

A IMPORTÂNCIA DOS MARCADORES FENOTÍPICOS EM GENÉTICA FORENSE - O SISTEMA IRISPLEX

Ana Catarina de Gouveia e Melo Santos

Mestrado Integrado em Medicina

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Quinta do Bosque, lote 128, 7º esquerdo, 3510-010 Viseu

catarinagms@hotmail.com

Trabalho realizado sob a orientação de:

Professor Doutor Francisco Corte-Real Gonçalves

Professor associado com agregação

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	4
Resumo	5
Palavras-chave	6
Abstract	6
Key words	7
Introdução	8
Metodologia	10
Fenotipagem forense do ADN	11
Marcadores fenotípicos	14
A cor dos olhos	15
O sistema IRISPLEX	17
Implicações éticas	23
Desafios futuros	29
Conclusão	31
Agradecimentos	33
Bibliografia	34

Lista de abreviaturas

ADN – ácido desoxirribonucleico

AUC – area under the curve (área sob a curva)

CNECV – Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida

EDNAP – European DNA Profiling Group

GWA(S) – genome wide association (study) (estudo de associação do genoma completo)

SNP – single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo único)

STRs – short tandem repeats (curtas sequências nucleotídicas repetitivas)

Resumo

Nos últimos anos, a Genética Forense tem-se desenvolvido com o intuito de fornecer mais e melhores ferramentas que possam permitir a resolução de casos que permanecem suspensos por falta de meios para a investigação prosseguir. Uma dessas ferramentas é a fenotipagem do ADN que nos últimos 10 anos tem sido alvo de inúmeros estudos. A fenotipagem do ADN revela-se particularmente importante quando não se encontra uma correspondência positiva entre o material genético da amostra e um perfil quer da base de dados de perfis genéticos quer de determinado suspeito, após a análise dos marcadores não codificantes. Dentro da fenotipagem do ADN, destaca-se o sistema IrisPlex que através da análise de seis SNPs pertencentes a seis diferentes genes permite com elevado grau de precisão afirmar se a cor dos olhos do indivíduo ao qual a amostra biológica pertence é azul, castanha ou de cor intermédia.

Através da revisão de alguns artigos, elaborou-se este trabalho que tem como principal objetivo perceber o impacto que o uso dos marcadores fenotípicos tem na genética forense, nomeadamente o estudo da cor dos olhos através do sistema IrisPlex.

O IrisPlex tem sido testado e validado em diversos países e populações, concluindo-se que constitui um sistema robusto, fiável, credível, de fácil aplicação e pronto para ser usado no quotidiano das ciências forenses.

Muitos países como é o caso de Portugal, contrariamente à Holanda, ainda não possuem legislação que regule o uso destes marcadores codificantes. Pelo risco de a fenotipagem do ADN pôr em causa princípios éticos como a igualdade e a privacidade e de poder levar a qualquer forma de discriminação, torna-se importante a reflexão e a discussão do tema.

Apesar das implicações éticas e de todo o debate que ainda é preciso existir com o intuito de legislar esta prática, a fenotipagem do ADN permite dar um novo fôlego às

investigações, sendo uma técnica em crescente desenvolvimento, apresentando-se como um novo meio de abordagem nas ciências forenses.

Palavras-chave

Genética forense, IrisPlex, SNPs, Cor do olho, Fenotipagem forense do ADN, Ética, Características visíveis externas.

Abstract

In recent years, forensic genetics has developed with the goal to provide more and better tools that would allow the resolution of cases which remain suspended for lack of means to continue the investigation. One such tool is the DNA phenotyping that has been the subject of numerous studies over the last 10 years. DNA phenotyping is particularly important when there is not a positive match between the genetic material of the sample and a profile in the DNA database or a particular suspect, after analysis of non-coding markers. Within the DNA phenotyping, there is the IrisPlex system. It analyses six SNPs from six different genes in order to say whether the individual's eye color to which the biological sample belongs is blue, brown or intermediate color, with a high degree of accuracy.

Through the revision of some articles was drawn up this work that aims to realize the impact that the use of phenotypic markers has in forensic genetics, including the study of eye color through IrisPlex system.

The IrisPlex system has been tried and tested in various countries and populations, from where we can conclude that IrisPlex is robust, reliable, credible, easy to apply and ready for use in everyday forensic sciences.

Many countries such as Portugal, unlike the Netherlands, do not have legislation regulating the use of these coding markers. The risk of DNA phenotyping call into question

ethical principles such as equality and privacy and lead to any form of discrimination is an important topic for reflection and discussion.

Despite the ethical implications and the whole debate that still need to exist in order to legislate this practice, DNA phenotyping gives a new impetus to investigations, being in increasing development, presenting itself as a new way to approach forensic cases.

Key words

Forensic Genetics, IrisPlex, SNPs, Eye colour, Forensic DNA phenotyping, Ethics, Externally visible characteristics.

INTRODUÇÃO

Numa sociedade cada vez mais exigente na procura de respostas e soluções para o que ainda não consegue ser totalmente compreendido, são notáveis os avanços da Medicina em diversas áreas. A área da Genética não é exceção uma vez que se tem desenvolvido na tentativa de colmatar as falhas sentidas até então. Dentro da Genética destaca-se a Genética Forense, disciplina da Medicina Legal e Ciências Forenses, que tem assistido a uma rápida e importante evolução, sendo uma área de bastante interesse académico por existirem constantes descobertas e avanços científicos e tecnológicos.

A fenotipagem do ADN é uma das muitas investigações a decorrer nesta área. A possibilidade de serem usados marcadores genéticos codificantes com o intuito de conseguir obter um perfil fenotípico de um indivíduo através de uma amostra biológica tem se demonstrado de interesse crescente. Esta matéria é inovadora, uma vez que atualmente, em Portugal, apenas são usados marcadores genéticos não codificantes (através da comparação de STRs) na resolução de casos forenses. Estes marcadores não codificantes são úteis para associar uma identidade a uma amostra biológica encontrada, só sendo esta associação possível se o perfil genético do indivíduo ao qual a amostra pertence estiver registado numa base de dados ou se houver um suspeito e se se puder proceder à comparação genética entre a amostra e o indivíduo.

Com a fenotipagem forense do ADN, a necessidade de existir um suspeito para comparação com a amostra deixa de ser uma limitação nas investigações policiais, dando novo fôlego aos casos onde não é encontrada correspondência genética entre a amostra e o suspeito ou entre a amostra e a base de dados existente.¹

Começa-se a falar de uma nova era da Genética Forense: a era do ADN inteligente,² em que o estudo dos marcadores fenotípicos como a cor dos olhos adquire real importância. Uma vez descobertos e estudados, estes marcadores permitem traçar um perfil físico do

indivíduo ao qual pertence à amostra biológica recolhida, sendo verdadeiras testemunhas biológicas, como se de testemunhas oculares se tratassem.³

Entre os vários marcadores fenotípicos existentes, a cor dos olhos é o mais estudado, sendo já utilizado através de *kits* e protocolos que proporcionam a sua aplicação. Dos vários *kits* desenvolvidos para estudar a cor dos olhos, faz-se referência ao IrisPlex, um sistema de genotipagem multiplex, validado para uso forense, tendo sido dos primeiros a surgir e a ser testado.⁴ Este *kit* permite a análise de seis SNPs codificantes da cor da íris, pertencentes a seis diferentes genes, possibilitando incluir o resultado obtido da análise de uma amostra de ADN de origem desconhecida numa de três categorias (íris castanha, azul ou cor intermédia) com elevado grau de precisão.⁵

A partir do Irisplex, outros *kits* com outros marcadores para outras características físicas, como por exemplo, para a cor, forma e implantação do cabelo, cor da pele, entre outras, começaram a ser desenvolvidos. Assim, o objetivo é produzir *kits* mais completos em que várias características fenotípicas são estudadas simultaneamente, permitindo traçar perfis mais informativos.^{2,4} Estes outros *kits*, métodos e marcadores fenotípicos não serão abordados neste trabalho.

Este artigo de revisão tem como principal objetivo analisar o impacto do estudo dos marcadores fenotípicos, nomeadamente a cor dos olhos através do sistema IrisPlex, na Genética Forense. Pretende-se analisar a utilidade destes marcadores nas investigações forenses, as implicações éticas que se colocam e os desafios futuros que surgem com esta nova realidade.

METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão com base nos artigos encontrados sobre o tema na revista da especialidade “Forensic Science International: Genetics” desde a edição de Março de 2007 até à edição de Setembro de 2015 e na literatura disponível na base de dados *PubMed* usando as palavras-chave: Irisplex, forensic genetics, eye color e DNA phenotyping.

FENOTIPAGEM DO ADN

Ao ser encontrada uma amostra biológica (sangue, saliva, sémen, fios de cabelo...) num local de um crime, esta é devidamente recolhida e armazenada com o intuito de ser analisada pela Genética Forense que pode ser a chave para a resolução de um caso. Atualmente, a Genética Forense consegue dizer com elevado grau de probabilidade se a amostra encontrada pertence ou não a um determinado suspeito através da análise dos STRs da amostra e do suspeito, comparando-os. Para além do suspeito, a amostra pode ser igualmente comparada com os indivíduos incluídos na base de dados nacional de perfis genéticos. Atualmente, este é o *gold standard* na identificação de indivíduos nas ciências forenses.⁶ Este método em conjunto com outros testes e análises, outras pistas recolhidas, e testemunhas ouvidas faz com que a maioria dos casos possa ter um desfecho.

Porém, nem todos os casos têm resolução fácil. O que acontece se não houver testemunhas oculares ou se estas forem contraditórias? O que acontece se todos os testes realizados e pistas recolhidas forem inconclusivos? E se não houver correspondência entre a amostra analisada e os suspeitos ou entre amostra e a base de dados? E se houver um grande número de suspeitos e as investigações ficarem sem rumo?

Podem não ser muitos os casos que ficam por resolver por não haver mais nenhuma pista, nenhuma testemunha para ouvir ou nenhum suspeito, mas são sem dúvida preocupantes. Quando o perfil genético do criminoso não se encontra na base de dados, quando não há suspeitos para proceder à comparação dos perfis genéticos ou quando estes já foram todos excluídos após essa comparação ou quando o ADN extraído das amostras biológicas está presente em baixa quantidade ou qualidade, a investigação pode ficar suspensa dando origem aos chamados *cold cases*.⁶

É nestas situações que a fenotipagem do ADN constitui uma nova esperança, dando um novo fôlego a investigações que ficaram por resolver.

Só se sente a necessidade em recorrer à fenotipagem do ADN, ou seja, a análise de marcadores fenotípicos presentes no ADN da amostra recolhida com o objetivo de chegar a determinadas características físicas chave do indivíduo ao qual a amostra pertence, quando o uso de marcadores não codificantes como os STRs se mostra impossível. Como já referido, o uso dos STRs pode ser inconclusivo se não houver nenhum suspeito com o qual se possa comparar o ADN da amostra ou se não houver correspondência com nenhum perfil da base de dados nacional uma vez que a maioria da população portuguesa não consta nesta base.

Diferentemente dos estudos de ligação genética em que os STRs são os polimorfismos mais usados para a identificação individual em Genética Forense devido à sua enorme variabilidade, a fenotipagem do ADN usa os SNPs. Os SNPs são polimorfismos muito mais estáveis, com menor taxa de mutações quando comparados com os STRs, sendo de fácil amplificação em sistemas multiplex.⁷ São estes os responsáveis pela maioria da variabilidade genética interindividual e os estudos GWA desenvolvidos têm como objetivo encontrar cada vez mais e melhores SNPs associados a características fenotípicas para uma fenotipagem do ADN mais correta e completa.

Naturalmente que a fenotipagem do ADN não pode ser usada para proceder a uma acusação formal direta de nenhum indivíduo, não sendo por isso usada como prova em tribunal. No entanto, constitui um passo intermédio para se chegar a um suspeito ou um grupo de suspeitos que serão posteriormente submetidos à comparação do ADN através dos STRs e só através desse método podem ser acusados se se chegar a uma correspondência positiva.

Para além dos aspetos já referidos, a fenotipagem do ADN também pode ser considerada relevante para limitar o número de suspeitos, se estes forem em grande quantidade, ajudando a orientar as investigações policiais. Esta técnica pode ser igualmente importante para confirmar a veracidade de testemunhas oculares se estas forem de

credibilidade duvidosa ou se houver testemunhos contraditórios no que respeita à constituição física do indivíduo descrito.

Claro que é possível que um criminoso altere as suas características físicas para não ser identificado (pintar e mudar o aspeto do cabelo, usar lentes de contacto de cor diferente ou em último caso recorrer a cirurgias plásticas), mas este facto por ser pouco provável e de difícil execução não se apresenta como uma grande limitação à fenotipagem do ADN.⁶

Não é só em cenários de crime em que surge a necessidade de encontrar o responsável que a análise dos marcadores fenotípicos pode ser útil. A fenotipagem do ADN pode revelar-se necessária em casos de pessoas desaparecidas ou desastres de massa em que são encontradas partes corporais (ossos, ...) ou corpos em avançado estado de decomposição em que não são visíveis as características externas que permitam identificar a vítima. Nestes casos, estes marcadores podem ajudar a chegar à identidade do indivíduo em causa na ausência de familiares diretos ou amostras prévias com material genético com que se possa proceder à comparação.

É ainda referido na literatura o possível interesse da fenotipagem do ADN em estudos de carácter histórico através da análise de SNPs em restos de esqueletos. O objetivo pode passar por conhecer as características físicas de determinadas figuras históricas das quais há registos ou retratos contraditórios ou saber mais sobre a aparência dos antepassados da espécie humana.⁸

Como se percebe são inúmeras as aplicações da fenotipagem do ADN que fazem desta técnica uma nova área de interesse e investigação na Genética Forense. Apesar de a fenotipagem do ADN ter começado a ser estudada no início dos anos 2000 ainda é um procedimento com aplicação pouco difundida.

MARCADORES FENOTÍPICOS

Como já se referiu, a descoberta e a investigação de mais e melhores marcadores fenotípicos constitui uma nova e desafiante matéria na Genética Forense pela possibilidade de permitirem a fenotipagem do ADN que se revela muito útil em várias circunstâncias.

A investigação tem-se dirigido para a descoberta dos marcadores fenotípicos ideais que serão aqueles a que correspondem um genótipo pouco complexo, fácil de ser estudado, que estejam presentes desde a nascença ou que tenham elevada probabilidade de se manifestar (>75%), de serem minimamente influenciados por fatores externos e que sejam os mais discriminativos possíveis.⁹

Não será fácil chegar aos SNPs que melhor traduzem as características físicas de um indivíduo. O problema reside no facto de a maioria dos componentes de um fenótipo resultar de uma complexidade de genes que interagem entre si, tendo uns um papel mais relevante do que outros. Para além de que muitas vezes o fenótipo pode não resultar estritamente da manifestação do genótipo, pois existem fatores externos ao genótipo que têm de ser tidos em conta.¹⁰

Avaliando os vários marcadores estudados e em investigação, até ao momento, os únicos com exatidão suficiente para poderem ser imediatamente aplicados nas investigações policiais são a cor dos olhos e do cabelo.¹¹ Para além dos referidos, existem muitos outros marcadores possíveis de serem usados num futuro próximo, uns mais promissores e interessantes como a cor da pele e outros ainda muito longe de estarem completamente compreendidos e estudados por serem mais complexos como a altura, a idade, o tipo de cabelo, entre outros.⁶ O objetivo será conseguir estudar melhor os SNPs de maneira a que se consiga compreender todos estes marcadores fenotípicos que idealmente permitirão traçar um verdadeiro retrato *robot* do indivíduo ao qual as amostras recolhidas pertencem.

A COR DOS OLHOS

Apesar de apresentar um padrão de hereditariedade bastante complexo, a coloração da íris foi dos primeiros marcadores fenotípicos a serem investigados e é atualmente dos mais desenvolvidos.

A cor da íris depende não só da quantidade e do tipo de distribuição de melanócitos presentes no estroma e da quantidade de melanina que contêm, mas também da espessura e densidade da própria íris. Todos estes fatores dão origem a uma enorme paleta de tonalidades, desde as mais escuras com mais melanina (olhos castanhos) até às mais claras que resultam do pouco pigmento existente (olhos azuis), passando por todas as cores intermédias (olhos verdes). Apesar de existir uma variada gama de cores possíveis para a íris, verificou-se que esta provinha 98% do genótipo, sendo uma característica pouco dependente de fatores externos. Assim e apesar de toda a subjetividade inerente na avaliação da cor dos olhos por observadores externos, este é um bom marcador a incluir na fenotipagem do ADN.^{5,12,13}

Atualmente, após vários estudos, são bem conhecidos os genes implicados na cor da íris e são percebidos os processos subjacentes que levam ao fenótipo final.¹⁴ Este foi o conhecimento que esteve na base dos estudos posteriores que tiveram como objetivo a procura dos melhores SNPs para incluir nos testes de fenotipagem do ADN.

Após vários estudos de GWA que tiveram início em 2007, foi em 2009 que se encontraram os SNPs, ao todo 37, que melhor traduzem a cor dos olhos. Através de ensaios realizados na população europeia, Liu et al.¹⁵ demonstrou que é possível usar este marcador na fenotipagem de ADN apesar de ser um fenótipo complexo. Devido a essa complexidade, os resultados dos testes teriam de ser agrupados em três categorias: olhos castanhos, azuis e de cor intermédia (todas as cores não azuis, nem castanhas). Foram selecionados seis dos 37 SNPs pertencentes a seis dos oito genes estudados e foram obtidos os valores de relação entre a sensibilidade e a especificidade mais elevados até ao momento: AUC de 0.91, 0.73 e 0.93

para as categorias azul, intermédio e castanho respetivamente. Esta foi a investigação que impulsionou todas as outras que levaram à produção dos *kits* de fenotipagem do ADN para a cor dos olhos, entre eles o IrisPlex.

O SISTEMA IRISPLEX

Após os estudos de Liu et al.,¹⁵ foi desenvolvido por Walsh et al.² um sistema multiplex que usa seis SNPs anteriormente considerados como o número mínimo de SNPs necessários para a fenotipagem da cor dos olhos para chegar com elevado grau de probabilidade a um fenótipo correto. Assim, surgiu o Irisplex, um sistema de genotipagem multiplex baseado no fenótipo e genótipo de 3804 indivíduos holandeses, que prediz se o indivíduo à qual pertence a amostra biológica tem olhos azuis, castanhos ou de cor intermédia. Esta previsão assenta na análise dos SNPs: rs12913832 do gene *HERC2*, rs1800407 do gene *OCA2*, rs12896399 do gene *SLC4A4*, rs16891982 do gene *SLC45A2*, rs1393350 do gene *TYR* e o SNP rs12203592 do gene *IRF4*, considerados os SNPs mais informativos relativamente à cor dos olhos, sendo os genes *HERC2* e *OCA2* os que mais contribuem para este fenótipo.²

Após a aplicação do sistema Irisplex ao ADN extraído de uma amostra biológica, são gerados três valores de probabilidade de a amostra pertencer a uma das três categorias já mencionadas: cor da íris azul, castanha ou intermédia. Estes valores são gerados através de uma fórmula proposta por Liu et al.¹⁵ e usada por Walsh et al.² tendo em conta a presença ou não na amostra de cada um dos seis SNPs acima referidos. A categoria que tiver a probabilidade mais elevada é a assumida como a cor da íris do indivíduo ao qual a amostra pertence.² Porém, para um resultado ser conclusivo, não basta existir uma categoria com o valor de probabilidade mais elevado, esse valor tem de representar uma probabilidade igual ou superior a um determinado valor *cut-off*. Tendo em conta o número de amostras que se obtinham com o resultado acima dos vários valores que se testaram, a quantidade de resultados corretos e incorretos obtidos com os vários valores, chegou-se à conclusão que o valor *cut-off* mais aceitável para a interpretação dos resultados do IrisPlex é de 0.7. Isto significa que para o teste ter uma resposta satisfatória, o valor da categoria mais elevada tem

de ser no mínimo 70%, valor que minimiza os possíveis erros e maximiza o potencial de análise do sistema Irisplex.^{16,17} Concluindo, uma amostra dir-se-á pertencente a um indivíduo de olhos castanhos se o resultado do Irisplex atribuir um valor de pelo menos 70% de probabilidade para a categoria olhos castanhos e os restantes 30 ou menos % distribuídos pelas restantes categorias (azul e intermédio), prefazendo um total de 100%. Porém, este limiar é proposto e não imposto, o que quer dizer que cada laboratório, ao usar o Irisplex pode definir o valor de *cut-off* que lhe pareça mais ajustado consoante o caso.^{5,16}

Desde que foi produzido, o *design* do IrisPlex sofreu algumas alterações com o objetivo de conseguir analisar o ADN mesmo este estando presente em baixas concentrações (30pg), não alterando a precisão do teste (superior a 94% para as categorias cor azul e castanha).^{3,18} Esta constitui uma grande vantagem deste sistema multiplex, pois muitas vezes, a baixa quantidade e qualidade do ADN encontrado impossibilita a análise por STRs.

Outra vantagem do IrisPlex é a sua comprovada especificidade para a espécie humana, tendo sido encontrado o perfil de SNPs codificantes da cor dos olhos mais parecido em chimpazés. No entanto, a especificidade encontrada é suficiente para permitir que o IrisPlex possa ser usado nas investigações forenses.³

Um dos aspetos importantes para a aplicação do sistema IrisPlex consistia em saber se este podia ser usado por todos os laboratórios forenses e se os resultados seriam consistentes entre laboratórios. Em 2013, o grupo EDNAP desenvolveu um estudo de validação do IrisPlex com a colaboração de 21 laboratórios (18 europeus, dois australianos e um americano) com o objetivo de verificar se o sistema era implementável em laboratórios com diferentes níveis de experiência na fenotipagem do ADN. 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. Demonstrou, assim, ser um sistema robusto e de fácil

aplicação que pode ser usado em qualquer laboratório, estando pronto para ser usado no quotidiano das investigações forenses.^{3,6, 18}

Para além deste estudo em grande escala, outros estudos foram sendo realizados, tendo sido testada a aplicabilidade do *kit* a diversas populações.

Um dos estudos foi realizado na população alemã, em que a validade do IrisPlex foi testada em 102 indivíduos. Usando o valor de *cut-off* recomendado, chegaram-se a resultados bastantes plausíveis com a certeza de que este é um método bastante robusto e sensível.¹⁹

Na Nova Zelândia, o IrisPlex foi comparado com outro sistema multiplex (AEC) que usava 19 SNPs. O estudo refere que o AEC, aplicado na população neo-zelandesa, apresenta uma taxa de erro superior (26%) à do IrisPlex, aplicado na população europeia (6.1%).²⁰

O IrisPlex foi igualmente aplicado a 105 indivíduos da Eslovénia, onde se aferiram valores bastante elevados de especificidade e sensibilidade, à excepção da categoria olhos castanhos cuja sensibilidade chegou aos 58.1%, sendo 0% para a categoria de cor intermédia.²¹

Inicialmente, todos os estudos foram elaborados em populações de origem europeia e tornou-se imperativo saber se podiam ser aplicados a populações com outras etnias e com perfis genéticos que resultassem de várias combinações étnicas, situação muito comum nos dias de hoje.^{22,23}

Um dos primeiros estudos usou o IrisPlex numa amostra de 64 indivíduos de origem mista: europeia e asiática. Apesar de apenas 50 dos 64 resultados ter satisfeito a condição de haver uma categoria com mais de 70% de probabilidade, houve uma precisão de 94%. Verificou-se que o grau de precisão diminuía nos indivíduos que pertenciam a uma geração que resultasse de um maior número de cruzamentos entre etnias nas gerações prévias. No entanto, o IrisPlex conseguiu identificar corretamente todos os casos nas categorias azuis e castanhas, apesar de nenhuma amostra da categoria intermédia ter sido classificada

corretamente. Este estudo conclui que embora seja possível aplicar este sistema de fenotipagem a indivíduos com origem genética mista, há sempre mais dificuldades quando comparados com os estudos anteriores realizados em indivíduos com apenas uma origem genética.²²

Em 2013 o IrisPlex foi testado numa amostra de 200 perfis considerados bem representativos de toda a população dos Estados Unidos da América. Usando o *cut-off* de 0.7, 67% das previsões feitas foram corretas, 18% inconclusivas e 15% incorretas, sendo que nenhuma previsão correta correspondeu à categoria de cor intermédia. Por ser uma população com origem em grandes misturas étnicas, o estudo concluiu que o IrisPlex não é tão eficaz na população americana como é na europeia e que mais estudos seriam necessários para esclarecer esta questão.²⁴ Posteriormente, Yun et al. também concluíram que os 6 SNPs presentes no sistema IrisPlex poderão não ser os que melhor descrevem a cor dos olhos nas populações não europeias e que por isso se deve ter mais atenção na interpretação dos seus resultados quando aplicados em indivíduos não europeus e de diversas origens étnicas.²⁵

A principal limitação apontada pelos vários estudos, em relação à aplicação do Irisplex, está relacionada com a sensibilidade deste sistema para a categoria 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 claramente azuis nem 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%.¹⁶ Em amostras com maior número de indivíduos com olhos de cores não azuis e não castanhas, o IrisPlex apresenta taxas de erro superiores. Este facto faz com que haja a necessidade de estudar melhor a influência dos SNPs relacionados com esta categoria, aferindo se existirão mais genes para além dos estudados que possam ter influência para a determinação deste fenótipo.^{2,5,17-21,24}

Outro problema colocado relativamente à aplicação do IrisPlex é se o género (masculino e feminino) tem influência ou não na sensibilidade deste sistema em aferir a cor dos olhos. Em 2013, após dois estudos realizados na população espanhola, Martinez-Candenas et al.²⁶ concluíram que os indivíduos do sexo feminino têm tendência a ter olhos mais escuros (maior número de resultados na categoria cor castanha e intermédia) que os indivíduos do sexo masculino (maior número de resultados na categoria cor azul). Perante os resultados do estudo, suspeitou-se da existência de um fator relacionado com o género que pudesse contribuir para a diferença encontrada e pensou-se em ter em conta o género na fórmula do IrisPlex. Posteriormente, Pietroni et al.²⁷ testaram esta hipótese e decidiram avaliar se a mesma se podia colocar tendo como base a população italiana. Verificou que o género tinha uma influência de 4.9% na variação da saturação da cor da íris. Este valor mostrou-se muito superior ao encontrado nos países do norte da Europa como na Dinamarca e na Suécia (0.09%) onde o fenómeno também foi estudado.¹³ Após a análise de todos os estudos que avaliaram o impacto do género nos resultados obtidos com o IrisPlex, concluiu-se que o facto de termos conhecimento prévio do género do indivíduo em causa não melhora a sensibilidade do IrisPlex em nenhuma das categorias. Perante resultados tão diferentes em populações distintas, admite-se que a influência do género poderá ser um fenómeno população específico.²⁷ No entanto, mais estudos serão necessários realizar em diferentes países com amostras mais significativas com o intuito de estudar esta questão mais pormenorizadamente.

A partir da investigação levada a cabo em 2010 por Walsh et al.¹⁶ que tinha como amostra 3804 holandeses, estando presente uma grande variedade de fenótipos, surgiu o sistema Irisplex que foi posteriormente validado em variados indivíduos de diferentes populações e origens genéticas. Para além de não necessitar de qualquer tipo de informação prévia, seja a origem étnica ou o género do indivíduo, e de conseguir analisar ADN presente em baixa quantidade e qualidade, o IrisPlex representa o único método de fenotipagem,

disponível até ao momento, suficientemente sensível, confiável e robusto para ser aplicado rotineiramente nas investigações forenses.

IMPLICAÇÕES ÉTICAS DA FENOTIPAGEM DO ADN

Se os polimorfismos não codificantes de todos os cidadãos nacionais fizessem parte de uma base de dados nacional de perfis de ADN (e se Portugal fosse um país em que não pudessem entrar pessoas), não se colocaria a necessidade de explorar e usar os marcadores codificantes, uma vez que sempre que houvesse a necessidade de proceder à identificação genética do ADN de uma amostra recolhida, a comparação com essa mesma base de dados seria suficiente para ter um resultado. Em Portugal, segundo um estudo conduzido em 2013, dos 628 indivíduos inquiridos, apenas 46.5% estavam recetivos à ideia de terem a sua informação genética na base de dados nacional.²⁸ Paralelamente, um estudo semelhante foi realizado na Suíça e apenas 29.2% dos inquiridos concordavam com a existência de uma base de dados nacional com o perfil genético de todos os indivíduos residentes naquele país.²⁹

Em 2007, o CNECV emitiu um parecer que referia que: “A criação de uma base de dados alargada à população em geral, para fins de identificação civil, é de muito difícil justificação, dado o seu carácter excessivo, considerando a desproporção entre riscos e benefícios, incluindo os seus custos económicos.”³²

Assim sendo, nos próximos tempos, dificilmente se conseguirá elaborar uma base de perfis genéticos de todos os cidadãos nacionais. Este facto contribui para a necessidade de recorrer a marcadores codificantes e conseqüentemente ao debate das implicações éticas que daí advêm.

Com a chegada da nova era do ADN inteligente surgiram desde logo várias questões que colocam em causa princípios éticos como a liberdade, a privacidade e a igualdade.

Analisando o estudo já referido realizado na Suíça em 2014,²⁹ uma das perguntas do questionário prendia-se com a recetividade ao uso de marcadores fenotípicos como ajuda nas investigações forenses. Dos 284 inquiridos, 83.8% responderam que seriam recetivos a essas práticas. Das respostas positivas, a maioria refere que a aceitação do seu uso 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) eram os que justificavam o uso da fenotipagem do ADN. Dentro dos marcadores fenotípicos, dos apresentados aos inquiridos (cor dos olhos, cor do cabelo, cor da pele e origem étnica/geográfica), tiveram todos pelo menos 70% de aceitação, sendo que a origem geográfica foi o menos aceite. Analisando as justificações das escolhas dos inquiridos, refere-se o uso destes marcadores apenas se as taxas de erro forem baixas, mencionam-se preocupações relativamente aos custos elevados da técnica e a preocupação com a possível falta de cuidado na interpretação dos resultados que possa levar a juízos e conclusões erradas. As questões éticas relacionadas com o uso destes marcadores codificantes foram pouco mencionadas, contrariamente ao esperado.

Relativamente à fenotipagem do ADN, uma das questões mais debatidas relaciona-se com o direito à privacidade da informação codificada pelo material genético individual: até que ponto o desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de fenotipagem do ADN **constituem** uma violação da privacidade? Para muitos dos investigadores,^{9,30} esta questão pode não ter legitimidade para ser colocada uma vez que atualmente só se consegue obter informação sobre as características externas visíveis e, portanto, sendo informação visível por toda a gente, não é considerada informação privada. Outro argumento a favor de que esta técnica não constitui uma invasão da privacidade é que os resultados obtidos não pertencem a ninguém em concreto até se conseguir obter uma comparação positiva pelos polimorfismos não codificantes (STRs). A partir do momento é que é feita uma correlação positiva entre a amostra e um indivíduo, passando-se a ter conhecimento a quem pertencem as informações obtidas pela análise do ADN, essa informação passará a ser inútil. Assim sendo, não haverá nenhuma vantagem em ficar armazenada e portanto não se coloca a questão da proteção do armazenamento de dados obtidos pela fenotipagem do ADN.

Tendo tudo isto em conta, a questão impõe-se: qual a extensão de ADN codificante que é então permitida analisar para fins forenses?

A maioria dos países tem algum tipo de legislação no que concerne ao uso do ADN, mas limita-se a fazer referência apenas ao uso de marcadores não codificantes, não se manifestando acerca do uso de marcadores codificantes.⁹ O país mais atualizado em termos legislativos no que à fenotipagem do ADN diz respeito é a Holanda. A Holanda, em maio de 2003, a par dos avanços das ciências forenses, publicou uma lei que permitia o uso da fenotipagem do ADN de uma amostra recolhida num local do crime. No entanto, esta lei limita a fenotipagem a características como o sexo e a etnia deixando aberta a possibilidade de incluir outros marcadores, desde que sejam apenas relativos a características físicas que se tenha a certeza que são visíveis. Refere ainda que só devem ser pesquisadas na fenotipagem, características relevantes para a investigação. Desta maneira, é salvaguardado o direito à privacidade, uma vez que é proibida, por exemplo, a pesquisa de marcadores que sejam indicativos da propensão para certas doenças.^{6,9}

Tal como na Alemanha, em Portugal, unicamente é aferido o sexo do indivíduo ao qual pertence a amostra biológica encontrada, sendo esta a única informação de carácter fenotípico que é transmitida à autoridade judiciária. Por sua vez, três estados nos Estados Unidos da América (Indiana, Rhode Island e Wyoming) e a Bélgica têm legislação que restringe o uso do ADN nas análises forenses aos marcadores não codificantes e exclusivamente para identificação pessoal. Muitos outros países como Espanha, Austrália e África do Sul onde a prática se restringe ao uso de marcadores não codificantes não possuem legislação proibitiva ou permissiva ao uso de marcadores codificantes. Contrariamente, o Reino Unido que à semelhança dos países anteriores não possui legislação reguladora do uso dos marcadores codificantes, integra-os na sua prática quando necessário.^{6,9,31}

Para além de não serem pesquisadas características que não sejam visíveis, o risco de violação da privacidade pode ser igualmente controlado arranjando a melhor forma de transmitir a informação para a autoridade judiciária. O objetivo é transmitir exclusivamente os dados relevantes para a investigação, fazendo uma correta interpretação dos resultados, evitando o acesso da polícia e de outros membros da investigação para além da equipa laboratorial à informação genética do indivíduo.

Outra dificuldade que poderá surgir com o avanço dos estudos da fenotipagem do ADN será encontrar o equilíbrio entre a necessidade que existe em realizar mais investigações e apurar as técnicas do ADN codificante e a tendência que poderá haver no abuso deste tipo de polimorfismos, evitando que o conhecimento adquirido seja usado para fins menos éticos.

Um dos riscos do excessivo conhecimento e evolução da fenotipagem do ADN será o uso desta ferramenta para empresas e seguradoras poderem obter informações acerca do perfil genético dos seus futuros trabalhadores ou clientes, respetivamente, sob o perigo de discriminá-los. Por exemplo, seria com certeza uma tentação uma empresa de aviação saber se um dos futuros pilotos a contratar terá mais probabilidade de desenvolver um enfarte agudo do miocárdio que a população em geral, tendo por base a análise de marcadores que possam codificar essa propensão.

Como referido, é temido pela sociedade que as técnicas de fenotipagem evoluam de maneira a que não se fiquem apenas pelas características externas visíveis e passem a conseguir prever que certo indivíduo tenha mais tendência para ter certa doença com os riscos de discriminação que daí possam advir.

No entanto, a CNECV emitiu um parecer em 2007 no qual defende que: “Caso seja encontrada uma associação entre um marcador não codificante e uma doença ou um traço comportamental, esse marcador deverá ser retirado do painel; todos os dados que tenham sido obtidos anteriormente com esse marcador deverão ser eliminados.”³² A legislação portuguesa

também refere claramente que é proibida qualquer forma de discriminação em função do património genético. Mais precisamente, salienta que é proibida a realização de testes com o objetivo de selecionar os trabalhadores a contratar ou basear a escolha em resultados de testes genéticos já realizados. Refere ainda no que respeita às companhias de seguros que não podem utilizar qualquer tipo de informação genética ou pedir testes genéticos para recusar um seguro ou estabelecer prémios mais elevados.³³

O problema da discriminação não está apenas relacionado com marcadores genéticos associados à maior probabilidade de desenvolvimento de certas doenças, mas também com os marcadores associados a características visíveis externas. Não se imagina tanto a discriminação tendo como base a cor dos olhos, mas poderá ganhar importância a partir do momento em que se conseguir aferir a cor da pele ou a provável etnia do autor do crime. Imaginemos o caso de uma amostra encontrada num local de um crime revelar que o indivíduo procurado pela polícia é de etnia afroamericana. Se esta informação for divulgada numa localidade onde as pessoas da respetiva origem étnica constituem uma comunidade minoritária, esta pode ser alvo de discriminação por parte dos restantes habitantes da localidade. Esta situação não é de todo diferente quando comparada com casos em que a mesma informação é fornecida por testemunhas oculares e não pelo ADN, cuja fiabilidade é suportada por valores percentuais. Pelo contrário, é mais provável que um testemunho ocular possa ser distorcido por crenças que a testemunha possa ter em relação a certas minorias na comunidade onde reside. No entanto, há que ter em consideração que a fenotipagem do ADN não servirá só para afirmar as características físicas de um indivíduo, mas pelo contrário, através desta técnica poderão ser excluídas algumas características que por sua vez poderão excluir certas minorias da autoria de um crime e consequentemente evitar a sua discriminação.^{9,31}

Pessoalmente considero que a Holanda é um exemplo a seguir pelos restantes países principalmente se forem encontrados mais marcadores, melhores *kits* que se provem necessários às investigações. Considero também que nunca é demais informar a sociedade em geral do que é concretamente a fenotipagem do ADN, que informações se podem obter com esta técnica, quando pode ser aplicada e o que é que até agora é possível ou não saber através dos marcadores fenotípicos. Só através da massificação deste tipo de informação se estimula o debate e a discussão nestas matérias e se consegue legislar e controlar estas técnicas inovadoras, tão importantes na ciência forense dos dias de hoje.

DESAFIOS FUTUROS

Como se percebe, a fenotipagem do ADN ainda está a dar os primeiros passos como ferramenta de uso rotineiro nas investigações forenses, havendo ainda muito para desenvolver, investigar e debater.

Como já referido, uma das limitações do IrisPlex e de outros *kits* de fenotipagem para a cor dos olhos é a pouca sensibilidade para a categoria de cor intermédia. Espera-se que proximamente se comecem a explorar novos genes e SNPs codificantes para que seja percebida a codificação para esta gama de cores tão vasta e tão pouco precisa entre o azul e o castanho. Seria igualmente interessante melhorar o IrisPlex no que respeita à especificidade da informação dada, procurando que o resultado se expresse em cores mais concretas (olhos azuis claros, azuis escuros, verdes, castanhos claros,...). O que é facto é que estas três categorias, perante a quantidade de fenótipos existentes se tornam um pouco vagas e subjetivas para quem interpreta um resultado.⁶

Foi igualmente estudada a precisão do IrisPlex em populações com origens genéticas mistas, etnicamente falando, e como referido, embora seja possível a sua aplicação, mais estudos são esperados, com maiores amostras para perceber melhor esta questão. Espera-se que o sistema evolua no sentido de poder ser aplicado sem condicionantes a nível global, chegando-se a uma precisão tão elevada quanto a obtida em populações de origem genética exclusivamente europeia.^{22,24,25}

Como é admitido, embora em pequena escala, a cor dos olhos pode ser influenciada por alguns fatores externos ao genótipo. Quando se souber mais acerca destes marcadores fenotípicos e desta interação genótipo/ ambiente / fenótipo seria relevante estudar a influência de algumas patologias, de alguns fármacos ou mesmo da própria idade na cor dos olhos.¹⁹

Para uma fenotipagem mais completa e informativa, a partir do desenvolvimento do IrisPlex outros SNPs foram estudados. Atualmente já existe um sistema de fenotipagem do

ADN que junta num único *kit* os SNPs usados no IrisPlex com SNPs informativos da cor do cabelo, dando origem ao HIrisPlex.^{4,8,11} Este sistema permite saber simultaneamente a cor dos olhos e do cabelo mais prováveis para o indivíduo da amostra estudada, constituindo mais um avanço na genética forense. Tal como para a cor do cabelo, muitas outras investigações se esperam para que com um só kit se consiga obter o máximo de informação possível acerca do indivíduo ao qual a amostra pertence. Acredita-se que a Genética Forense se irá desenvolver no sentido de se chegar a um sistema que permita traçar um retrato *robot* bastante completo e informativo, tornando o ADN uma verdadeira testemunha biológica.

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, debater os mitos e preconceitos existentes, elaborando leis que deixem claro quais as fronteiras e limites éticos da fenotipagem do ADN e com que objetivos e em que circunstâncias é que esta se pode realizar.

CONCLUSÃO

Pela revisão e leitura dos diversos artigos que serviram de base a este trabalho, conclui-se que a fenotipagem do ADN é uma ferramenta em crescente desenvolvimento e interesse na área da Genética Forense. Esta mostra-se particularmente útil quando o uso dos marcadores não codificantes se torna inconclusiva ou impossível. É neste contexto que surge a oportunidade de dar continuidade às investigações através da implementação dos marcadores genéticos codificantes.

Tendo em conta todos os avanços até agora ocorridos, a característica mais estudada, apesar da sua complexidade, é a cor dos olhos, tendo sido desenvolvido um *kit* específico para o aplicar: o IrisPlex. Este *kit* consiste num sistema multiplex que através da análise de seis SNPs pertencentes a seis genes diferentes consegue prever com elevado grau de certeza a qual categoria pertence a cor dos olhos do indivíduo procurado: olhos azuis, de cor intermédia ou olhos castanhos. Após a sua avaliação e validação em vários países e populações, este sistema *multiplex* mostrou-se bastante robusto e sensível, apresentando resultados coerentes entre diferentes laboratórios com níveis de experiência na fenotipagem do ADN muito distintos. Apesar da necessidade de mais estudos para apurar a sua fiabilidade em populações com origens genéticas mistas e para melhorar a sua sensibilidade para identificar a cor intermédia, pode-se afirmar que o IrisPlex está pronto para a imediata aplicação nos laboratórios forenses a nível mundial.

Tal como a cor dos olhos, espera-se que as investigações prossigam para que outros marcadores fenotípicos possam ser usados e aplicados, permitindo uma fenotipagem mais completa.

No entanto, como referido no trabalho, a sua aplicação dependerá de uma validação ética por parte da sociedade que assume uma possível incompatibilidade desta nova era do ADN inteligente com os direitos de liberdade, privacidade e igualdade, podendo desencadear

atitudes discriminatórias perante minorias. Enquanto que países como a Holanda já possuem legislação específica para esta nova realidade científica, países como Portugal, Espanha, Austrália ainda não regularizaram o uso destes marcadores fenotípicos, não os usando na sua rotina forense.

Após uma análise crítica deste tema, consideramos a era do ADN inteligente uma era promissora que abrirá portas para um exponencial desenvolvimento da Genética Forense que tantos benefícios trará não só a nível de conhecimento biológico e científico como também a nível prático, dando uma nova esperança a todas as investigações que ficaram sem pernas para andar. Pessoalmente, penso que ainda há um longo caminho a percorrer, na perspetiva de que Portugal necessita de uma sociedade mais informada e esclarecida sobre o que é a fenotipagem do ADN, as vantagens que tem, os limites que serão necessários impor para que seja uma técnica eticamente correta. Só assim, se conseguirá que haja debate, evolução e consciencialização com o objetivo de ter uma legislação direcionada para o uso dos marcadores fenotípicos. Talvez num futuro próximo seja possível através de uma amostra biológica traçar um verdadeiro retrato *robot*.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Francisco Corte-Real Gonçalves, pela disponibilidade, orientação científica e interesse demonstrado ao longo de toda a elaboração do trabalho.

A toda a equipa do Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto Nacional de Medicina Legal pela acessibilidade, disponibilidade e simpatia demonstrada durante a minha visita aos seus laboratórios e pelo esclarecimento de todas as dúvidas por mim apresentadas.

BIBLIOGRAFIA

1. M. Kayser, P.M. Schneider. DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci. Int. Genet.* 3 (2009) 154-161.
2. S. Walsh, F. Liu, K.N. Ballantyne, M. van Oven, O. Lao, M. Kayser. 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 (2011) 170-180.
3. S. Walsh, A. Lindenbergh, S.B. Zuniga, T. Sijen, P. de Knijff, M. Kayser, K.N. Ballantyne. Developmental validation of the IrisPlex system: Determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. *Forensic Sci. Int. Genet.* 5 (2011) 464-471.
4. S. Walsh, F. Liu, A. Wollstein, L. Kovatsi, A. Ralf, A. Kosiniak-Kamysz, et al. The HirisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 98-115.
5. Y. Ruiz, C. Phillips, A. Gomez-Tato, J. Alvarez-Dios, M. Casares de Cal, R. Cruz, et al. Further development of forensic eye color predictive tests. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 28-40.
6. M. Kayser. Forensic DNA phenotyping: Predicting human appearance from crime scene material for investigative purposes. *Forensic Sci. Int. Genet.* (2015), doi:10.1016/j.fsigen.2015.02.003
7. K.K. Kidd, J.R. Kidd, W.C. Speed, R. Fang, M.R. Furtado, F.C.L. Hyland, A.J. Pakstis. Expanding data and resources for forensic use of SNPs in individual identification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 646-652.
8. J. Draus-Barini, S. Walsh, E. Pospiech, T. Kupiec, H. Glab, W. Branicki, M. Kayser. Bona fide colour: DNA prediction of human eye and hair colour from ancient and contemporary skeletal remains. *Investigative Genetics* (2013), 4:3.

9. B.J. Koops, H.M. Schellekens. Forensic DNA phenotyping: regulatory issues. *Columbia Sci. Technol. Law Rev.* 9 (2008) 158-202.
10. H. Pulker, M.V. Lareu, C. Phillips, A. Carracedo. Finding genes that underlie physical traits of forensic interest using genetic tools. *Forensic Sci. Int. Genet.* 1 (2007)100-104.
11. Developmental validation of the HIrisPlex system: DNA-based eye and hair colour prediction for forensic and anthropological usage. *Forensic Sci. Int. Genet.* 9 (2014) 150-161.
12. J. Mengel-From, C. Børsting, J.J. Sanchez, H. Eiberg, N. Morling. Human eye colour and *HERC2*, *OCA2* and *MATP*. *Forensic Sci. Int. Genet.* 4 (2010) 323-328.
13. J.D. Andersen, P. Johansen, S. Harder, S.R. Christoffersen, M.C. Delgado, S.T. Henriksen, et al. Genetic analyses of the human eye colours using a novel objective method for eye colour classification. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 508-515.
14. P. Sulem, D.F. Gudbjartsson, S. N. Stacey, A. Helgason, T. Rafnar, K.P. Magnusson, et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. *Nat. Genet.* 39 (2007) 1443-1452.
15. F. Liu, K. van Duijn, J.R. Vingerling, A. Hofman, A.G. Uitterlinden, A.C.J.W. Janssens, et al. Eye color and the prediction of complex phenotypes from genotypes. *Curr. Biol.* 19 (2009) R192-R193.
16. S. Walsh, A. Wollstein, F. Liu, U. Chakravarthy, M. Rahu, J.H. Seland, et al. DNA-based eye colour prediction across Europe with the IrisPlex system. *Forensic Sci. Int. Genet.* 6 (2012) 330-340.
17. A. Pneuman, Z.M. Budimlija, T. Caragine, M. Prinz, E. Wurmbach. Verification of eye and skin color predictors in various populations. *Legal Medicine* 14 (2012) 78-83.

18. L. Chaitanya, S. Walsh, J. Dyrberg, R. Ansell, K. Ballantyne, D. Ballard, et al. Collaborative EDNAP exercise on the IrisPlex system for DNA-based prediction of human eye colour. *Forensic Sci. Int. Genet.* 11 (2014) 418-251.
19. J. Purps, M. Geppert, M. Nagy, L. Roewer. Evaluation of the IrisPlex eye colour prediction tool in a German population sample. *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series 3* (2011) e202-e203.
20. J.S. Allwood, S. Harbison. SNP model development for the prediction of eye colour in New Zealand. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 444-452.
21. V. Kastelic, E. Pospiech, J. Draus-Barini, W. Branicki, K. Drobnic. Prediction of eye color in the Slovenian population using the IrisPlex SNPs. *Croat Med J.* (2013), 54:381-6, doi:10.3325/cmj.2013.54.381.
22. P.R. Prestes, R.J. Mitchell, R. Daniel, K.N. Ballantyne, R.A.H. van Oorschot. Evaluation of the IrisPlex system in admixed individuals. *Forensic Sci. Int. Genet. Supplement Series 3* (2011) e283-e284.
23. A. Freire-Aradas, Y. Ruiz, C. Phillips, O. Maroñas, J. Söchtig, A. G. Tato, et al. Exploring iris colour prediction and ancestry inference in admixed populations of South America. *Forensic Sci. Int. Genet.* 13 (2014) 3-9.
24. G.M. Dembinski, C.J. Picard. Evaluation of the IrisPlex DNA-based eye color prediction assay in a United States population. *Forensic Sci. Int. Genet.* 9 (2014) 111-117.
25. L. Yun, Y. Gu, H. Rajeevan, K.K. Kidd. Application of six IrisPlex SNPs and comparison of two eye color prediction systems in diverse Eurasia populations. *Int. J. Legal Med.* (2014) 128:447-453, doi: 10.1007/s00414-013-0953-1.
26. C. Martinez-Cadenas, M. Peña-Chilet, M. Ibarrola-Villava. Gender is a major factor explaining discrepancies in eye colour prediction based on *HERC2/OCA2* genotype and IrisPlex model. *Forensic Sci. Int. Genet.* 7 (2013) 453-460.

27. C. Pietroni, J.D. Andersen, P. Johansen, M.M. Andersen, S. Harder, R. Paulsen, et al. The effect of gender on eye colour variation in European populations and an evaluation of the IrisPlex prediction model. *Forensic Sci. Int. Genet.* 11 (2014) 1-6.
28. H. Machado, S. Silva. 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.* 8 (2014) 132-136.
29. M. Zieger, S. Utz. About DNA databasing and investigative genetic analysis of externally visible characteristics: A public survey. *Forensic Sci. Int. Genet.* 17 (2015) 163-172.
30. P.N. Ossorio. About face: forensic genetic testing for race and visible traits. *J. Law Med. Ethics* 34 (2006) 277-292.
31. A. M'Charek. Silent witness, articulate collective: DNA evidence and the inference of visible traits. *Bioethics* 22(9) (2008) 519-528.
32. Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida. Parecer sobre o regime jurídico da base de dados de perfis de A.D.N. 52/CNECV/2007 (Junho de 2007).
33. Lei n.º 12/2005, Informação genética pessoal e informação de saúde, Diário da República I Série-A n.º 18, de 26 de Janeiro de 2005