagan *et al.*, 2000; Rees, 2000; Sulem *et al.*, 2007).

Além desde gene, diversos GWAS foram capazes de identificar vários SNPs situados noutros genes associados a cores não ruivas de cabelo, como: SLC24A4, KITLG, HERC2, OCA2, TYR, MATP, TPCN2, e IRF4, sendo que alguns deles também

estão associados com a previsão da cor da íris e da pele (Han *et al.*, 2008; Sulem *et al.*, 2007).

No que se refere a estudos relacionados com a cor do cabelo, o primeiro trabalho realizado, que utilizou o DNA com intuito de prever a cor do cabelo de um indivíduo, restringiu-se ao estudo de indivíduos com cabelo de cor ruiva, tendo sido publicado em 2001 por Grimes *et al.* Embora os autores tenham utilizado uma amostra reduzida, demonstraram que com o seu teste de DNA baseado no estudo de 12 SNPs do gene MC1R, conseguiam 96% de previsões corretas para indivíduos com cabelos ruivos (Grimes, Noake, Dixon, & Urquhart, 2001).

O primeiro trabalho que estudou o DNA com forma de previsão de todas as cores de cabelo (castanho, preto, loiro e ruivo) foi publicado em 2007 por Sulem *et al.* e utilizou 2 SNPs do gene MC1R – rs1805008 e rs1805007. Inicialmente, os autores apenas conseguiram prever a expressão da cor de cabelo ruivo em cerca de 70% dos indivíduos (Sulem *et al.*, 2007). Numa abordagem subsequente, excluindo os indivíduos com cabelos ruivos, Sulem *et al.* previram as restantes cores de cabelo com base em 9 SNPs associados a 6 genes, no entanto, a previsão das cores de cabelo não-ruivo apresentou resultados pouco precisos (Kayser, 2015).

Posteriormente, em 2007, Branicki *et al.* sequenciaram totalmente o gene MC1R em mais de 180 indivíduos que possuíam variados tons de cabelo, incluindo 40 indivíduos com cabelo de cor ruiva e 36 indivíduos com cabelo de tonalidade loiro-ruivo e, com base nos resultados obtidos, desenvolveram um teste de DNA para a predição de cor de cabelo ruivo usando 5 SNPs do gene MC1R (Branicki *et al.*, 2007)

.Mais tarde, um estudo conduzido novamente por Branicki *et al.* (2011), em 385 indivíduos europeus, recorreu à utilização de 22 SNPs situados em 11 genes, tendo conseguido chegar a resultados satisfatórios de 93% para cabelo de cor ruiva, 87% para cabelo de cor preta, 82% para cabelo de cor castanha, e 81% para cabelo de cor loira. Este estudo revelou ainda que o SNP rs12913832, no gene HERC2, está significativamente associado a todas as cores de cabelo – de forma mais acentuada com fios de cor castanha e preta –, os SNPs no gene SLC45A2 (rs28777), gene IRF4 (rs12203592) e gene EXOC2 (rs4959270) estão relacionados com cabelos de tonalidade preta, e alguns SNPs no gene ASIP estão relacionados com o cabelo de tonalidade ruiva (rs2378249) e loiro/avermelhado (rs1015362) (Branicki *et al.*, 2011).

No mesmo estudo outros 2 genes revelaram ainda ser importantes na previsão da cor de cabelo: o gene OCA2 (rs4778138) que expressa e demonstra ter grande influência na coloração de cabelos castanhos, e o gene SLC24A4 que está associado a cabelos loiros (rs4904868) e loiros escuros (rs2402130). Como a maioria dos genes utilizados neste estudo foram capazes de predizer com alta precisão a cor do cabelo, tornaram-se

importantes aquando o desenvolvimento de *kits* com o objetivo de conjugar a previsão simultânea da cor de olhos e a cor do cabelo, como por exemplo, o *HlrIsPlex* (Branicki *et al.*, 2011).

2.2.3. A cor da pele

Em comparação com a previsão da cor dos olhos e do cabelo, a cor da pele é uma CEV bastante mais complexa de prever. Esta complexidade pode ser explicada devido ao cruzamento de indivíduos de diferentes continentes e de diferentes etnias, bem como a adaptações ambientais relacionadas com a localização do planeta em que o indivíduo habita, nomeadamente cor de pele clara em zonas mais frias, e cor de pele mais escura em zonas mais quentes (Chaitanya *et al.*, 2018).

De modo a evitar falsos positivos, que poderiam ocorrer devido aos diferentes antecedentes genéticos de um indivíduo, os estudos conduzidos para a previsão da cor da pele têm sido realizados em amostras geneticamente homogêneas. Estas amostras incluem, principalmente, indivíduos europeus ou sul-asiáticos uma vez que são os grupos populacionais com uma variação mais subtil de tonalidades de cor pele (Kayser, 2015).

Para além da complexidade da previsão desta CEV, ainda existem poucos estudos, na área forense, que sejam capazes de prever a cor de pele recorrendo à fenotipagem de SNPs com resultados satisfatórios, ao contrário do que acontece com a previsão da cor de cabelo e olhos. No entanto, a partir de 2011, ocorreu um investimento científico em estudos relacionados com a aplicação da fenotipagem de DNA, sendo desenvolvido e validado um teste com 7 SNPs para a previsão da cor da pele, nomeadamente dos tons claros, intermédios e escuros, sendo 4 SNPs associados à população europeia, 2 associados à população asiática e 1 associado à população afro-americana. Anterior à análise de DNA, todos os indivíduos preencheram um questionário indicando a sua etnia, e ainda foi avaliada a resposta da cor da sua pele à luz ultravioleta (UV). Esta resposta, categorizada numa escala de seis níveis, foi criada por Thomas B. Fitzpatrick e consiste em dividir as diferentes tonalidades da cor de pele de um indivíduo em indivíduos de cor de pele branca-pálida e geralmente descendentes de países com clima muito frio, como por exemplo a Áustria (tipo I); indivíduos de cor de pele branca, geralmente descendentes de países com clima frio, como por exemplo a Alemanha (tipo II); indivíduos de cor de pele branca que se bronzeiam facilmente (tipo III); indivíduos de cor de pele bronzeada-clara (tipo IV); indivíduos de cor de pele parda (tipo V); e indivíduos de cor de pele negra (tipo VI). Contudo, embora a taxa de erro deste teste tenha sido baixa (1%), somente 72% das amostras apresentaram resultados corretos

para a previsão da cor da pele (398 de 554) sendo necessárias mais avaliações, deste teste, de modo ser aplicado nos laboratórios forenses (Pulker *et al.*, 2007).

Subsequentemente, Spichenok *et al.* (2011) concluíram que ao adicionar outros marcadores genéticos aos 7 testados no estudo anterior, poderiam obter resultados mais satisfatórios para a previsão da cor da pele (Spichenok *et al.*, 2011). Deste modo, adicionaram mais um SNP ao *multiplex*, totalizando 8 SNPs, e alteraram a interpretação dos resultados. Os marcadores selecionados para aperfeiçoar o teste anterior foram os SNPs rs12913832, rs16891982, rs6119471, rs1426654, rs885479 e rs1545397, em que 5 estavam relacionados com cores de pele claras e 1 relacionado com a cor de pele escura. Apesar da adição de um novo SNP ao *multiplex* e das alterações na interpretação de resultados, apenas 75% das amostras conseguiram apresentar resultados satisfatórios para a previsão da cor de pele (Hart *et al.*, 2013). Todavia, apesar deste novo teste não apresentar resultados tão conclusivos como os obtidos no âmbito da previsão da cor dos olhos e cabelo, foi considerado um método robusto, reproduzível e confiável, sendo posteriormente testado com DNA obtido a partir de diferentes amostras, diferentes quantidades e em amostras degradadas, confirmando que esta é uma metodologia adequada para a previsão da cor de olhos e pele, auxiliando na identificação de pessoas desaparecidas e/ou restos humanos (Mushailov, Rodriguez, Budimlija, Prinz, & Wurmbach, 2015).

Mais tarde, em 2014, Maroñas *et al.* selecionaram 59 SNPs de modo a avaliar as diferenças de tonalidade da cor da pele entre populações da África, Europa e a mistura de ambas, ou seja, indivíduos europeus e não europeus. Do total, destacaram-se 29 SNPs, sendo selecionados os 10 mais relevantes: rs16891982 (SLC45A2), rs1426654 (SLC24A5), rs10777129 (KITLG), rs6058017 (ASIP), rs1408799 (TYRP1), rs1448484 (OCA2), rs3829241 (TPCN2), rs13289 (SLC45A2), rs2402130 (SLC24A4) e rs6119471 (ASIP), os quais apresentaram previsões bem-sucedidas, nomeadamente 99,9% de resultados corretos para a previsão da cor de pele branca, 80,3% de resultados corretos para a previsão da cor de pele intermédia e 96,6% de resultados corretos para a previsão da cor de pele escura. Em estudos posteriores reduziu-se o número de SNPs para 6 e foi possível alcançar bons resultados, contudo, os autores comentaram que com os 10 SNPs selecionados inicialmente conseguia-se prever mais satisfatoriamente a cor de pele intermédia (Maronas *et al.*, 2014).

Mais recentemente, em 2018, Chaitanya *et al.* desenvolveram o sistema *HirisPlex-S* que compreende três modelos de previsão estatística simultaneamente, nomeadamente para cor de olhos, cor de cabelo e cor de pele. Este sistema foi desenvolvido a partir de dois sistemas validados por Walsh *et al.*, o *IrisPlex* e *HirisPlex*, que serão posteriormente mais aprofundados. Este sistema reúne na sua constituição 41

SNPs e permite a previsão de 4 categorias de cor de cabelo, 3 categorias de cor de olhos e 5 categorias de cor de pele, apresentando, no máximo, 70% de resultados corretos para a previsão da cor da pele (Chaitanya et al., 2018).

Em geral, o sucesso dos GWAS depende da homogeneidade ancestral dos indivíduos que participam nesses estudos. Em Europeus é relativamente fácil estudar a pigmentação dos olhos e cabelo, uma vez que estas características evoluíram homogeneamente em indivíduos desta bio ancestralidade, ou seja, exclusivamente europeia. Contudo, ao existir uma variação global entre grupos continentais, no que respeita à sua pigmentação de pele, a predição desta CEV torna-se difícil de analisar e, deste modo, a quantidade de informação que se consegue obter, quando se pretende efetuar a predição desta característica, é menos relevante que a informação obtida acerca de marcadores associados à pigmentação dos olhos e do cabelo (Chaitanya *et al.*, 2018).

Deste modo, apesar de todos os esforços académicos, estudos relacionados com a previsão da cor da pele ainda não alcançaram resultados tão satisfatórios como para a previsão da cor de olhos e cabelo, sendo necessários mais testes em diferentes populações heterogêneas de modo validar o sistema *HirisPlex-S*, bem como os testes previamente descritos, permitindo, assim, a previsão simultânea desta CEV com as restantes características, aumentando o leque de informações acerca da aparência física do indivíduo em estudo (Kayser, 2015).

3. Os sistemas *IrisPlex* e *HirisPlex*

Como já foi referido anteriormente, a cor dos olhos é a CEV mais estudada, existindo um sistema que já está a ser utilizado proporcionando a sua previsão. Este sistema de genotipagem *multiplex*, denomina-se *IrisPlex*, e foi criado e testado para fins forenses em 2010 por *Walsh et al.* com base no primordial estudo de *Liu et al.* (2009), conseguindo analisar DNA presente em diminutas concentrações (30pg) e/ou degradado com elevada precisão (superior a 94%) (*Liu et al.*, 2009; *Walsh, Liu, et al.*, 2011).

Este *kit* permite a análise de 6 SNPs codificantes da cor da íris, pertencentes a 6 genes diferentes, sendo os genes *HERC2* e *OCA2* os que mais contribuem para a previsão deste fenótipo. Assim, ao aplicar o sistema *Irisplex*, em DNA extraído de uma amostra biológica, obtêm-se três valores de probabilidade de a amostra pertencer a indivíduos cuja cor da íris pertence a uma de três categorias: cor da íris azul, cor da íris castanha ou cor da íris verde ou intermédia. Estes valores resultam da utilização de uma fórmula proposta por *Liu et al.* (2009) tendo em conta os resultados obtidos para cada um dos 6 SNPs na amostra em estudo (*Liu et al.*, 2009). A categoria que apresentar maior valor de probabilidade é assumida como a cor da íris do indivíduo ao qual a amostra pertence (*Walsh, Liu, et al.*, 2011). Contudo, para um resultado ser conclusivo, não é suficiente existir uma categoria com o valor de probabilidade mais elevado uma vez que esse valor tem de representar uma probabilidade igual, ou superior, a um determinado valor *cut-off* para a interpretação dos resultados do *IrisPlex* que, após vários testes, se concluiu ser de 0.7 como sendo o valor mais aceitável (*Pneuman, Budimlija, Caragine, Prinz, & Wurmbach*, 2012; *Walsh et al.*, 2014). Este valor foi selecionado a partir da curva ROC (Característica de Operação do Receptor ou do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) do estudo Holandês realizado por *Liu et al.* em 2009, uma curva que ilustra o desempenho de um sistema e que, neste caso, determinou o valor de especificidade 0,7 como o limiar do sistema *IrisPlex* (*Walsh, Liu, et al.*, 2011).

Concluindo, uma amostra dir-se-á pertencente a um indivíduo de olhos de certa cor, se o resultado do sistema *Irisplex* atribuir um valor de pelo menos 70% de probabilidade para a categoria dessa mesma cor, e os restantes 30% (ou menos) se apresentarem distribuídos pelas restantes categorias, perfazendo um total de 100%. Contudo, é importante referir que este limiar de 70% não se trata de um valor imposto uma vez que corresponde a um valor determinado consoante a *performance* do sistema em amostras conhecidas, o que significa que cada laboratório, ao usar este sistema, pode definir o valor de *cut-off* que lhe pareça mais ajustado consoante o caso em análise após a validação deste sistema (*Ruiz et al.*, 2013; *Walsh et al.*, 2014).

De modo a verificar se este sistema poderia ser usado por todos os laboratórios forenses e se os resultados seriam consistentes entre laboratórios, em 2013, o grupo EDNAP (*European DNA Profiling group*) desenvolveu um estudo de validação do *IrisPlex* com a colaboração de 21 laboratórios (18 europeus, 2 australianos e 1 americano) (Chaitanya *et al.*, 2014; Kayser, 2015). Com este ensaio multicêntrico concluiu-se que o sistema *IrisPlex* produzia os mesmos resultados quer em laboratórios sem qualquer experiência no uso de SNPs, quer em laboratórios que já tinham previamente contactado com o sistema *IrisPlex* (Walsh, Lindenbergh, *et al.*, 2011).

Para além deste estudo em grande escala, outros estudos foram realizados de modo a testar a aplicabilidade deste *kit* a diversas populações. Um dos estudos, com esse intuito, foi realizado na população alemã em que a validação do *IrisPlex* foi realizada com base no teste de 102 indivíduos, usando o mesmo valor de *cut-off* que Walsh *et al.* (2013) e concluindo que este é um método bastante robusto e sensível (J.Purps, 2011).

Uma vez que todos os estudos foram aplicados em populações de origem exclusivamente europeia, tornou-se imperativo estudar se poderiam ser aplicados em populações de outras origens geográficas, ou com perfis genéticos resultantes de várias combinações étnicas (Freire-Aradas *et al.*, 2014). Assim, na Nova Zelândia, Allwood *et al.* (2013) testaram 19 SNPs de 10 genes diferentes, com outro sistema *multiplex* distinto do *IrisPlex*, numa amostra de 101 indivíduos da população neo-zelandesa, que possui origem biogeográfica muito variada. Os resultados foram depois comparados com o *IrisPlex*, aplicado às amostras da mesma população. Concluiu-se que o sistema *multiplex* que estava a ser utilizado na Nova Zelândia apresentava uma taxa de erro de cerca de 26% superior à do *IrisPlex*, sendo a precisão deste último de 89% para a cor de olhos azuis e 94% para a cor de olhos castanha (Allwood & Harbison, 2013).

Um outro estudo, com o mesmo objetivo, utilizou o *IrisPlex* numa amostra de 64 indivíduos, de origem europeia e asiática, em que apenas 50 dos 64 resultados satisfizes a condição de existir uma categoria de cor de olhos com mais de 70% de probabilidade. Contudo, o ensaio chegou à sua conclusão com uma precisão de 94%, tendo-se verificado que o grau de precisão diminuía nos indivíduos que apresentavam cruzamentos entre diversas etnias nas gerações prévias. Apesar desta constatação, o *IrisPlex* conseguiu fazer corresponder corretamente todos os casos nas categorias de cor azul e cor castanha. No entanto, nenhuma amostra da categoria intermédia foi classificada correctamente. Com este estudo concluiu-se que, embora seja possível aplicar este sistema de fenotipagem a indivíduos com origem genética em várias regiões geográficas, o nível de precisão destes resultados será sempre inferior quando comparados com os estudos anteriormente realizados em indivíduos com apenas uma origem étnica (Allwood & Harbison, 2013).

Em 2013, foi realizado um outro estudo, semelhante ao anteriormente descrito, com o objetivo de avaliar a aplicação do sistema *IrisPlex* em populações de origens heterogêneas, com 200 indivíduos considerados representativos de toda a população dos Estados Unidos da América. Utilizando o *cut-off* de 0.7, 67% das previsões demonstraram resultados corretos, 18% inconclusivos e 15% incorretos, sendo que, a categoria que engloba indivíduos com iris de cor intermédia não apresentou nenhum resultado correto. Uma vez que a origem geográfica dos indivíduos em estudo era bastante diversificada, os autores deste trabalho de investigação concluíram que o *IrisPlex* não é tão eficaz na população americana, como é na europeia, e que mais estudos seriam necessários para esclarecer esta questão. Como nota final, os autores salientaram que os resultados incorretos e inconclusivos correspondiam a indivíduos heterozigóticos no rs12931382 (HERC2). Portanto, ficou demonstrado que seria importante realizar mais estudos em populações de origens biogeográficas diferentes na Europa, de modo a entender melhor a relação entre a mistura genética destas populações e a precisão da previsão de cor dos olhos baseada na utilização de SNPs (Dembinski & Picard, 2014).

Pelo exposto anteriormente, o grupo HGDP-CEPH (*Human Genome Diversity Project*), da Universidade de Stanford, propôs organizar um estudo mundial para testar o sistema *IrisPlex* na previsão da cor dos olhos, analisando um total de 940 amostras de DNA. A previsão da cor dos olhos demonstrou ser correta apenas no que se referia às amostras europeias. Quanto aos resultados nas amostras de regiões como Ásia, África, Oceânia e de nativos americanos, apenas se apresentaram corretos relativamente aos indivíduos de olhos castanhos (Spichenok *et al.*, 2011; Walsh, Liu, *et al.*, 2011).

Posteriormente, em 2014, Yun *et al.* avaliaram mais de 900 amostras de indivíduos provenientes de 12 populações da Eurásia tendo concluído que os 6 SNPs presentes no sistema *IrisPlex* são eficazes para uma correta previsão da cor de olhos da população europeia, não sendo os melhores para a previsão da cor dos olhos de populações não europeias. Além disso concluíram ainda que, em 900 amostras, o *IrisPlex* não conseguiu prever nenhum resultado correto para casos de indivíduos com a iris de cores intermédias (Yun, Gu, Rajeevan, & Kidd, 2014).

Pelo atrás referido, a principal limitação apontada pelos vários estudos em relação à aplicação do *Irisplex* refere-se à reduzida sensibilidade deste sistema para a categoria de olhos com a iris de cor intermédia. Nesta categoria incluem-se os casos de heterocromia e dos olhos verdes, ou seja, de todas as cores de olhos que não são especificamente azuis ou castanhos. Apesar da elevada especificidade para esta categoria, a sensibilidade do *Irisplex* não é tão elevada como para as outras duas categorias em que a sensibilidade excede os 94% e apresenta taxas de erro reduzidas

(Walsh *et al.*, 2012). Tendo em conta esta limitação, Ruiz *et al.* (2013) desenvolveram um ensaio alternativo para chegar a uma correta previsão da cor dos olhos recorrendo a 23 SNPs, previamente estudados em indivíduos de origem europeia. Como conclusão deste trabalho, os autores realçam o facto de que a adição de mais SNPs no sistema *IrisPlex*, particularmente no que se refere a SNPs situados nos genes *HERC2* e *OCA2*, aumentava a precisão das previsões realizadas para indivíduos com olhos de cor intermédia. Desta forma, foi possível obter melhores resultados, com valores de precisão de 0,999 para a cor de olhos azul, 0,990 para a cor de olhos castanha e 0,816 para a cor de olhos intermédia (Ruiz *et al.*, 2013). Posteriormente, seguindo as recomendações destes últimos investigadores (Ruiz *et al.*) para efectuar uma melhor previsão da cor de olhos intermédia, Freire-Aradas *et al.* (2014) demonstraram que a inclusão do SNP rs1129038 (*HERC2*) no sistema *IrisPlex* melhorava a previsão desta cor de olhos em indivíduos Americanos, do Médio Oriente e ainda da Ásia Ocidental (Freire-Aradas *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2013).

Uma outra questão, que também foi colocada relativamente à aplicação do *IrisPlex*, foi a de saber de que modo o género do indivíduo (masculino e feminino) poderia influenciar a sensibilidade deste sistema para a correta previsão da cor dos olhos, uma vez que em 2013 se tinha concluído que os indivíduos do sexo feminino teriam maior tendência para expressar olhos de cor escura (maior número de resultados na categoria cor castanha e intermédia) do que os indivíduos do sexo masculino (maior número de resultados na categoria cor azul). Perante esses resultados, suspeitou-se da existência de um fator relacionado com o género do indivíduo, e ponderou-se adicionar este factor no algoritmo desenvolvido e aplicado a partir do *IrisPlex* (Martinez-Cadenas, Pena-Chilet, Ibarrola-Villava, & Ribas, 2013). Posteriormente, Pietroni *et al.* (2014) testaram esta hipótese e decidiram avaliar a mesma na população italiana. Verificou-se então que o género tinha uma influência de 4.9% na variação da saturação da cor da íris, na população estudada, e que este valor era muito superior ao encontrado nos países do norte da Europa, como na Dinamarca e na Suécia (0.09%), onde este mesmo fenómeno foi também estudado (Andersen *et al.*, 2013). Contudo, após uma nova análise de vários estudos que avaliaram o impacto do género nos resultados obtidos com o *IrisPlex*, concluiu-se que, o conhecimento prévio do género do indivíduo em causa não melhorava a sensibilidade do *IrisPlex* em nenhuma das categorias. Concluiu-se ainda que este fenómeno dependia da origem biogeográfica de cada género (Pietroni *et al.*, 2014).

Uma investigação realizada por Walsh *et al.* (2012) validou ainda o sistema *Irisplex* na predição da cor de olhos de vários indivíduos de diferentes populações, de várias origens geográficas, verificando-se que este sistema não necessita de qualquer informação prévia, seja a origem biogeográfica ou o género do indivíduo. Além do já

referido, trata-se de um *kit* capaz de analisar DNA presente em quantidades reduzidas e/ou degradado. O *IrisPlex* tornou-se, então, no único método de fenotipagem disponível, até então, suficientemente sensível, fiável e robusto para ser aplicado por rotina nas investigações médico-legais e forenses, para a previsão da cor dos olhos (Walsh *et al.*, 2012).

Tendo como ponto de partida este sistema, e para uma fenotipagem mais completa e informativa, começaram a ser desenvolvidos outros *kits* que incluem diferentes marcadores para CEVs, como por exemplo, para a cor, forma e implantação do cabelo, para a cor da pele, entre outras (Walsh, Liu, *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2013).

Um desses *kits* de fenotipagem de DNA mais recentes é atualmente muito valorizado uma vez que reúne os SNPs usados no *IrisPlex* com SNPs informativos para a cor do cabelo num único sistema (Walsh, Lindenbergh, *et al.*, 2011). Este sistema, denominado *HirisPlex*, foi desenvolvido pelo mesmo grupo que criou o *IrisPlex* (Walsh *et al.*) e, como já referido, permite prever simultaneamente a cor de olhos e de cabelo mais prováveis de determinado indivíduo, representando mais um avanço na área da genética forense (Walsh *et al.*, 2012). Este *kit* recorre ao *Excel* de modo a facilitar o uso interativo por parte do utilizador, sendo apenas necessário introduzir o número de alelos *minor* (0, 1 ou 2) de cada uma das 24 variantes de DNA constituintes deste sistema. Desta forma, é possível obter valores de probabilidade (Figura 2) baseados no modelo de previsão da cor de olhos (*IrisPlex*), sendo obtido um valor de probabilidade para a cor de cabelo preto, castanho, ruivo e loiro, outro valor de probabilidade para tonalidade de cabelo escura ou clara, e ainda um terceiro valor de probabilidade para a cor de olhos (castanho, azul ou intermédio) (Walsh *et al.*, 2013).

O sistema *HirisPlex* reúne os 6 SNPs do *IrisPlex* com 22 SNPs relacionadas com a cor do cabelo (sendo 4 SNPs comuns a ambos os *kits*), apresentando elevada sensibilidade em amostras degradadas e/ou em presentes em pouca quantidade, tal como o seu antecessor, uma das características mais importantes na área da genética forense (Walsh *et al.*, 2013).

De modo a possibilitar a aplicação desta nova metodologia nas práticas forenses, foram realizados vários testes em amostras de sangue, sêmen e saliva (algumas com quantidade ínfima de DNA) e em 88% dos casos foram obtidos perfis completos de DNA (Walsh *et al.*, 2014). Testado em mais de 1500 indivíduos de três regiões da Europa, 80% dessas amostras (n = 1243) foram utilizadas para a construção do sistema de previsão da cor de cabelo e 20% (n = 308) para a sua validação. Os resultados obtidos foram de 80% para a cor de cabelo ruivo, 87,5% para a cor de cabelo preto, 78,5% para a cor de cabelo castanho e 69,5% para a cor de cabelo loiro, comprovando que este sistema era fiável e capaz de obter resultados bastante

satisfatórios. Segundo os autores, os valores inferiores a 80%, nomeadamente nas categorias de cor castanha e loira, poderão estar relacionados com indivíduos que eram loiros aquando a sua infância e a quem o cabelo escureceu durante a sua adolescência, uma vez que todos os indivíduos em estudo eram adultos. Dos 157 indivíduos irlandeses utilizados neste estudo, 8 foram classificados como loiros, cor de cabelo que correspondia à sua fotografia, contudo, em 14 indivíduos com tonalidade de cabelo desde castanho-claro a preto, o sistema *HlrPlex* indicou alta probabilidade ($p > 0,7$) de serem loiros. Acontece que, 8 desses indivíduos, reconheceram que durante a sua infância apresentavam cabelo loiro (Walsh *et al.*, 2013).

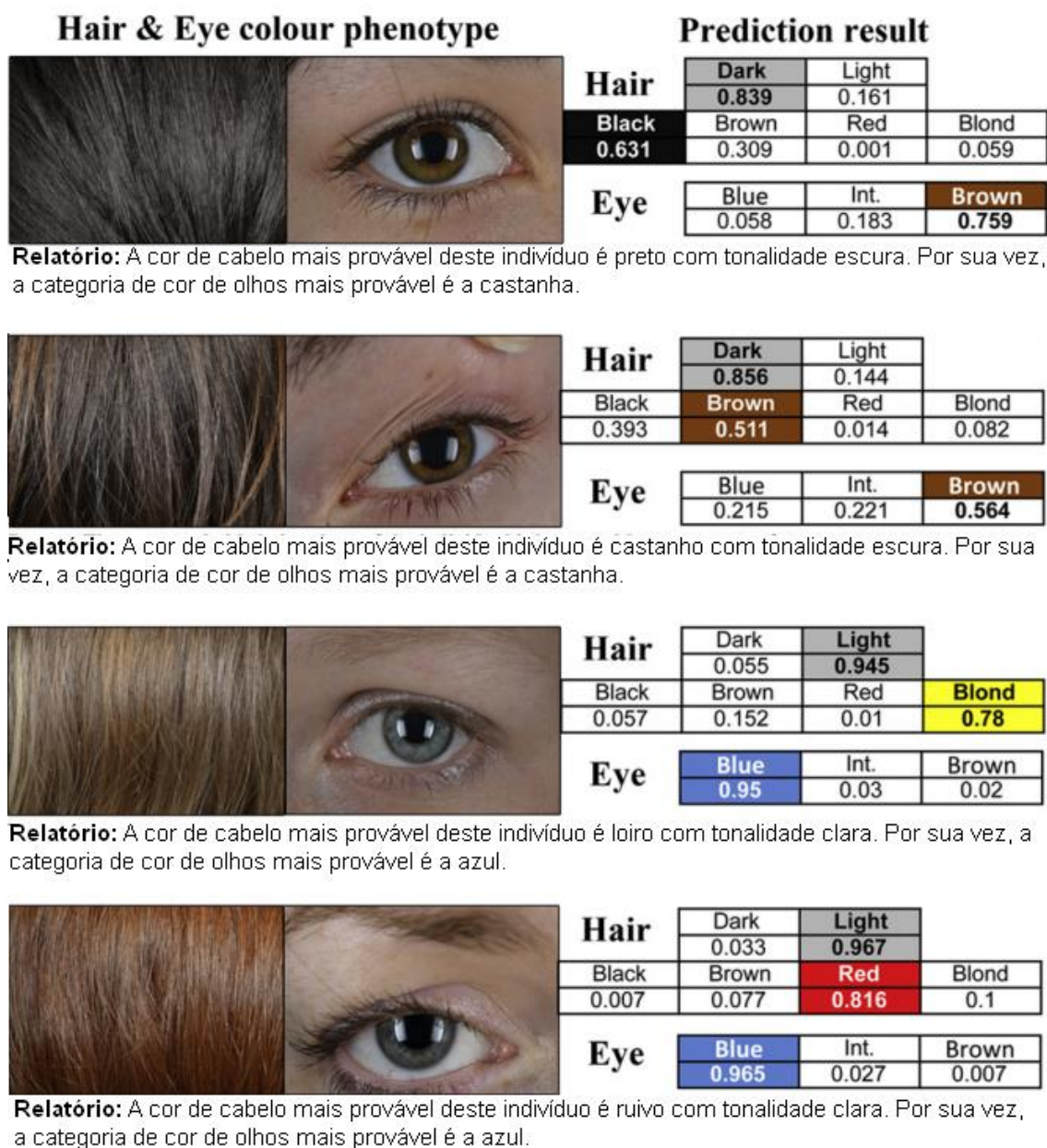


Figura 2: Exemplos de indivíduos Europeus submetidos ao estudo da previsão de cor de olhos e cor de cabelo, pelo sistema *HlrPlex*. **Adaptado de:** Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., Kosiniak-

Kamysz, A., . . . Kayser, M. (2013). The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet*, 7(1), 98-115. doi:10.1016/j.fsigen.2012.07.005

Em 2014 a validação do *HirisPlex* foi publicada. Este sistema é constituído por 24 SNPs: os SNPs Y152OCH, N29insA, rs1805006, rs11547464, rs1805007, rs1805008, rs1805009, rs1805005, rs2228479, rs1110400, e rs885479 que pertencem ao gene MC1R, os SNPs rs28777 e rs16891982 do gene SLC45A2, o SNP rs12821256 do gene KITLG, o SNP rs4959270 do gene EXOC2, o SNP rs12203592 do gene IRF4, os SNPs rs1042602 e rs1393350 do gene TYR, o SNP rs1800407 do gene OCA2, os SNPs rs2402130 e rs12896399 do gene SLC24A4, o SNP rs12913832 do gene HERC2, o SNP rs2378249 do gene ASIP/PIGU, e o SNP rs683 do gene TYRP1 (Walsh *et al.*, 2013).

Após a publicação de Walsh *et al.* (2013) que incluiu a listagem dos SNPs que constituíam este sistema, o mesmo grupo de trabalho através da utilização do sistema *HirisPlex*, efetuou a previsão da cor do cabelo em amostras relativas a diferentes populações mundiais, do grupo HGDP-CEPH. Assim, em indivíduos originários de zonas distantes da Europa, nomeadamente Ásia Oriental, Oceânia, África Subsaariana e nas Américas, onde predominam cabelos escuros, o *HirisPlex* identificou maioritariamente indivíduos de cor de cabelo preto. Na Europa, Rússia, Israel e algumas zonas do Paquistão, onde existe maior variação na cor desta CEV, o *HirisPlex* identificou indivíduos com todas as categorias da cor de cabelo (loiro, ruivo, castanho e preto). Estes resultados reflectem as descobertas realizadas por este grupo anteriormente, ao utilizar o sistema *IrisPlex* com o objetivo de fazer a previsão mundial. Nesses estudos, apenas a categoria de cor de olhos castanha foi prevista correctamente em algumas destas regiões, isto é, nas regiões mundiais onde predominam olhos de cor castanha. Assim, este estudo permitiu concluir que, através do uso do sistema *HirisPlex*, a previsão simultânea da cor de cabelo e olhos, é fiável, sendo passível de ser utilizado à escala mundial e em aplicações forenses, independentemente do conhecimento prévio da ancestralidade biogeográfica do indivíduo, ou seja, sem que haja necessidade de efectuar testes complementares de ancestralidade (Walsh *et al.*, 2013).

O sistema *HirisPlex* também foi testado em amostras de DNA extraídas a partir de ossos e dentes com cerca de 800 anos de idade *post-mortem*, tendo a sua aplicação permitido obter 23 perfis completos das 26 amostras de DNA extraídas, demonstrando a sua adequação na análise de DNA degradado (Draus-Barini *et al.*, 2013).

Como curiosidade, refere-se uma aplicação recente dos marcadores de DNA incluídos no sistema *HirisPlex*, que foram analisados com sucesso, de modo a conseguir prever a cor de olhos e cor de cabelo do rei Ricardo III de Inglaterra (1452-1485), cuja

identidade tinha sido revelada através da análise do mtDNA por comparação com os seus descendentes vivos, ou seja, com os seus parentes por linha materna. Usando o sistema *HirisPlex* foi possível prever que o indivíduo a quem pertencia o DNA analisado apresentava uma probabilidade de 96% de expressar cor de olhos azul, e ainda uma probabilidade de 77% de expressar cabelos loiros, informações que se revelaram coerentes, a avaliar pelos retratos existentes da aparência física do rei (King *et al.*, 2014).

Como limitações que podem resultar da aplicação deste sistema, pode-se considerar a dificuldade evidente na previsão da cor de cabelo de indivíduos que alteraram a sua cor natural ao longo da vida. Este tipo de alteração física ocorre em indivíduos que durante a sua infância apresentam uma cor de cabelo loiro ou castanho-claro e, nos quais, à medida que ocorre o seu envelhecimento para uma idade adulta, essa cor de cabelo sofre uma transformação para uma cor de cabelo castanho-escuro ou preto. Uma explicação para este fenómeno é a existência de uma alteração hormonal que é possível que ocorra durante a adolescência. Porém, esta explicação não pode ainda ser comprovada, uma vez que, mecanismos moleculares decorrentes de fenómenos que escurecem o cabelo, necessitam de outros estudos adicionais (Rees, 2003). Assim, de modo a contabilizar este fenómeno, Walsh *et al.* (2013) sugeriram a realização de questionários aos indivíduos em estudo, de modo a mais facilmente se identificar quais deles terão sofrido esta transformação no decurso do tempo (Walsh *et al.*, 2013).

Uma outra situação que pode ocorrer no âmbito da utilização do sistema *HirisPlex*, podendo constituir uma limitação, e que não é considerada nos seus cálculos ou em qualquer outro sistema de fenotipagem atual, é o aparecimento dos cabelos de cor grisalha ou brancos, ou seja, cabelos que perderam a sua tonalidade natural com o avançar da idade. Este efeito que ocorre no cabelo, de uma grande parte dos indivíduos, necessita também de mais estudos a nível molecular de modo a ser possível desenvolver biomarcadores preditivos para estas alterações da tonalidade original dos cabelos.

Por fim, é importante referir que o sistema *HirisPlex* foi desenvolvido com o objetivo de ser aplicado no âmbito forense. Por este motivo, seguiu e correspondeu a todas as diretrizes do grupo SWGDAM (*Scientific Working Group on DNA Analysis Methods*) em termos de sensibilidade, estabilidade, reprodutibilidade, precisão e exatidão, especificidade de espécie, amostras de trabalho e estudos populacionais. Além disso, este sistema supera muitos ensaios de genotipagem usados atualmente, em termos de sensibilidade e em aplicações forenses, uma vez que requer uma quantidade diminuta de apenas 63pg (picograma) de DNA de modo a obter perfis genéticos completos (Walsh *et al.*, 2014). Deste modo, conjugando todas as suas vantagens laboratoriais com a sua facilidade de utilização, é possível afirmar que o uso do sistema *HirisPlex* é uma mais-valia em qualquer laboratório forense. Acresce dizer que a sua

possível utilização no âmbito das investigações criminais em Portugal, à semelhança do que se passa noutros países, poderia ser o auxílio que as autoridades tanto necessitam em alguns dos casos de identificação humana, quer no que respeita a casos de identificação cadavérica, quer a casos que envolvem a identificação de suspeitos de diversos crimes (Walsh *et al.*, 2013).

No entanto, para que todos estes ensaios e estudos dêem frutos, e para que a fenotipagem possa ser usada como método corrente de investigação, é fundamental informar a sociedade, e debater os mitos e preconceitos existentes elaborando leis que deixem claro quais as fronteiras e limites éticos da fenotipagem do DNA e com que objetivos e em que circunstâncias é que esta se pode realizar.

4. Aplicação da fenotipagem em Portugal

Um dos estudos realizados, a nível nacional, incidiu na obtenção dos perfis genéticos de indivíduos residentes no norte de Portugal e imigrantes da Europa de Leste, maioritariamente Ucrânianos residentes em Portugal (Lurdes Pontes & Pinheiro, 2014). Neste estudo, aplicou-se um *multiplex* que inclui 52 SNPs de identificação humana, desenvolvido pelo *SNPforID*, um consórcio internacional criado com esse objetivo, nas duas amostras populacionais já referidas, tendo-se obtido as frequências alélicas para cada um deles e, posteriormente, realizando diferentes comparações populacionais, quer entre as duas populações estudadas quer entre estas com outras populações descritas até então. Outros estudos posteriores, também recorreram ao *software* disponibilizado pelo consórcio *SNPforID*, um navegador de internet (<http://www.snpforid.org/>) de livre acesso, para a consulta e visualização de dados, onde o utilizador pode aceder a painéis validados de SNPs para uma variedade de aplicações forenses. Deste modo, esta interface permite ao visitante revisar as frequências de alelos dos marcadores estudados de todas as populações mundiais disponíveis, permitindo a comparação populacional entre Portugal e outras nacionalidades presentes no navegador (Valle-Silva *et al.*, 2019).

Com este trabalho, e relativamente aos 52 SNPs estudados, foi possível obter 91.6% de perfis genéticos completos da população portuguesa, e 96.5% de perfis genéticos completos da população imigrante, constituída maioritariamente por Ucrânianos. Quando comparados os resultados entre as duas populações, estas apresentaram diferenças genéticas significativas entre si. Posteriormente, todas as amostras foram comparadas com perfis genéticos de populações do Noroeste de Espanha e da Rússia, uma vez que são os países mais próximos das populações em estudo. Os resultados desta comparação demonstraram existir uma enorme semelhança entre as populações da Rússia e da Eslovénia, e uma distinção acentuada entre as populações da Rússia com as restantes nacionalidades (Portuguesa, Ucrâniana e Espanhola) (Amigo, Phillips, Lareu, & Carracedo, 2008). Para surpresa das autoras, a população do norte de Portugal e a população residente a noroeste de Espanha, apresentaram diferenças significativamente entre si, facto que pode ser explicado devido a este *multiplex* incluir alguns SNPs simultaneamente informativos de ancestralidade, ou seja, marcadores com elevado poder discriminatório entre populações (Lurdes Pontes & Pinheiro, 2014).

Em conclusão, apesar deste estudo não ser específico para a aplicação da fenotipagem forense em Portugal, os resultados obtidos por Lurdes & Pinheiro, evidenciam que os 52 SNPs propostos pelo consórcio *SNPforID*, a cuja informação

completa se pode aceder por consulta do respetivo *website*, apresentam elevada sensibilidade para as populações portuguesas e imigrantes. Concluiu-se ainda que os laboratórios forenses nacionais poderão recorrer a esta metodologia de análise de modo a solucionar casos específicos, ou seja, sempre que houver necessidade de estudar marcadores genéticos adicionais, quer para fins de identificação humana, quer para averiguação oficiosa de paternidade (Lurdes Pontes & Pinheiro, 2014).]

Em 2015, outro estudo desenvolvido por um grupo de investigadores ligados ao Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, IP publicaram um estudo realizado a nível nacional que utilizava amostras de cidadãos portugueses e imigrantes Guineenses residentes no país, de modo a prever as suas características fenotípicas externamente observáveis, nomeadamente a cor dos olhos e a cor de pele, recorrendo ao sistema *IrisPlex* e à adição de 3 *loci* relacionados com a cor de pele (Dario *et al.*, 2015). Segundo estes investigadores, o estudo foi considerado pertinente uma vez que marcadores genéticos para a identificação de um indivíduo podem auxiliar na resolução de um crime de forma similar ao testemunho convencional de testemunhas oculares, ajudando as forças policiais na determinação do perfil de um suspeito e, provavelmente, com um menor risco de exacerbar a pressão social (Kayser & Schneider, 2009).

O objetivo original deste estudo era o de avaliar se o sistema *IrisPlex* poderia ser aplicado na população portuguesa, contudo, com o conhecimento de novos sistemas, nomeadamente o *HirisPlex*, e sabendo que com mais marcadores genéticos se conseguiria prever um maior número de características fenotípicas externamente observáveis, os autores decidiram testar se seria possível complementar os SNPs presentes no sistema *IrisPlex* com *loci* adicionais. Para tal, foram selecionados os 6 SNPs constituintes do sistema *IrisPlex*, anteriormente referidos neste trabalho, e três *loci* adicionais: rs1129038 (HERC2), rs2424984 (ASIP) e rs1426654 (SLC24A5). As razões para esta seleção, relativamente ao primeiro SNP (rs1129038), tiveram por base o facto de que este tinha sido descrito em estudos anteriores como sendo bastante preditivo para a cor dos olhos e que, adicionalmente, estava relacionado com a síntese da cor de pele. Relativamente ao segundo SNP (rs2424984) este era categorizado como o terceiro contribuidor genético mais significativo para a variação da refletância fenotípica da pele. O motivo da escolha do terceiro SNP (rs1426654) era o facto de estar presente num gene (SLC24A5) há muito conhecido por estar envolvido na determinação da cor da pele (Lamason *et al.*, 2005; Valenzuela *et al.*, 2010), como também já foi referido neste trabalho. Além disso, o locus rs1426654 explica *per se* a diferença no índice de melanina da pele entre 25% e 38% entre pessoas de ascendência europeia vs de ascendência na África Ocidental, respetivamente (Soejima & Koda, 2007).

No decorrer do mesmo estudo, dois dos SNPs presentes no sistema *IrisPlex* (rs1393350 e rs12203592) não demonstraram ser estatisticamente significativos, tal como Walsh *et al.* (2013) referiram em estudos anteriores, conclusão que pode refletir a existência maior heterogeneidade genética nas amostras do estudo português, bem como um número de amostras inferior ao utilizado no estudo de Walsh *et al.* (2013) (Dario *et al.*, 2015).

Quanto aos restantes marcadores genéticos, para a previsão da cor dos olhos, e com um valor *cut-off* de 0,5 – valor determinado após validação deste sistema em amostras nacionais conhecidas – 138 de 192 amostras (72%) apresentaram previsões fenotípicas corretas, apenas 22 amostras (11%) apresentaram previsões fenotípicas incorretas, e 32 amostras (17%) apresentaram resultados inconclusivos. Em comparação com estudos internacionais já referidos nesta tese, Dario *et al.* (2015) obtiveram, mais especificamente, 90% de resultados corretos para a previsão da cor de olhos castanhos, em comparação a 56% de resultados corretos para a previsão da cor de olhos castanhos do estudo de Walsh *et al.* (2011) com o mesmo valor *cut off*, e 60% de resultados corretos para a previsão da cor de olhos azuis em comparação aos 91,6% de Walsh *et al.*, (2011), não sendo possível comparar os resultados com o valor de *cut off* de 0.7, uma vez que o estudo português não obteve resultados conclusivos com tal limiar (Walsh, Liu, *et al.*, 2011).

No que diz respeito à previsão da cor da pele houve a necessidade de excluir o SNP rs12913832 devido à sua forte ligação com SNP rs1129038, e os marcadores rs1800407, rs12896399, rs1393350 e rs1129038 não apresentaram resultados estatisticamente significativos, sendo apenas referidos no trabalho devido à sua importância no contexto da fenotipagem. Além disso, o modelo aplicado não apresentou resultados precisos uma vez que Portugal é a região mais a sudoeste de Europa e, como tal, não residem neste país indivíduos dos tipos I e II (peles de cor pálida) do fotótipo *Fitzpatrick*. Consequentemente, a fim de realizar de forma satisfatória a análise estatística, esses indivíduos foram reunidos na mesma categoria que os tipos III e IV (peles morenas) do fotótipo de *Fitzpatrick*, categorias que correspondem principalmente a indivíduos de bioancestralidade mediterrânea. Devido a esta insuficiência de amostra representativa de todas as categorias, apenas foi possível prever a cor de pele negra e a cor de pele clara (branca), limitação que poderia ser resolvida em estudos futuros envolvendo uma amostra populacional mais significativa. Embora a previsão das várias categorias de cor da pele tenha apresentado algumas barreiras, na diferenciação da cor negra com a cor branca, o estudo de Dario *et al.* (2015) apresentou resultados excelentes obtendo 95% de previsões corretas. Para a distinção de indivíduos de cor de pele branca e negra foram avaliados os valores *cut off* de 0.5 e 0.7 e, tal como na previsão da cor dos

olhos, o valor 0.7 apresentou demasiados resultados inconclusivos, sendo selecionado o valor final de 0.5 como o limite mais aceitável (Dario *et al.*, 2015).

Como nota final, Dario *et al.* (2015) salientaram a importância de realizar estudos adicionais ao desenvolvido, uma vez que a implementação e validação interna de qualquer *multiplex* forense necessita de estudos específicos para a população de interesse a fim de avaliar satisfatoriamente a aplicação de certos marcadores genéticos para essa mesma população (Walsh *et al.*, 2012). Desde o desenvolvimento e disponibilização do sistema *IrisPlex*, como também já foi anteriormente referido, foram publicados vários estudos resultantes da sua aplicação em diferentes populações, nomeadamente em populações Eslovenas, da Eurásia e dos Estados Unidos. Todos estes estudos demonstraram que este sistema apresenta limitações para as populações da Ásia e dos EUA, apresentando resultados moderadamente preditivos (Dembinski & Picard, 2014; Yun *et al.*, 2014). Tal como outros investigadores, Dario *et al.* (2015) propõem que, este fenómeno ocorre devido ao facto da escolha destes marcadores ter sido orientada para o estudo de amostras de indivíduos europeus, ocorrendo erros de previsão quando os indivíduos em estudo são de outras etnias ou de diferente ancestralidade (Dario *et al.*, 2015).

Em 2019, no âmbito do Mestrado em Medicina Legal, uma dissertação com o tema “Marcadores genéticos e determinação da cor dos olhos”, e defendida por Andreia Machado, teve como objetivo analisar a influência de variações genéticas nos genes OCA2, HERC2, SLC24A4, TYR, SLC45A2 e IRF4 – genes constituintes do sistema *IrisPlex* – no desenvolvimento de diferentes padrões de pigmentação da íris, numa população universitária no Norte de Portugal. Contudo, após a genotipagem das 130 amostras, 5 dos 6 genes não apresentaram resultados conclusivos, ou seja, os genes OCA2, IRF4, SLC24A4, TYR e SLC45A2 não demonstraram estar associados com a variação da pigmentação da íris naquela população (A. Machado, 2019).

Deste modo, tal como os autores acima referidos, realça-se a importância de estudar outras populações, particularmente de regiões extrínsecas à Europa, para a avaliação e otimização da previsão de CEVs de indivíduos de outras ancestralidades. Para Portugal, tais populações seriam maioritariamente constituídas por indivíduos de origem Africana uma vez que, devido à proximidade da região do Mediterrâneo com o Norte de África, e ao fluxo genético resultante das múltiplas interações entre essas duas regiões, países Mediterrâneos, especialmente os do Sul, apresentam uma maior ancestralidade africana, quando comparados a países da Europa Central e Oriental (Plaza *et al.*, 2003).

5. Reflexão sobre implicações éticas e legais

Nos últimos anos, grandes avanços na análise do genoma humano expandiram a nossa compreensão sobre a variabilidade genética entre populações e indivíduos. Tais avanços são considerados de forma controversa por inúmeras entidades uma vez que, ao ser possível expor uma diversidade de informações genéticas, se colocam em causa vários princípios fundamentais incluindo a privacidade individual, a liberdade e a igualdade (Fujimura & Rajagopalan, 2011; Gonzalez-Tapia & Obsuth, 2015). Contudo, é possível afirmar que tais estudos forneceram informações importantes à comunidade científica relacionadas com diferentes áreas do conhecimento como patologias, comportamentos humanos, padrões de migração populacional e questões forenses (Binstock, Hafeez, Metchnikoff, & Arron, 2014; Edgar, 2007).

A aplicação da genética no âmbito forense permite a análise e a fenotipagem de marcadores genéticos interligados a características físicas (como cabelo, olhos e cor da pele) e à ancestralidade permitindo criar um vínculo entre suspeitos e cenas de crimes e ainda a identificação de cadáveres não identificáveis por outros meios, relacionados ou não com desastres de massa (Kayser, 2015; Pulker *et al.*, 2007; Walsh *et al.*, 2014).

No entanto, antes que estes progressos genéticos possam ser integrados na rotina forense de laboratórios científicos portugueses, é necessário debater as implicações éticas, legais e sociais associadas a esses métodos com intuito de esclarecer e envolver a sociedade civil em geral e, em particular, os agentes associados à investigação criminal, de modo a todos contribuírem para a discussão da introdução da FDP na rotina laboratorial nacional, e serem todos beneficiados com a segurança que esta proporciona.

5.1. Legislação existente relativa à FDP

Um estudo conduzido em 2008 que analisou as legislações internas de 11 países em torno da fenotipagem forense de DNA concluiu que, tal como em Portugal, a maioria dos países em estudo apresentavam algumas referências à tipagem de DNA na sua legislação (Tabela 2) (Schellekens, 2008). Contudo, essas leis restringiam a análise forense na obtenção de perfis genéticos e a comparação destes com perfis armazenados numa base de dados genéticos de perfis de DNA, limitando a potencialidade da informação obtida através de uma análise mais minuciosa da amostra biológica obtida em cena de crime, uma vez que apenas se conseguiria identificar o sexo do indivíduo a quem pertencia a amostra e realizar um estudo comparativo daquela amostra com outras retiradas do local de crime, ou disponibilizadas por familiares. (Toom *et al.*, 2016).

Por outro lado, alguns países já reformularam a sua legislação permitindo a utilização da fenotipagem molecular para fins forenses, sendo esta explicitamente decretada. No Reino Unido esta técnica encontra-se implementada na rotina laboratorial e pode ser utilizada de modo a inferir a etnia dos indivíduos em estudo como auxílio na investigação criminal (Tabela 2). Um caso britânico de sucesso que recorreu à FDP foi a condenação do criminoso “*Night Stalker*” em que se inferiu a etnia do suspeito e esta informação permitiu orientar uma investigação de 20 anos sem pistas e com relatos contraditórios acerca da etnia do agressor (Slabbert & Heathfield, 2018).

Atualmente, os Estados Unidos da América não apresentam uma legislação federal nacional sobre o uso da FDP em investigações criminais, dependendo a sua utilização da legislação aplicada em cada Estado onde se localiza determinado laboratório forense (Tabela 2). Por exemplo, no estado do Texas é permitido aos laboratórios forenses recorrerem a esta técnica livremente e sem restrições. Nos estados de Indiana, Rhode Island e Wyoming, a legislação restringe o uso do DNA a marcadores não codificantes e exclusivamente para identificação pessoal. No estado de Vermont, existe uma situação mista, a legislação embora proíba a identificação de doenças médicas e genéticas, permite a utilização da fenotipagem para fins de investigação (Slabbert & Heathfield, 2018).

Entretanto a Holanda foi a primeira a sofrer alterações formalizadas na sua legislação em Maio de 2003, de modo que passou a permitir, explicitamente, o uso do DNA na previsão de CEVs de um indivíduo desconhecido, ampliando assim o leque de informações obtidas através de um perfil genético clássico, obtido com base apenas em STRs (Tabela 2) (Schellekens, 2008). Contudo, o código Holandês limita a previsão dessas características visíveis apenas e só àquelas que podem contribuir para a

investigação forense. Deste modo, pretende-se proteger a privacidade do indivíduo, estipulando então que, apenas as características conhecidas do suspeito e apenas as presentes e visíveis no momento do seu nascimento, possam ser estudadas e registadas, como por exemplo o seu sexo, a sua etnia e a cor dos seus olhos e cabelo (Slabbert & Heathfield, 2018).

Tabela 2: Resumo da legislação aplicada em diferentes países quanto à aplicação da Fenotipagem Forense

País	Legislação referente à FDP	Notas
Portugal	Sem legislação explícita	Permite a obtenção de perfis genéticos para posterior análise comparativa; É apenas aferido o sexo do indivíduo.
Austrália; Espanha; África do Sul		A obtenção de perfis genéticos é limitada ao uso de marcadores não codificantes.
Brasil	Proibido	Implicações éticas, tais como a privacidade, não permitem a aceitação desta metodologia
Holanda	Apresenta legislação explícita	Limita a FDP para a previsão da cor dos olhos, cor de cabelo, cor de pele e sexo.
Alemanha		A FDP pode ser utilizada para a previsão da idade, cor de olhos, cor de cabelo e cor de pele
Reino Unido		Técnica implementada na rotina laboratorial; É permitido utilizar a FDP para inferir a etnia de um indivíduo.
Estados Unidos		Texas
	Vermont	A FDP pode ser utilizada para a previsão de CEVs, contudo é proibida a sua utilização para a previsão de doenças
	Rhode Island; Wyoming	A FDP pode ser utilizada livremente caso apenas se usem marcadores não codificantes

FDP – *Forensic DNA Phenotyping*; CEVs – Características Externamente Visíveis

No Brasil, embora muito promissora, a aplicação prática da fenotipagem forense ainda é um assunto recente em discussão, sendo a questão da violação do direito à privacidade (Art. 5 da Constituição Federal de 1988) um dos principais impasses legais, uma vez que as leis e princípios que regem os direitos do cidadão brasileiro não permitem o conhecimento e divulgação das suas características físicas através do seu DNA (Tabela 2). De facto, segundo a legislação brasileira "...as informações genéticas contidas nos bancos de dados de perfis genéticos não poderão revelar traços somáticos ou comportamentais das pessoas, exceto a determinação genética do seu género..." ("Lei n.º 12654/12," 28 de maio de 2012). Assim, em princípio, a utilização da FDP em laboratórios forenses brasileiros apenas será utilizada quando a análise convencional por STRs for insuficiente para elucidar um crime, sendo assim uma técnica de auxílio na investigação e não poderá ser usada como prova para incriminar determinado indivíduo.

A Alemanha, até finais de 2019, limitava a previsão de características externas a marcadores não codificantes, o que não excluía a utilização da FDP uma vez que marcadores de DNA não codificantes permitem identificar as mesmas características que marcadores codificantes, quanto maior for o desequilíbrio da sua ligação (Tabela 2) (Slabbert & Heathfield, 2018). Aliás, alguns marcadores de DNA utilizados e sugeridos para fins de FDP são SNPs intrónicos e, portanto, por definição, não são codificantes, como por exemplo, o SNP preditivo HERC2 rs12913832 para a cor dos olhos (Visser, Kayser, & Palstra, 2012; Walsh, Liu, *et al.*, 2011; Walsh *et al.*, 2013). Deste modo, devido ao conhecimento da dinâmica do genoma humano e aos vários avanços da ciência neste assunto, uma distinção entre marcadores codificantes e não codificantes é considerada desatualizada e, portanto, não deveria ser utilizada para regular a aplicação de FDP de DNA para fins forenses, sendo sugerido por Kayser (2015) que, em vez da referência do uso forense de DNA, deveria ser regulamentado um propósito forense específico como por exemplo, identificação individual, ou previsão da aparência para fins de investigação (Kayser, 2015). Assim, a partir de 2019, a lei Alemã aprovou a utilização da FDP para a previsão de CEVs como a cor de olhos, cor de cabelo, cor de pele e, ainda, a idade (Granja & Machado, 2020).

Quanto a Portugal, África do Sul, Espanha e Austrália esta metodologia não apresenta qualquer menção na sua legislação, e nos últimos três países – África do Sul, Espanha e Austrália – ainda é limitada a obtenção de perfis genéticos a marcadores não codificantes (Tabela 2) (Santos, 2015; Slabbert & Heathfield, 2018).

5.2. Argumentação subjacente à inclusão de FDP na investigação criminal

Segundo um estudo português conduzido em 2013, relativamente à existência de uma base de dados nacional onde estariam armazenadas informações genéticas de todos os indivíduos residentes no país e que poderia ser acedida de modo a facilitar perícias forenses, dos 628 indivíduos inquiridos apenas 46.5% consentia sobre disponibilizar as suas informações genéticas de modo a estas serem armazenadas (H. Machado & Silva, 2014). No ano seguinte (em 2014), na Suíça, foi realizado um estudo semelhante ao anteriormente referido e, neste estudo, apenas 29.2% dos inquiridos concordavam com a existência de uma base de dados nacional que incluísse o perfil genético de todos os indivíduos residentes naquele país. Analisando este estudo com mais profundidade, permite-nos constatar que, uma das questões do inquérito incidia na recetividade ao uso de marcadores fenotípicos como auxílio nas investigações forenses, à qual 83.8% dos 284 inquiridos responderam ser recetivos. Entre os indivíduos recetivos, a maioria referiu que a aceitação do uso da FDP iria depender da severidade do crime em causa, em que os crimes ameaçadores da vida ou que colocassem em risco a integridade física ou sexual (homicídios, violações) seriam os que justificavam a aplicação desta metodologia (Zieger & Utz, 2015).

Das restantes questões que se referiam a marcadores fenotípicos (cor dos olhos, cor do cabelo, cor da pele e origem étnica/geográfica), todos apresentaram pelo menos 70% de aceitação. Ainda relativamente a este inquérito, a origem geográfica foi a característica fenotípica cuja inclusão mereceria menor aceitação, com a justificação de que os custos envolvidos seriam elevados e que a interpretação dos resultados poderia levar a conclusões erradas, devida à ocorrência de uma falta de sensibilidade nesta interpretação com conseqüente discriminação das respetivas minorias étnicas. Infelizmente as questões éticas relacionadas com o uso destes marcadores codificantes foram pouco mencionadas no estudo, contrariamente ao esperado (Zieger & Utz, 2015).

Assim sendo, torna-se importante debater a necessidade de recorrer a marcadores codificantes nas perícias forenses e conseqüentemente ao debate das implicações éticas que daí advêm uma vez que a aplicação da FDP e de uma possível base de dados armazenando as suas informações pode colocar em causa princípios éticos como a liberdade, a privacidade e a igualdade, caso não sejam devidamente esclarecidas e salvaguardadas.

Uma das principais implicações éticas que dificulta a aceitação global da FDP é a possibilidade de violação de privacidade do indivíduo em estudo uma vez que a previsão das suas características físicas através de DNA pode proporcionar a revelação de um

fenótipo oculto, como por exemplo uma doença genética ou uma predisposição subjacente, bem como um traço físico alterado intencionalmente. Contudo, esta implicação foi debatida por Kayser & Schneider (2009) que esclareceram que a previsão de CEVs não viola a privacidade individual uma vez que as características investigadas são externas e visíveis a todos, fornecendo as mesmas informações, ou mesmo informações mais fidedignas, que uma testemunha ocular. Estas testemunhas oculares, por sua vez, podem mais facilmente ser influenciadas por preconceitos e potencialmente ser afetadas por memórias subjetivas (Kayser & Schneider, 2009).

Refere-se ainda que já em 2007, em Portugal, o Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida (CNECV) emitiu um parecer onde defendia que “caso fosse encontrada uma associação entre um marcador não codificante e uma doença ou um traço comportamental, esse marcador deveria ser retirado do painel e que todos os dados que fossem obtidos anteriormente com esse marcador deveriam ser eliminados” de modo a limitar assim a possível discriminação genética que poderia ocorrer tanto pelas forças policiais como por outras entidades de serviço público, como as seguradoras e empresas que necessitem de clientes ou trabalhadores com certo património genético (ou falta deste) (CNECV, 2007). Além disso, a legislação portuguesa (Lei n.º 12/2005, de 26 de Janeiro) salienta explicitamente que é proibida a realização de testes genéticos com o objetivo de selecionar trabalhadores e ainda refere, no que respeita às companhias de seguros, que estas não podem utilizar qualquer tipo de informação genética para recusar um seguro ou estabelecer prémios mais elevados consoante a previsão da debilidade da saúde de um indivíduo. Nessa mesma lei, nomeadamente no artigo 19º, também se referenciam os bancos de produtos biológicos que são, por definição, “qualquer repositório de amostras biológicas ou seus derivados, com ou sem tempo delimitado de armazenamento, quer utilize colheita prospectiva ou material previamente colhido, quer tenha sido obtido como componente da prestação de cuidados de saúde de rotina, quer em programas de rastreio, quer para investigação, e que inclua amostras que sejam identificadas, identificáveis, anonimizadas ou anónimas” indicando que estes bancos “constituídos para fins forenses de identificação criminal, ou outros, devem ser objecto de regulamentação específica” (“Lei n.º 12/2005,” 26 de Janeiro de 2005).

Uma outra lei, nomeadamente a Lei n.º 5/2008 de 12 de Fevereiro, referente à base de dados de perfis de DNA para a identificação civil e criminal, “estabelece os princípios de criação e manutenção desta base, regulando, para o efeito, a recolha, tratamento e conservação de amostras de células humanas, a respetiva análise e obtenção de perfis de DNA e a metodologia de comparação de perfis de DNA extraídos das amostras, bem como o tratamento e conservação da respetiva informação em ficheiro informático”. Esta mesma lei, nomeadamente no capítulo VII, responsabiliza o

Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses para reger as operações que sejam aplicáveis à utilização da base de dados, e a Comissão Nacional de Proteção de Dados (CNPd) para fiscalizar as condições de funcionamento, bem como as condições de armazenamento das amostras, para certificação do cumprimento das disposições relativas à proteção de dados pessoais ("Lei n.º 5/2008," 12 de Fevereiro de 2008).

A previsão do sexo de um indivíduo é uma característica incluída habitualmente nos *kits* de utilização forense de modo a aferir o sexo do indivíduo, podendo por vezes não coincidir com o seu género. A inclusão do marcador – amelogenina –, no entanto, não sofreu o escrutínio de que outros marcadores fenotípicos estão atualmente a ser alvo provavelmente devido ao já muito longo período da sua utilização neste âmbito forense. Contudo, deve-se reconhecer que a cor do cabelo, a cor dos olhos e a cor da pele de um indivíduo não são necessariamente mais privados do que o conhecimento do seu sexo. Assim sendo, pode-se incentivar a inclusão da FDP para a previsão de outras CEVs à semelhança do que se faz com a determinação do sexo de um indivíduo. Como o já referido, o sexo de um indivíduo pode ser considerado igualmente privado em comparação à cor da sua pele, uma vez que, por exemplo, atualmente já podem ser reveladas anomalias genéticas ligadas ao sexo e outras informações profundamente privadas acerca de um indivíduo, como por exemplo a deteção de uma trissomia ou de uma outra síndrome. Assim, a inclusão do marcador amelogenina alegando a sua capacidade de fornecer pistas forenses e para fins de identificação, suscita o debate da inclusão de outros marcadores fenotípicos utilizando o mesmo argumento. Deste modo, a legalização da previsão do sexo de um indivíduo define um precedente para a futura inclusão de outros marcadores fenotípicos em perícias forenses, desde que os resultados sejam tratados com a mesma confidencialidade que as anomalias ligadas ao sexo (M'Charek, 2008).

Uma outra implicação ética referida na bibliografia consultada e que é adversa à inclusão da FDP em laboratórios forenses, refere-se ao armazenamento físico dos dados fenotípicos obtidos e sobre a possibilidade de acesso a tais informações durante, e possivelmente após, uma investigação. Este acesso indevido à informação armazenada poderia conduzir ao uso inadequado desses mesmos dados genéticos de modo a detetar outro tipo de características como alterações de ordem médica ou comportamentais de um indivíduo o que poderia incentivar a sua discriminação com base na sua predisposição genética (Slabbert & Heathfield, 2018; Toom *et al.*, 2016).

No entanto, e em sua defesa, ou seja, da inclusão da informação fenotípica na prática forense, argumenta-se que estas questões podem ser devidamente regulamentadas com a implementação adequada de legislação relativa aos

procedimentos de segurança e armazenamento, diminuindo assim a possibilidade desta técnica se tornar um risco para a privacidade da população (Kayser & Schneider, 2009).

Um segundo argumento fundamenta-se no facto de que os *kits* de fenotipagem de DNA disponíveis, que foram desenvolvidos para prever a aparência normal de um indivíduo, normalmente não são informativos para outras situações, como é o caso da detecção de mutações relacionadas com diferentes patologias que podem ter subjacente uma causa genética. Por exemplo, o gene OCA2 determina o albinismo oculocutâneo de tipo 2, uma forma específica de albinismo, e esse mesmo gene encontra-se envolvido na biossíntese da pigmentação da pele, olhos e cabelo. No entanto, as mutações que ocorrem no gene OCA2 e que causam esta doença são diferentes dos SNPs que estão envolvidos na biossíntese em que estes participam, sendo portanto impossível, através da previsão da cor de pele, dos olhos e do cabelo, por exemplo, identificar as mutações presentes neste gene (Simeonov *et al.*, 2013). Outro argumento defensivo relacionado com este, alega que, apesar do risco de comportamento antiético ser elevado e de poder levar a consequências indesejáveis, o interesse público e a segurança da sociedade na identificação de um cadáver ou na identificação e ou condenação de um criminoso, supera a possível descoberta de uma possível patologia genética associada a um determinado indivíduo. Contudo, esta última questão deve ser tratada com a devida sensibilidade (Slabbert & Heathfield, 2018; Toom *et al.*, 2016).

Uma terceira implicação associada à fenotipagem molecular incide sobre os possíveis efeitos negativos sobre os direitos fundamentais, como é o caso do direito a um julgamento justo. Ocorre que, devido ao "efeito CSI", as provas forenses assumiram uma importância muito elevada nas etapas de um julgamento (Whittall, 2008). Sucintamente, este efeito fundamenta-se no facto de que se verifica um aumento das expectativas irrealistas de um júri, que em muitos casos pode integrar indivíduos não especialistas na área da genética forense, em relação às evidências forenses que são apresentadas em tribunal, que ocorre devido à ficcionalização das mesmas nos programas televisivos que as apresentam como conclusivas e irrefutáveis, podendo ser uma explicação para a preocupação da sociedade acerca da utilização da FDP (Scott & Skellern, 2010).

Estas expectativas demasiado elevadas na prova genética conduzem ao receio generalizado dos cidadãos facultarem a sua autorização para o uso livre dos seus dados genéticos. Tais informações poderiam potencializar a discriminação de grupos minoritários, elevando a desconfiança dos cidadãos acerca da manipulação de perfis genéticos por parte das autoridades. Deste modo se explica o motivo pelo qual nos países em que esta metodologia é aceite e regulamentada, as recomendações passaram a incluir o uso de fenotipagem molecular apenas como auxiliar das investigações

forenses proibindo o seu uso como prova científica em Tribunal (Slabbert & Heathfield, 2018).

De modo a avaliar os impactos sociais, culturais, éticos, regulamentares e políticos do uso da FDP em laboratórios forenses da União Europeia (UE), um estudo conduzido por Granja & Machado (2020) realizou, entre Março de 2016 e Maio de 2018, 29 entrevistas a especialistas forenses, oriundos de treze países europeus diferentes e licenciados em diversas áreas como, por exemplo, Biologia, Genética e Medicina. Como temas abordados nas entrevistas foram questionados a organização dos serviços de genética forense no país em que o participante estava sediado, opiniões e experiências sobre o intercâmbio transnacional de dados de DNA na UE, e as percepções das inovações e desenvolvimentos da FDP (Granja & Machado, 2020).

Este estudo teve como principal objetivo explorar a opinião de cientistas forenses quanto ao potencial da FDP em contexto forense e as repercussões do seu uso, uma vez que esses profissionais apresentam os conhecimentos necessários para moldar a regulamentação de tal metodologia, e ainda influenciar a distribuição de responsabilidades entre os diferentes campos legais (Granja & Machado, 2020).

No decorrer das entrevistas, e tal como referido anteriormente, os especialistas referem que atualmente existe uma série de interesses comerciais, de entretenimento e dos *media* em exagerarem a potencialidade do uso da FDP, e ainda salientam que tal exaltação da técnica cria diversos desafios, principalmente quando os especialistas têm que explicar às forças policiais as limitações da legislação quanto à FDP e o que não é legalmente permitido desvendar com esta técnica. Diante de tais cenários, os especialistas forenses consideram que a principal forma de evitar, ou diminuir, os efeitos de tal exaltação, seria debater as limitações do FDP, principalmente entre autoridades que trabalham diretamente com tais metodologias. de modo a todos compreenderem as contingências envolvidas e diminuir os riscos da sua utilização inadequada. Como nota final, a maioria dos entrevistados concordou que a FDP deveria, idealmente, ser restrita a casos criminais graves, uma vez que pode fornecer informações úteis quando outras metodologias apresentam resultados inconclusivos, devendo-se apenas prever as CEVs de um indivíduo caso este tenha cometido um crime muito grave, como um homicídio ou violação, ou ainda, se o crime em causa apresenta o risco de se perpetuar no tempo (Granja & Machado, 2020).

Como referido anteriormente, e apoiado pelo estudo de Granja & Machado (2020), de modo a combater os receios inerentes à utilização da FDP, as entidades policiais de investigação deveriam de ser submetidas a uma formação adequada sobre a interpretação de resultados, de modo a evitar a simplificação excessiva de descrições e perfis físicos. Seria ainda necessário informar a população de que o objetivo de incluir a

fenotipagem molecular não serviria para ser utilizada isoladamente no decorrer de uma investigação, mas como uma meio complementar que permite obter informações adicionais relacionadas com determinadas evidências forenses (Cho & Sankar, 2004; Frudakis, 2008).

Por fim, embora a fenotipagem molecular carregue preocupações a nível bioético que é importante reconhecer e abordar, importa também referir as suas vastas vantagens e o seu valor social. Assim, a fenotipagem molecular tem um impacto importante na análise do material genético em processos forenses, nomeadamente contribuir para melhorar a investigação nos casos de identificação criminal ou em casos de pessoas desaparecidas. A previsão precisa de CEVs pode ajudar a diminuir o universo de possíveis suspeitos implicados num determinado crime, através da exclusão positiva de indivíduos, permitindo assim economizar tempo e recursos financeiros durante uma investigação criminal. Permite ainda atribuir uma identidade a vítimas desconhecidas (desaparecidas ou vítimas de desastres de massa), e a restos humanos não reclamados porque, devido ao seu estado de decomposição ou fragmentação, não possibilitam o seu reconhecimento na fase de autópsia forense (Slabbert & Heathfield, 2018).

6. Materiais e Métodos

6.1. Metodologia

Foi realizada uma revisão bibliográfica com base em artigos científicos encontrados sobre o tema, na literatura disponível, na base de dados *PubMed* usando as palavras-chave: *Irisplex*, *HirisPlex*, *forensic genetics*, *eye color prediction*, *hair color prediction*, *Ethical implications of DNA phenotyping*, *Legal considerations on DNA phenotyping and social discrimination* e *Portuguese database*.

Com base nas informações encontradas nos artigos científicos revistos, foi ainda realizada uma reflexão, a nível ético, das repercussões da fenotipagem forense em Portugal, utilizando, ainda, o *website* da Assembleia da República (url: <https://www.parlamento.pt/Legislacao/Paginas/ConstituicaoRepublicaPortuguesa.aspx>) de modo a enquadrar a legislação portuguesa na mesma reflexão.

6.2. Protocolo sugerido

Em primeiro lugar, relativamente á amostragem sugere-se o estudo de diferentes tipos de amostras biológicas: obtidas em locais de crime (sangue, saliva, sémen) ou retiradas de cadáver(s) (sangue, saliva, osso, polpa dentária).

Seguidamente, estas amostras teriam de ser submetidas a uma extração de DNA, um procedimento frequente em todas as perícias realizadas no âmbito da genética forense. A extração de DNA consiste em isolar esta molécula, presente no núcleo das células, e excluir outras estruturas celulares, purificando assim a amostra para a realização de uma análise laboratorial adequada. Esta etapa pericial apresenta vários protocolos disponíveis dependendo do peso molecular do DNA que se pretende obter, tendo evoluído ao longo da história da genética forenses. Historicamente sempre que se necessitava da obtenção de DNA de alto peso molecular, efetuava-se uma extração orgânica com fenol-clorofórmio, ou com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, que permitia obter DNA de elevada pureza. Posteriormente utilizou-se um método de extração que usava uma resina, o Chelex[®] 100, que tornava a etapa de extração mais rápida, sendo fácil e eficiente especialmente no caso de amostras de sangue e saliva (Simon, Shallat, Williams Wietzikoski, & Harrington, 2020).

Durante muito tempo, utilizou-se um anticoagulante, como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em detrimento da heparina que inibe a PCR, para tratar o sangue colhido, material que podia ser eluído de modo a que a extração de DNA e posterior amplificação por PCR fosse eficaz. Atualmente, com os *kits* de amplificação de última geração, basta impregnar uma pequena quantidade de sangue num papel de filtro e é possível partir diretamente para a amplificação sem necessidade de extração. Quando as amostras são de saliva, é possível tratá-las com um tampão especial que permite isolar o DNA de modo a ser usado na fase seguinte da PCR. Sugere-se portanto usar zaragatoas bucais neste tipo de estudos, sempre que seja possível.

Também quando as amostras em estudo são ossos antigos degradados e com um número reduzido de sequências-alvo intactas, as análises de DNA são principalmente propensas a contaminações, sendo por vezes necessário realizar uma purificação precedente à extração de DNA (Schmidt *et al.*, 2020). Segundo Schmidt *et al.*, num estudo realizado em amostras provenientes do Departamento de Antropologia Histórica de *Göttingen*, as etapas que as amostras ósseas devem ser submetidas antes da amplificação enzimática através da PCR, são:

- a) A preparação da amostra, realizando uma descontaminação preventiva desta e moê-la em pó fino;

- b) A extração de DNA, consistindo em estágios de descalcificação, lise celular e purificação de DNA;

Para a realização desta técnica podem ser utilizados protocolos que utilizam reagentes preparados no próprio laboratório ou, mais frequentemente, através do uso de *kits* comerciais que simplificam o procedimento (Toole *et al.*, 2019). Contudo, independentemente do protocolo utilizado para a extração de DNA, em todos eles algumas etapas são semelhantes, sendo as mais relevantes a etapa da lise celular, a etapa em que ocorre ligação a um suporte sólido que pode ser de sílica, a etapa das lavagens sucessivas ou de purificação e finalmente a etapa de eluição. Todas estas etapas têm sido preferencialmente realizadas com a ajuda de *bio-robots* comerciais (ex. Auto Mate ExpressTM, Applied Biosystems) e respetivos *kits* de extração, eliminando deste modo possíveis contaminações nesta fase (de extração), devidas às diferentes fases operacionais que envolvem a intervenção humana. Sugere-se, portanto, utilizar esta metodologia em amostras mais complexas, incluindo amostras em diferentes suportes, como tecidos, objetos, etc (Toole *et al.*, 2019).

O passo seguinte ao do isolamento do DNA, a partir de qualquer amostra biológica, é o da PCR, técnica que se baseia na amplificação enzimática *in vitro* de um fragmento de DNA de interesse (*target*), flanqueado por 2 *primers* que hibridam com as extremidades 3' da cadeia dupla. Deste modo, ciclos repetidos, que consistem em três fases, irão originar, em cada ciclo, a duplicação da sequência inicial correspondendo a um crescimento exponencial da referida sequência. Assim, após cerca de 30 ciclos, o DNA em estudo, delimitado pelos *primers* cuja sequência de bases foi previamente selecionada, estará amplificado cerca de 1 milhão de vezes (Toole *et al.*, 2019).

O uso da técnica de PCR requer que, pelo menos, seja conhecida a sequência de DNA que rodeia a região de interesse para ser possível a construção dos *primers* usados na amplificação, neste caso, na elaboração de um protocolo com intuito de prever as CEVs de um indivíduo, seria mais indicado recorrer à tipagem de SNPs pelas razões citadas em capítulos anteriores (Stangegaard, Froslev, Frank-Hansen, Hansen, & Morling, 2011).

Após a extração de DNA, como protocolo alternativo à PCR convencional, e dependendo dos equipamentos disponíveis nos diferentes laboratórios forenses, poder-se-ia recorrer a uma PCR quantitativa em tempo real (real-time quantitative PCR – RT qPCR), A RT qPCR é uma técnica que combina a metodologia da PCR convencional com um mecanismo de deteção e quantificação por fluorescência, permitindo que os processos de amplificação, deteção e quantificação de DNA sejam realizados numa única etapa, agilizando a obtenção de resultados e diminuindo o risco de contaminação da amostra (Zhao *et al.*, 2006), característica de muita importância no caso de se utilizarem

amostras forenses, como já foi referido. Esta metodologia, comparada à PCR convencional, é mais sensível, específica e rápida, apresentando resultados ao fim de 2 a 3 horas e sendo desnecessário o recurso à eletroforese, uma vez que a adição de sondas fluorescentes às reações de PCR permite a monitorização da amplificação do DNA-alvo em tempo real. Além disso, por meio da monitorização em tempo real da taxa de aumento da fluorescência durante a reação, é possível determinar com precisão a quantidade de DNA-alvo presente na amostra original (Jung *et al.*, 2018).

No caso de se optar pela utilização da PCR convencional, é necessário recorrer à eletroforese, de modo a conseguir detetar o DNA amplificado e proceder de seguida à avaliação dos resultados obtidos, estando os laboratórios forenses portugueses preparados para realizar tal etapa.

A utilização de sequenciadores automáticos como tecnologia associada à PCR é comum, sendo usados em todas as perícias realizadas nos laboratórios de genética forense tanto na análise de *loci STR*, como em estudos de sequenciação, como acontece no caso de ser necessária a análise do mtDNA. Estes permitem que a informação eletroforética fique armazenada à medida que decorre a migração, graças à utilização de um *software* apropriado, sendo os alelos detetados por laser uma vez que os *primers* usados são marcados com fluorescência. Outra vantagem da sua utilização reside na migração paralela de vários padrões externos (*sizers* externos) e padrões internos (*sizers* internos) adicionados a todas as amostras a estudar, e que são reconhecidos pelo *software*, de modo a construírem curvas de calibração, eliminando as diferenças de mobilidades eletroforéticas que possam existir. Deste modo, é possível eliminar automaticamente as variações da mobilidade eletroforética, as quais podiam conduzir a uma tipagem errada dos alelos (Christiansen *et al.*, 2019). Com um sequenciador também é possível a tipagem simultânea de vários sistemas, pelo que é necessária uma quantidade inferior de DNA molde, o que constitui uma grande vantagem na resolução de casos com interesse forense em que se dispõe de pequenos vestígios com quantidades exíguas de DNA (Shuai *et al.*, 2014).

Os sequenciadores utilizados nos laboratórios de Genética e Biologia Forenses recorrem à eletroforese capilar. A eletroforese capilar, entre outras vantagens, é uma metodologia que possibilita uma elevada sensibilidade de deteção, característica de grande interesse, especialmente quando a quantidade de produto amplificado é exígua. Este facto revela-se de especial interesse quando se possui mistura de amostras provenientes de mais de um indivíduo, pois o tamanho dos picos obtidos indica o material celular existente de cada indivíduo, como por exemplo, nos casos de violação (Christiansen *et al.*, 2019).

Tal como recomendado num dos estudos de Dario *et al.* (2015) e noutros artigos científicos portugueses, nomeadamente no estudo de Pontes & Pinheiro, já anteriormente referidos, propõe-se que as amostras sejam analisadas através da técnica da minisequenciação e extensão de uma base única (em inglês, *Single Base Extension – SBE*) usando o sistema SNaPshot™ (*Applied Biosystems*), possível de realizar nos laboratórios de Genética Forense portugueses. Esta metodologia baseia-se na alta precisão da incorporação de nucleótidos pela DNA polimerase, sendo esta etapa finalizada com a análise dos alelos detetados através do uso do *software GeneMapper ID 3.2.1* (Dario *et al.*, 2015).

6.2.1. SNPs escolhidos

Qualquer que seja a metodologia a usar, os SNPs relacionados com a cor dos olhos a escolher poderiam resultar dos resultados reportados por Dario *et al.* e seleccionaríamos 4 dos 6 SNPs do sistema *IrisPlex*: rs12913832 (HERC2), rs1800407 (OCA2), rs12896399 (SLC24A4), rs16891982 (SLC45A2) uma vez que foram os únicos que obtiveram resultados aceitáveis, de modo a tornar a técnica escolhida financeiramente exequível, com o mínimo de desperdícios laboratoriais.

Para a simultânea previsão da cor de cabelo e cor de olhos, como referido anteriormente neste estudo, Walsh *et al.* (2013) seleccionaram SNPs dos genes MC1R, SLC45A2, EXOC2, KITLG, IRF4, TYR, SLC24A4, HERC2, ASIP e TYRP1 para complementarem os SNPs presentes no sistema *IrisPlex*. Na ausência de estudos que discutam quais os melhores marcadores genéticos para a previsão da cor de cabelo da população portuguesa, e sendo ainda necessária uma avaliação e validação práticas em laboratórios nacionais, seleccionaria todos os SNPs presentes no sistema *HirisPlex*, totalizando 24 SNPs, salvaguardando que, após a revisão de diversos artigos, alguns dos seus genes apresentam melhores resultados do que outros:

- O gene MC1R, como já referido, está amplamente relacionado com a cor de cabelo ruiva, nomeadamente os SNP rs1805007 e rs1805008;
- O gene SLC45A2 apresenta o SNP rs28777 para a previsão da cor de cabelo preta e o SNP rs16891982 muito útil porque simultaneamente pode ser usado para a previsão da cor de olhos, cor de pele e cor de cabelo;
- O gene EXOC2 apresenta o SNP rs4959270 preditivo para a cor de cabelo preta;

- O gene SLC24A4 teria também uma elevada aplicabilidade na previsão da cor dos olhos (SNP rs12896399) e da cor de cabelo loira (SNP rs2402130), existindo outros SNPs presentes neste gene, cuja importância no contexto da fenotipagem está estabelecida, mas que não foram adicionados ao sistema *HirisPlex*;

- O gene HERC2 que, como referido anteriormente, é considerado o gene mais importante no âmbito da fenotipagem, apresenta SNPs para a previsão da cor dos olhos e que, simultaneamente, estão envolvidos na previsão da cor de cabelo ruiva (rs12913832);

- O gene ASIP que apresenta SNPs para a previsão das diferentes tonalidades de cabelos ruivos (rs2378249 e rs1015362).

Um argumento para a introdução completa de todos os SNPs presentes no sistema *HirisPlex* para a previsão simultânea da cor de olhos e cor de cabelo (incluindo os 2 SNPs desnecessários para a exclusiva previsão da cor de olhos) tem a ver com a utilização do software associado a este sistema, ou seja, a ausência do SNP presente no gene HERC2 (rs12913832) não permite ao *software* prever a cor dos olhos, a ausência dos 11 SNPs presentes no gene MC1R não permite a previsão da cor de cabelo, e a ausência dos SNPs presentes nos genes HERC2, SLC45A2 e IRF4 (um dos genes sem resultados satisfatórios) não permite a previsão simultânea da cor de olhos e cabelo (Walsh *et al.*, 2013). Deste modo, poderiam ser excluídos SNPs para a utilização do sistema *IrisPlex* para a previsão da cor de olhos em indivíduos Europeus, mas para a previsão simultânea da cor de olhos e cor de cabelo seria necessário recorrer a todos os SNPs presentes no sistema *HirisPlex* de modo a este funcionar corretamente.

Finalmente, após a tipagem dos SNPs, seria necessário aceder ao *website* do sistema *HirisPlex* (<https://hirisplex.erasmusmc.nl/>) para introduzir o número de alelos minor (0, 1 ou 2) de cada uma das variantes de DNA utilizadas, como demonstra a Figura 3 (Walsh *et al.*, 2013).

The HirisPlex System



Gene	SNP	Allele	No. of Alleles
1 MC1R	rs312262906	A	0 1 2 NA
2 MC1R	rs11547464	A	0 1 2 NA
3 MC1R	rs885479	T	0 1 2 NA
4 MC1R	rs1805008	T	0 1 2 NA
5 MC1R	rs1805005	T	0 1 2 NA
6 MC1R	rs1805006	A	0 1 2 NA
7 MC1R	rs1805007	T	0 1 2 NA
8 TUBB3	rs1805009	C	0 1 2 NA
9 MC1R	rs201326893	A	0 1 2 NA
10 MC1R	rs2228479	A	0 1 2 NA
11 MC1R	rs1110400	C	0 1 2 NA
12 SLC45A2	rs28777	C	0 1 2 NA
13 SLC45A2	rs16891982	C	0 1 2 NA
14 KITLG	rs12821256	G	0 1 2 NA
15 LOC105374875	rs4959270	A	0 1 2 NA
16 IRF4	rs12203592	T	0 1 2 NA
17 TYR	rs1042602	T	0 1 2 NA
18 OCA2	rs1800407	A	0 1 2 NA
19 SLC24A4	rs2402130	G	0 1 2 NA
20 HERC2	rs12913832	T	0 1 2 NA
21 PIGU	rs2378249	C	0 1 2 NA
22 LOC105370627	rs12896399	T	0 1 2 NA
23 TYR	rs1393350	T	0 1 2 NA
24 TYRP1	rs683	G	0 1 2 NA

Figura 3: Website do sistema HirisPlex. **0** – 0 alelos *minor*; **1** – 1 alelo *minor* (heterozigotia); **2** – 2 alelos *minor* (homozigotia); **NA** – Não aplicado. **Adaptado de:** <https://hirisplex.erasmusmc.nl/>

Após a introdução da informação solicitada pelo sistema, três valores de probabilidade (Tabela 3) serão gerados: um para a cor de cabelo (preto, castanho, ruivo e loiro), um segundo para a tonalidade escura ou clara dessa mesma cor, e ainda um terceiro valor para a cor de olhos (castanho, azul ou intermédio) permitindo, assim, prever as CEVs do indivíduo cuja identidade se encontra em estudo. Deste modo, seria possível inferir que cor de olhos e de cabelo com que tonalidade clara ou escura, provavelmente apresentaria o indivíduo dador de determinada amostra, conforme fica demonstrado com o exemplo na Tabela 3 (Walsh *et al.*, 2013).

Tabela 3: Resultado de uma previsão de CEV através do *website* do sistema HirisPlex.

Predicted phenotype		
	p-value	AUC Loss
blue eye	0.424	0.012
intermediate eye	0.255	0.033
brown eye	0.321	0.008
blond hair	0	0.059
brown hair	0	0.061
red hair	1	0.064
black hair	0	0.014
light hair	1	0.031
dark hair	0	0.031

Legenda: *Blue eye* – olhos de cor azul; *intermediate eye* – olhos de cor intermédia (esverdeados); *Brown eyes* – olhos de cor castanha; *Blond hair* – cabelo loiro; *Brown hair* – cabelo castanho; *Red hair* – cabelo ruivo; *Black hair* – cabelo preto; *Light hair* – cabelo com tonalidade clara; *Dark hair* – cabelo cm tonalidade escura. **Adaptado de:** <https://hirisplex.erasmusmc.nl/>

7. Conclusões

As CEVs de um indivíduo permitem a sua identificação visual, caso seja necessário reconhecer um suspeito de crime, bem como identificar um cadáver esqueletizado ou restos mortais recolhidos de locais de desastre de massa. Contudo, na impossibilidade de existirem testemunhas oculares, ou na presença de um cadáver cujas CEVs são irreconhecíveis, a obtenção de uma amostra de DNA do indivíduo que se quer identificar poderá auxiliar a investigação com informações, até há bem pouco tempo, inalcançáveis por outros meios forenses. Deste modo, a tipagem de SNPs presentes em genes relacionados com CEVs permite inferir a provável aparência de um indivíduo, nomeadamente a sua cor de olhos, cor de cabelo, cor de pele, entre outras (Bulbul & Filoglu, 2018)

Até aos dias de hoje, os estudos relevantes para previsão destas características incidiram essencialmente na previsão da cor de pele, olhos e cabelo, sendo as últimas duas características as que apresentam um sistema internacionalmente validado para a população Europeia, o *HirisPlex* (Walsh *et al.*, 2014).

Com este estudo e relativamente ao primeiro objetivo, após a revisão bibliográfica, pôde-se concluir que tanto o sistema *IrisPlex*, como o sistema *HirisPlex*, apresentam resultados bastante satisfatórios para indivíduos Europeus à exceção de “ SNPs que apresentam podendo ser aplicado em qualquer laboratório forense, como demonstrado por diversos estudos mundiais. Contudo, tendo estes sistemas como população alvo os Europeus, e os marcadores genéticos direcionados para as CEVs que estas populações maioritariamente expressam, quando aplicados a indivíduos cujo *background* genético apresente biodiversidade ancestral poderão apresentar algumas limitações, nomeadamente para a previsão de cor de pele, e para a cor de olhos verdes (ou intermédios).

Portugal, tendo sido um país colonizador, estando próximo ao continente Africano, e ainda sendo considerado um dos países mais importantes nas rotas de comércio mundiais, permitiu aos seus cidadãos desenvolver relações com populações de diferentes países intercontinentais ao longo dos séculos, tornando a sua população num *mix* genético no que se refere à ancestralidade. Como tal, concluiu-se que o sistema *IrisPlex* pode ser aplicado, à população portuguesa e à maioria dos seus imigrantes, para a previsão da cor de olhos de cidadãos portugueses e imigrantes Africanos residentes em Portugal, (Dario *et al.*, 2017). Dada a inexistência de estudos nacionais publicados relacionados com a aplicabilidade do sistema *HirisPlex* na população portuguesa e nos seus imigrantes, após a revisão bibliográfica, entendemos que tal sistema poderia tal

como se demonstrou com o *IrisPlex*, apresentar resultados satisfatórios para a previsão da cor de cabelo de todas as populações residentes em Portugal. Esta previsão seria possível porque os genes constituintes do sistema *HirisPlex* apresenta SNPs com elevado poder preditivo para todas as tonalidades de cor de cabelo. Por outro lado, na inexistência de estudos satisfatórios para a fenotipagem de outras CEVs, nomeadamente da cor da pele, por exemplo, admitimos que sejam necessários bastantes mais estudos e um conjunto de amostras com bastante mais diversidade, representativas de diferentes países e continentes, de modo a ser possível aferir com elevada probabilidade a expressão de uma certa cor de pele, uma vez que a quantidade e diversidade de tons de pele são bastante mais numerosas e complexas que os possíveis resultados para previsão da cor de olhos e cabelo (Walsh *et al.*, 2014).

Quanto ao segundo objetivo, ou seja, o objetivo de sugerir um protocolo para a replicação do sistema *HirisPlex*, e na inviabilidade de testar procedimentos laboratoriais no decorrer da escrita desta tese, uma revisão bibliográfica de diversos estudos, em que o sistema foi aplicado, demonstrou que o trabalho executado por Dario *et al.* (2017) complementado com o protocolo proposto pelos criadores do sistema *HirisPlex* (Walsh *et al.*), seria o melhor protocolo a ser executado no âmbito da investigação forense nacional.

Quanto ao terceiro e último objetivo, o objetivo de realizar uma reflexão sobre algumas questões éticas relacionadas com o tema da fenotipagem forense, uma vez que Portugal não possui legislação específica que regule o uso deste tipo de metodologia e/ou marcadores alternativos, concluiu-se que a maioria dos países apresenta referências à tipagem de DNA na sua legislação, contudo essas leis restringem essa análise forense na obtenção de perfis genéticos e na comparação destes com perfis armazenados numa base de dados de DNA forense (Toom *et al.*, 2016).

Por outro lado, alguns países, como o Reino Unido e a Holanda já reformularam as suas leis permitindo a utilização da fenotipagem molecular para fins forenses, sendo esta explicitamente decretada na sua legislação. (Slabbert & Heathfield, 2018).

Quanto a Portugal, Austrália e África do Sul, a FDP não apresenta qualquer menção na legislação, e segundo um estudo português conduzido em 2013 relativamente à existência de uma base de dados nacional onde estariam armazenadas informações genéticas de todos os indivíduos residentes no país e que poderia ser acedida de modo a facilitar perícias forenses, apenas 46.5% dos inquiridos consentia sobre disponibilizar as suas informações genéticas (M'Charek, 2008). Tais resultados demonstram uma falta de conhecimento e esclarecimento acerca da mais valia das informações que a fenotipagem forense poderia facultar às autoridades policiais, de modo a contribuir para aumentar a segurança no país através da diminuição da quantidade de casos forenses inconclusivos por défice de identificação dos autor(es) do(s) crime(s) e/ou da(s) sua(s) vítima(s).

Assim sendo, torna-se importante abrir o debate público acerca da necessidade de recorrer a marcadores genéticos preditivos para as CEVs de um indivíduo, de modo a auxiliar as perícias forenses, e consequentemente debater as implicações éticas que daí advêm. A aplicação da FDP na investigação criminal, e da possível inclusão da informação que daí advém nas bases de dados genéticos nacionais pode colocar em causa princípios éticos como a liberdade, a privacidade e a igualdade, caso não sejam devidamente acautelados, tendo também em consideração que deve ser promovido o esclarecimento de toda a população, com ligações ou não às questões forenses.

Por fim, embora a FDP seja uma metodologia que necessite de esclarecimento e aceitação pública, é importante realçar as suas vastas vantagens e o seu valor social uma vez que, pode melhorar a informação que é possível obter a partir da análise do material genético em processos forenses, contribuindo para diminuir o universo de potenciais suspeitos através da exclusão positiva de indivíduos, permitindo assim economizar tempo e recursos financeiros durante uma investigação criminal. Permite ainda atribuir uma identidade a vítimas desconhecidas (desaparecidos ou vítimas de desastres de massa), e a restos humanos que não possibilitam o seu reconhecimento na fase de autópsia forense (Slabbert & Heathfield, 2018).

Deste modo, numa altura em que o mundo vive uma pandemia, e num mês (Outubro de 2020) em que Portugal pondera aplicar a obrigatoriedade de todos os cidadãos nacionais obterem uma aplicação de telemóvel com partilha de dados pessoais de saúde entre si, seria necessário debater se esta decisão de partilha de dados apresenta menos implicações, nomeadamente de privacidade e igualdade, em relação ao que representaria a partilha de dados genéticos relativos à cor de olhos e de cabelo de um indivíduo, características que são externamente visíveis e de exposição livre.

Em suma, o sistema *IrisPlex*, e principalmente o *HIrisPlex*, demonstram ser uma mais-valia nos exames complementares da genética forense por todo o mundo. Pelos estudos já efetuados, preve-se que seriam úteis também em Portugal, não sendo ainda uma metodologia aplicada no país devido a barreiras legislativas e desconhecimento público. Como tal, dependendo da amostra em estudo e do laboratório onde esta análise seria conduzida, deveria ser ajustado um protocolo que permitisse estudar FDP de modo a inferir corretamente a possibilidade de um indivíduo expressar uma certa CEV, com a maior probabilidade possível, coadjuvando deste modo a investigação criminal possibilitando uma previsão mais aproximada da aparência do indivíduo cuja identidade se pretende reconhecer.

Como objetivos futuros, gostaríamos que a FDP fosse uma metodologia mais estudada e testada na população portuguesa, e nos seus imigrantes, e que após os resultados satisfatórios esperados, fosse devidamente debatida e esclarecida de modo a

que a sua aplicação pudesse ser legislada, permitindo assim ser replicada por todos os laboratórios forenses nacionais e, deste modo, auxiliar a investigação criminal.

8. Referências bibliográficas

- Allwood, J. S., & Harbison, S. (2013). SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. *Forensic Sci Int Genet*, 7(4), 444-452. doi:10.1016/j.fsigen.2013.03.005
- Amigo, J., Phillips, C., Lareu, M., & Carracedo, A. (2008). The SNPforID browser: an online tool for query and display of frequency data from the SNPforID project. *Int J Legal Med*, 122(5), 435-440. doi:10.1007/s00414-008-0233-7
- Amorim, A. (2013). Genética Forense. *Enfermagem Forense*, 1-19.
- Amorim, A., & Pereira, L. (2005). Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. *Forensic Sci Int*, 150(1), 17-21. doi:10.1016/j.forsciint.2004.06.018
- Andersen, J. D., Johansen, P., Harder, S., Christoffersen, S. R., Delgado, M. C., Henriksen, S. T., . . . Morling, N. (2013). Genetic analyses of the human eye colours using a novel objective method for eye colour classification. *Forensic Sci Int Genet*, 7(5), 508-515. doi:10.1016/j.fsigen.2013.05.003
- Biesecker, L. G., Bailey-Wilson, J. E., Ballantyne, J., Baum, H., Bieber, F. R., Brenner, C., . . . Walsh, A. (2005). Epidemiology. DNA identifications after the 9/11 World Trade Center attack. *Science*, 310(5751), 1122-1123. doi:10.1126/science.1116608
- Binstock, M., Hafeez, F., Metchnikoff, C., & Arron, S. T. (2014). Single-nucleotide polymorphisms in pigment genes and nonmelanoma skin cancer predisposition: a systematic review. *Br J Dermatol*, 171(4), 713-721. doi:10.1111/bjd.13283
- Branicki, W., Brudnik, U., Kupiec, T., Wolanska-Nowak, P., & Wojas-Pelc, A. (2007). Determination of phenotype associated SNPs in the MC1R gene. *J Forensic Sci*, 52(2), 349-354. doi:10.1111/j.1556-4029.2006.00361.x
- Branicki, W., Liu, F., van Duijn, K., Draus-Barini, J., Pospiech, E., Walsh, S., . . . Kayser, M. (2011). Model-based prediction of human hair color using DNA variants. *Hum Genet*, 129(4), 443-454. doi:10.1007/s00439-010-0939-8
- Brilliant, M. H. (2001). The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Res*, 14(2), 86-93. doi:10.1034/j.1600-0749.2001.140203.x
- Brookes, A. J. (1999). The essence of SNPs. *Gene*, 234(2), 177-186. doi:10.1016/s0378-1119(99)00219-x
- Budowle, B., & van Daal, A. (2008). Forensically relevant SNP classes. *Biotechniques*, 44(5), 603-608, 610. doi:10.2144/000112806
- Bulbul, O., & Filoglu, G. (2018). Development of a SNP panel for predicting biogeographical ancestry and phenotype using massively parallel sequencing. *Electrophoresis*, 39(21), 2743-2751. doi:10.1002/elps.201800243
- Bulbul, O., Filoglu, G., Zorlu, T., Altuncul, H., Freire-Aradas, A., Sochtig, J., . . . Schneider, P. M. (2016). Inference of biogeographical ancestry across central regions of Eurasia. *Int J Legal Med*, 130(1), 73-79. doi:10.1007/s00414-015-1246-7
- Butler, J. M. (2007). Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques*, 43(4), ii-v. doi:10.2144/000112582
- Butler, J. M., Coble, M. D., & Vallone, P. M. (2007). STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing. *Forensic Sci Med Pathol*, 3(3), 200-205. doi:10.1007/s12024-007-0018-1
- Candille, S. I., Absher, D. M., Beleza, S., Bauchet, M., McEvoy, B., Garrison, N. A., . . . Shriver, M. D. (2012). Genome-wide association studies of quantitatively measured skin, hair, and eye pigmentation in four European populations. *PLoS One*, 7(10), e48294. doi:10.1371/journal.pone.0048294

- Chaitanya, L., Breslin, K., Zuniga, S., Wirken, L., Pospiech, E., Kukla-Bartoszek, M., . . . Walsh, S. (2018). The HIrisPlex-S system for eye, hair and skin colour prediction from DNA: Introduction and forensic developmental validation. *Forensic Sci Int Genet*, *35*, 123-135. doi:10.1016/j.fsigen.2018.04.004
- Chaitanya, L., Walsh, S., Andersen, J. D., Ansell, R., Ballantyne, K., Ballard, D., . . . Kayser, M. (2014). Collaborative EDNAP exercise on the IrisPlex system for DNA-based prediction of human eye colour. *Forensic Sci Int Genet*, *11*, 241-251. doi:10.1016/j.fsigen.2014.04.006
- Cho, M. K., & Sankar, P. (2004). Forensic genetics and ethical, legal and social implications beyond the clinic. *Nat Genet*, *36*(11 Suppl), S8-12. doi:10.1038/ng1594
- Christiansen, S. L., Jakobsen, B., Borsting, C., Udengaard, H., Buchard, A., Kampmann, M. L., . . . Morling, N. (2019). Non-invasive prenatal paternity testing using a standard forensic genetic massively parallel sequencing assay for amplification of human identification SNPs. *Int J Legal Med*, *133*(5), 1361-1368. doi:10.1007/s00414-019-02106-0
- CNECV. (2007). Parecer sobre o Regime Jurídico da Base de Dados de Perfis de ADN. Retrieved from <https://www.cneqv.pt/pareceres.php?search=base%20de%20dados&o=DESC>
- Corte-Real, F., Vieira, D. N., & Pinheiro, M. F. (2015). Criminalística biológica. In *Princípios de Genética Forense* (pp. 44): Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Dario, P., Mourino, H., Oliveira, A. R., Lucas, I., Ribeiro, T., Porto, M. J., . . . Corte Real, F. (2015). Assessment of IrisPlex-based multiplex for eye and skin color prediction with application to a Portuguese population. *Int J Legal Med*, *129*(6), 1191-1200. doi:10.1007/s00414-015-1248-5
- Dario, P., Oliveira, A. R., Ribeiro, T., Porto, M. J., Dias, D., & Corte Real, F. (2017). Autosomal SNPs study of a population sample from Southern Portugal and from a sample of immigrants from Guinea-Bissau residing in Portugal. *Leg Med (Tokyo)*, *24*, 32-35. doi:10.1016/j.legalmed.2016.11.004
- Dembinski, G. M., & Picard, C. J. (2014). Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population. *Forensic Sci Int Genet*, *9*, 111-117. doi:10.1016/j.fsigen.2013.12.003
- Draus-Barini, J., Walsh, S., Pospiech, E., Kupiec, T., Glab, H., Branicki, W., & Kayser, M. (2013). Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investig Genet*, *4*(1), 3. doi:10.1186/2041-2223-4-3
- Duffy, D. L., Montgomery, G. W., Chen, W., Zhao, Z. Z., Le, L., James, M. R., . . . Sturm, R. A. (2007). A three-single-nucleotide polymorphism haplotype in intron 1 of OCA2 explains most human eye-color variation. *Am J Hum Genet*, *80*(2), 241-252. doi:10.1086/510885
- Edgar, H. J. (2007). Microevolution of African American dental morphology. *Am J Phys Anthropol*, *132*(4), 535-544. doi:10.1002/ajpa.20550
- Eiberg, H., Troelsen, J., Nielsen, M., Mikkelsen, A., Mengel-From, J., Kjaer, K. W., & Hansen, L. (2008). Blue eye color in humans may be caused by a perfectly associated founder mutation in a regulatory element located within the HERC2 gene inhibiting OCA2 expression. *Hum Genet*, *123*(2), 177-187. doi:10.1007/s00439-007-0460-x
- Flanagan, N., Healy, E., Ray, A., Philips, S., Todd, C., Jackson, I. J., . . . Rees, J. L. (2000). Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. *Hum Mol Genet*, *9*(17), 2531-2537. doi:10.1093/hmg/9.17.2531
- Freire-Aradas, A., Ruiz, Y., Phillips, C., Maronas, O., Sochtig, J., Tato, A. G., . . . Lareu, M. V. (2014). Exploring iris colour prediction and ancestry inference in admixed populations of South America. *Forensic Sci Int Genet*, *13*, 3-9. doi:10.1016/j.fsigen.2014.06.007
- Frudakis, T. (2008). The legitimacy of genetic ancestry tests. *Science*, *319*(5866), 1039-1040; author reply 1039-1040. doi:10.1126/science.319.5866.1039b
- Fujimura, J. H., & Rajagopalan, R. (2011). Different differences: the use of 'genetic ancestry' versus race in biomedical human genetic research. *Soc Stud Sci*, *41*(1), 5-30. doi:10.1177/0306312710379170

- Gonzalez-Tapia, M. I., & Obsuth, I. (2015). "Bad genes" & criminal responsibility. *Int J Law Psychiatry*, 39, 60-71. doi:10.1016/j.ijlp.2015.01.022
- Granja, R., & Machado, H. (2020). Forensic DNA phenotyping and its politics of legitimation and contestation: Views of forensic geneticists in Europe. *Soc Stud Sci*, 306312720945033. doi:10.1177/0306312720945033
- Grimes, E. A., Noake, P. J., Dixon, L., & Urquhart, A. (2001). Sequence polymorphism in the human melanocortin 1 receptor gene as an indicator of the red hair phenotype. *Forensic Sci Int*, 122(2-3), 124-129. doi:10.1016/s0379-0738(01)00480-7
- Han, J., Kraft, P., Nan, H., Guo, Q., Chen, C., Qureshi, A., . . . Hunter, D. J. (2008). A genome-wide association study identifies novel alleles associated with hair color and skin pigmentation. *PLoS Genet*, 4(5), e1000074. doi:10.1371/journal.pgen.1000074
- Hart, K. L., Kimura, S. L., Mushailov, V., Budimlija, Z. M., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2013). Improved eye- and skin-color prediction based on 8 SNPs. *Croat Med J*, 54(3), 248-256. doi:10.3325/cmj.2013.54.248
- Investigação Criminal. (2017). *Secretaria-Geral do Ministério da Justiça*
- Retrieved from <https://justica.gov.pt/Justica-Criminal/Investigacao-Criminal>
- J.Purps, M. G., M.Nagy, L.Roewer. (2011). Evaluation of the IrisPlex eye colour prediction tool in a German population sample. In Elsevier (Ed.), *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* (Vol. 3, pp. 202, 203).
- Jung, J. Y., Yoon, H. K., An, S., Lee, J. W., Ahn, E. R., Kim, Y. J., . . . Lim, S. K. (2018). Rapid oral bacteria detection based on real-time PCR for the forensic identification of saliva. *Sci Rep*, 8(1), 10852. doi:10.1038/s41598-018-29264-2
- Kayser, M. (2015). Forensic DNA Phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci Int Genet*, 18, 33-48. doi:10.1016/j.fsigen.2015.02.003
- Kayser, M., Liu, F., Janssens, A. C., Rivadeneira, F., Lao, O., van Duijn, K., . . . van Duijn, C. M. (2008). Three genome-wide association studies and a linkage analysis identify HERC2 as a human iris color gene. *Am J Hum Genet*, 82(2), 411-423. doi:10.1016/j.ajhg.2007.10.003
- Kayser, M., & Schneider, P. M. (2009). DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet*, 3(3), 154-161. doi:10.1016/j.fsigen.2009.01.012
- Kidd, K. K., Kidd, J. R., Speed, W. C., Fang, R., Furtado, M. R., Hyland, F. C., & Pakstis, A. J. (2012). Expanding data and resources for forensic use of SNPs in individual identification. *Forensic Sci Int Genet*, 6(5), 646-652. doi:10.1016/j.fsigen.2012.02.012
- King, T. E., Fortes, G. G., Balaesque, P., Thomas, M. G., Balding, D., Maisano Delsler, P., . . . Schurer, K. (2014). Identification of the remains of King Richard III. *Nat Commun*, 5, 5631. doi:10.1038/ncomms6631
- Kowalczyk, M., Zawadzka, E., Szewczuk, D., Gryzinska, M., & Jakubczak, A. (2018). Molecular markers used in forensic genetics. *Med Sci Law*, 58(4), 201-209. doi:10.1177/0025802418803852
- Lamason, R. L., Mohideen, M. A., Mest, J. R., Wong, A. C., Norton, H. L., Aros, M. C., . . . Cheng, K. C. (2005). SLC24A5, a putative cation exchanger, affects pigmentation in zebrafish and humans. *Science*, 310(5755), 1782-1786. doi:10.1126/science.1116238
- Lei n.º 5/2008, Base de dados de perfis de ADN - Identificação civil e criminal, Diário da República I Série-A n.º 30 pp. 962-8 C.F.R. § 30 (12 de Fevereiro de 2008).
- Lei n.º 12/2005, Informação genética pessoal e informação de saúde, Diário da República I Série-A nº 18 pp. 606 C.F.R. (26 de Janeiro de 2005).
- Lei n.º 12654/12, Lei de Execução Penal para prever a coleta de perfil genético como forma de identificação criminal, Diário da República Federativa do Brasil C.F.R. (28 de maio de 2012).

- Liu, F., van Duijn, K., Vingerling, J. R., Hofman, A., Uitterlinden, A. G., Janssens, A. C., & Kayser, M. (2009). Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr Biol*, *19*(5), R192-193. doi:10.1016/j.cub.2009.01.027
- Lurdes Pontes, M., & Pinheiro, M. F. (2014). Autosomal SNPs study of a population sample from north of Portugal and a sample of immigrants from the Eastern Europe living in Portugal. *Leg Med (Tokyo)*, *16*(2), 118-120. doi:10.1016/j.legalmed.2013.12.002
- M'Charek, A. (2008). Silent witness, articulate collective: DNA evidence and the inference of visible traits. *Bioethics*, *22*(9), 519-528. doi:10.1111/j.1467-8519.2008.00699.x
- Machado, A. (2019). *Marcadores genéticos e determinação da cor dos olhos*. (Mestrado), Intituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto.
- Machado, H., & Silva, S. (2014). Would you accept having your DNA profile inserted in the National Forensic DNA database? Why? Results of a questionnaire applied in Portugal. *Forensic Sci. Int. Genet*, *132*-136.
- Mandey, S. H., Schneiders, M. S., Koster, J., & Waterham, H. R. (2006). Mutational spectrum and genotype-phenotype correlations in mevalonate kinase deficiency. *Hum Mutat*, *27*(8), 796-802. doi:10.1002/humu.20361
- Maronas, O., Phillips, C., Sochtig, J., Gomez-Tato, A., Cruz, R., Alvarez-Dios, J., . . . Lareu, M. V. (2014). Development of a forensic skin colour predictive test. *Forensic Sci Int Genet*, *13*, 34-44. doi:10.1016/j.fsigen.2014.06.017
- Martinez-Cadenas, C., Pena-Chilet, M., Ibarrola-Villava, M., & Ribas, G. (2013). Gender is a major factor explaining discrepancies in eye colour prediction based on HERC2/OCA2 genotype and the IrisPlex model. *Forensic Sci Int Genet*, *7*(4), 453-460. doi:10.1016/j.fsigen.2013.03.007
- Mengel-From, J., Borsting, C., Sanchez, J. J., Eiberg, H., & Morling, N. (2010). Human eye colour and HERC2, OCA2 and MATP. *Forensic Sci Int Genet*, *4*(5), 323-328. doi:10.1016/j.fsigen.2009.12.004
- Mushailov, V., Rodriguez, S. A., Budimlija, Z. M., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2015). Assay Development and Validation of an 8-SNP Multiplex Test to Predict Eye and Skin Coloration. *J Forensic Sci*, *60*(4), 990-1000. doi:10.1111/1556-4029.12758
- Pietroni, C., Andersen, J. D., Johansen, P., Andersen, M. M., Harder, S., Paulsen, R., . . . Morling, N. (2014). The effect of gender on eye colour variation in European populations and an evaluation of the IrisPlex prediction model. *Forensic Sci Int Genet*, *11*, 1-6. doi:10.1016/j.fsigen.2014.02.002
- Pinheiro, M. d. F. T. (2010). *Genética Forense - Perspectivas da Identificação Genética*: Edições Univ. Fernando Pessoa.
- Plaza, S., Calafell, F., Helal, A., Bouzerna, N., Lefranc, G., Bertranpetit, J., & Comas, D. (2003). Joining the pillars of Hercules: mtDNA sequences show multidirectional gene flow in the western Mediterranean. *Ann Hum Genet*, *67*(Pt 4), 312-328. doi:10.1046/j.1469-1809.2003.00039.x
- Pneuman, A., Budimlija, Z. M., Caragine, T., Prinz, M., & Wurmbach, E. (2012). Verification of eye and skin color predictors in various populations. *Leg Med (Tokyo)*, *14*(2), 78-83. doi:10.1016/j.legalmed.2011.12.005
- Pulker, H., Lareu, M. V., Phillips, C., & Carracedo, A. (2007). Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. *Forensic Sci Int Genet*, *1*(2), 100-104. doi:10.1016/j.fsigen.2007.02.009
- Rees, J. L. (2000). The melanocortin 1 receptor (MC1R): more than just red hair. *Pigment Cell Res*, *13*(3), 135-140. doi:10.1034/j.1600-0749.2000.130303.x
- Rees, J. L. (2003). Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet*, *37*, 67-90. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143233

- Ruiz, Y., Phillips, C., Gomez-Tato, A., Alvarez-Dios, J., Casares de Cal, M., Cruz, R., . . . Lareu, M. V. (2013). Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Sci Int Genet*, 7(1), 28-40. doi:10.1016/j.fsigen.2012.05.009
- Santos, A. M. (2015). *A importância dos marcadores fenotípicos em genética forense - O sistema Irisplex*. (Mestrado Integrado em Medicina), Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,
- Schellekens, B.-J. K. M. (2008). Forensic DNA Phenotyping: Regulatory Issues. *Science and Technology Law Review*, 9, 158-202.
- Schmidt, N., Schucker, K., Krause, I., Dork, T., Klintschar, M., & Hummel, S. (2020). Genome-wide SNP typing of ancient DNA: Determination of hair and eye color of Bronze Age humans from their skeletal remains. *Am J Phys Anthropol*, 172(1), 99-109. doi:10.1002/ajpa.23996
- Scott, R., & Skellern, C. (2010). DNA evidence in jury trials: the "CSI effect". *J Law Med*, 18(2), 239-262.
- Shuai, L., Wang, J., Jing, Q., Xu, B., Su, Q., Li, Y. J., & Li, H. (2014). [1483 cases of paternity test with STR loci mutation]. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 30(1), 44-46.
- Simeonov, D. R., Wang, X., Wang, C., Sergeev, Y., Dolinska, M., Bower, M., . . . Adams, D. R. (2013). DNA variations in oculocutaneous albinism: an updated mutation list and current outstanding issues in molecular diagnostics. *Hum Mutat*, 34(6), 827-835. doi:10.1002/humu.22315
- Simon, N., Shallat, J., Williams Wietzikoski, C., & Harrington, W. E. (2020). Optimization of Chelex 100 resin-based extraction of genomic DNA from dried blood spots. *Biol Methods Protoc*, 5(1), bpaa009. doi:10.1093/biomethods/bpaa009
- Slabbert, N., & Heathfield, L. J. (2018). Ethical, legal and social implications of forensic molecular phenotyping in South Africa. *Dev World Bioeth*, 18(2), 171-181. doi:10.1111/dewb.12194
- Soejima, M., & Koda, Y. (2007). Population differences of two coding SNPs in pigmentation-related genes SLC24A5 and SLC45A2. *Int J Legal Med*, 121(1), 36-39. doi:10.1007/s00414-006-0112-z
- Spichenok, O., Budimlija, Z. M., Mitchell, A. A., Jenny, A., Kovacevic, L., Marjanovic, D., . . . Wurmbach, E. (2011). Prediction of eye and skin color in diverse populations using seven SNPs. *Forensic Sci Int Genet*, 5(5), 472-478. doi:10.1016/j.fsigen.2010.10.005
- Stangegaard, M., Froslev, T. G., Frank-Hansen, R., Hansen, A. J., & Morling, N. (2011). Automated extraction of DNA from blood and PCR setup using a Tecan Freedom EVO liquid handler for forensic genetic STR typing of reference samples. *J Lab Autom*, 16(2), 134-140. doi:10.1016/j.jala.2010.11.003
- Sturm, R. A. (2009). Molecular genetics of human pigmentation diversity. *Hum Mol Genet*, 18(R1), R9-17. doi:10.1093/hmg/ddp003
- Sturm, R. A., Duffy, D. L., Zhao, Z. Z., Leite, F. P., Stark, M. S., Hayward, N. K., . . . Montgomery, G. W. (2008). A single SNP in an evolutionary conserved region within intron 86 of the HERC2 gene determines human blue-brown eye color. *Am J Hum Genet*, 82(2), 424-431. doi:10.1016/j.ajhg.2007.11.005
- Sturm, R. A., & Frudakis, T. N. (2004). Eye colour: portals into pigmentation genes and ancestry. *Trends Genet*, 20(8), 327-332. doi:10.1016/j.tig.2004.06.010
- Sulem, P., Gudbjartsson, D. F., Stacey, S. N., Helgason, A., Rafnar, T., Magnusson, K. P., . . . Stefansson, K. (2007). Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat Genet*, 39(12), 1443-1452. doi:10.1038/ng.2007.13
- Toole, K., Roffey, P., Young, E., Cho, K., Shaw, T., Smith, M., & Blagojevic, N. (2019). Evaluation of commercial forensic DNA extraction kits for decontamination and extraction of DNA from biological samples contaminated with radionuclides. *Forensic Sci Int*, 302, 109867. doi:10.1016/j.forsciint.2019.06.025
- Toom, V., Wienroth, M., M'Charek, A., Prainsack, B., Williams, R., Duster, T., . . . Murphy, E. (2016). Approaching ethical, legal and social issues of emerging forensic DNA phenotyping (FDP) technologies comprehensively: Reply to 'Forensic DNA phenotyping: Predicting

- human appearance from crime scene material for investigative purposes' by Manfred Kayser. *Forensic Sci Int Genet*, 22, e1-e4. doi:10.1016/j.fsigen.2016.01.010
- Valenzuela, R. K., Henderson, M. S., Walsh, M. H., Garrison, N. A., Kelch, J. T., Cohen-Barak, O., . . . Brilliant, M. H. (2010). Predicting phenotype from genotype: normal pigmentation. *J Forensic Sci*, 55(2), 315-322. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01317.x
- Valle-Silva, G. D., Souza, F. D. N., Marcorin, L., Pereira, A. L. E., Carratto, T. M. T., Debortoli, G., . . . Mendes-Junior, C. T. (2019). Applicability of the SNPforID 52-plex panel for human identification and ancestry evaluation in a Brazilian population sample by next-generation sequencing. *Forensic Sci Int Genet*, 40, 201-209. doi:10.1016/j.fsigen.2019.03.003
- Visser, M., Kayser, M., & Palstra, R. J. (2012). HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter. *Genome Res*, 22(3), 446-455. doi:10.1101/gr.128652.111
- Walsh, S., Chaitanya, L., Clarisse, L., Wirken, L., Draus-Barini, J., Kovatsi, L., . . . Kayser, M. (2014). Developmental validation of the HirisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Sci Int Genet*, 9, 150-161. doi:10.1016/j.fsigen.2013.12.006
- Walsh, S., Lindenbergh, A., Zuniga, S. B., Sijen, T., de Knijff, P., Kayser, M., & Ballantyne, K. N. (2011). Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Sci Int Genet*, 5(5), 464-471. doi:10.1016/j.fsigen.2010.09.008
- Walsh, S., Liu, F., Ballantyne, K. N., van Oven, M., Lao, O., & Kayser, M. (2011). IrisPlex: a sensitive DNA tool for accurate prediction of blue and brown eye colour in the absence of ancestry information. *Forensic Sci Int Genet*, 5(3), 170-180. doi:10.1016/j.fsigen.2010.02.004
- Walsh, S., Liu, F., Wollstein, A., Kovatsi, L., Ralf, A., Kosiniak-Kamysz, A., . . . Kayser, M. (2013). The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci Int Genet*, 7(1), 98-115. doi:10.1016/j.fsigen.2012.07.005
- Walsh, S., Wollstein, A., Liu, F., Chakravarthy, U., Rahu, M., Seland, J. H., . . . Kayser, M. (2012). DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Sci Int Genet*, 6(3), 330-340. doi:10.1016/j.fsigen.2011.07.009
- Whittall, H. (2008). The forensic use of DNA: Scientific success story, ethical minefield. *Biotechnol J*, 3(3), 303-305. doi:10.1002/biot.200800018
- Yun, L., Gu, Y., Rajeevan, H., & Kidd, K. K. (2014). Application of six IrisPlex SNPs and comparison of two eye color prediction systems in diverse Eurasia populations. *Int J Legal Med*, 128(3), 447-453. doi:10.1007/s00414-013-0953-1
- Zhao, D., Zhu, B. L., Ishikawa, T., Quan, L., Li, D. R., & Maeda, H. (2006). Real-time RT-PCR quantitative assays and postmortem degradation profiles of erythropoietin, vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 alpha mRNA transcripts in forensic autopsy materials. *Leg Med (Tokyo)*, 8(2), 132-136. doi:10.1016/j.legalmed.2005.09.001
- Zieger, M., & Utz, S. (2015). About DNA databasing and investigative genetic analysis of externally visible characteristics: A public survey. *Forensic Sci Int Genet*, 17, 163-172. doi:10.1016/j.fsigen.2015.05.010