

O papel de marcadores moleculares na genética forense

D. Decanine *

Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande (MS), Brasil

*Endereço de e-mail para correspondência: decanine@hotmail.com. Tel.: +55-67-8119-9923.

Recebido em 16/03/2016; Revisado em 13/04/2016; Aceito em 04/05/2016

Resumo

O objetivo desse trabalho foi apresentar uma revisão bibliográfica sobre as tecnologias utilizadas na Genética Forense, enfatizando o uso de marcadores moleculares para a identificação humana. Apresento aqui alguns exemplos do potencial da Biologia Molecular para auxiliar na investigação criminal, bem como na definição de parentesco (maternidade e paternidade). A utilização desses marcadores é atualmente a peça fundamental para os testes de DNA forense. Estes sistemas são, na sua maioria, baseados na análise de painéis de sequências microssatélites específicas (STRs). Foi possível discorrer sobre o uso forense do DNA, sobre a presença de regiões hipervariáveis no material genético, o papel de marcadores moleculares, bem como abordar técnicas de análise de DNA e suas aplicações. A busca por novas metodologias se faz importante para reduzir os custos e impulsionar uma nova cultura genética na Ciência Forense, as quais terão impacto no futuro do DNA forense com a expansão da Biologia Molecular.

Palavras-Chave: DNA forense; STRs; Perfil de DNA; Investigações criminais.

Abstract

This work aimed to present a review on the technologies used in Forensic Genetics, emphasizing the molecular markers used for human identification. This work presents a few examples of Molecular Biology potential to assist in the criminal investigation as in definition of parentage (maternity and paternity). The use of these markers is currently fundamental for forensic DNA testing. These systems are based on analysis of short tandem repeat (STR) sequences (microsatellites) (STRs). It was possible to discuss the forensic DNA use, about the hypervariable regions, the role of molecular markers as well as DNA analysis and their applications. The search for new methodologies is important to reduce costs and boost a new genetic culture in Forensic Science that will affect for future forensic DNA with the expansion of Molecular Biology.

Keywords: Forensic DNA; STR; DNA profile; Criminal investigations.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente há uma grande preocupação quando pensamos na evolução científica, sobretudo na questão da Biologia Molecular, pois a ciência não é estática e a perícia deve acompanhar este processo. Neste contexto, a Genética Forense (ou DNA Forense) trata da utilização dos conhecimentos e das técnicas de Genética e de Biologia Molecular no auxílio da justiça no que tange desde a identificação de cadáveres e de suspeitos quanto à definição de paternidade (ou maternidade). O DNA empregado nesses processos é geralmente obtido de ossos ou dentes, fio de cabelo, sangue, tecido, sêmen, saliva e urina. E, portanto, a utilização de resultados de análises de material genético no processo legal é

altamente tópico e ambivalente. Por um lado, os cientistas nunca estiveram em melhor posição como agora para analisar o material biológico de diversas naturezas, mesmo em quantidades limitadas e degradadas. Por outro lado, a quantidade crescente de dados científicos gerados através de processos analíticos modernos não implica necessariamente em dar respostas totalmente satisfatórias [1].

As aplicações da Biologia Molecular para a investigação de crimes têm evoluído ao longo dos últimos 25 anos, a partir das investigações acadêmicas a respeito da estrutura e função do DNA, em particular a de sequências não codificante [2,3]. A aplicação predominante da Biologia Molecular Forense tem sido no teste de identidade humana, utilizando marcadores

não fenotípicos de um único nucleotídeo. A escolha destes marcadores para a análise forense foi impulsionada principalmente pela sua diversidade polimórfica, juntamente com o fato de garantirem o anonimato civil dos indivíduos analisados, não sendo possível determinar doenças, comportamento, “raça” e características físicas. Fica claro que a prova biológica, em especial a genética alcançou destaques nas varas criminais e de família, passando de meio complementar da prova para se tornar o fundamento das decisões da magistratura [4,5].

Conforme o *short communication* escrito por Bearmann, Vuille e Taroni [6], o interesse forense no DNA vai muito além do padrão, levantando muitas vezes questões sobre a maneira como as novas formas de dados deveriam ser tratadas, direcionando para uma perspectiva operacional. Existem inúmeros obstáculos na prática forense atual, dentre eles a pressão exercida pelo judiciário por respostas mais eficientes. Do ponto de vista social, a utilização de marcadores de DNA é uma das mais revolucionárias ferramentas para a análise da individualidade humana que teve início com a tipagem de grupos sanguíneos, tipagem HLA (antígenos leucocitários humanos) passando, então, para os mini-STRs e chegando aos microssatélites (STRs), que são os ideais para fragmentos pequenos de DNA, como na análise de ossos e material degradado [7].

A análise desses marcadores tornou-se fundamental para os testes de DNA forense, dado o seu poder de discriminação e os muitos sistemas de DNA produzidos comercialmente e validados para o uso forense. Todos estes sistemas são baseados na análise de painéis de sequências microssatélites específicas para um local conhecido como STRs por PCR em multiplex, seguida por eletroforese capilar [8].

2. USO FORENSE DO DNA

Por muito tempo as proteínas sanguíneas foram as mais utilizadas na identificação humana, talvez pelo fato de ser possível encontrá-las tanto no sangue propriamente dito como em outros fluidos corporais, como o sêmen. No entanto, estas proteínas são produtos de expressão gênica, e, muito embora sejam sistemas polimórficos e possuam herança mendeliana polialélica, sua variabilidade é limitada. Assim, durante décadas seu uso se baseou na exclusão de pessoas e não na identificação propriamente dita. Com o avanço da ciência e tecnologia, em meados dos anos 80, o foco passou a ser não o produto de transcrição gênica, e sim a estrutura do próprio DNA [9].

A determinação de identidade genética pelo DNA pode ser usada para demonstrar a culpabilidade dos criminosos, exonerar os inocentes, identificar corpos e

restos humanos em desastres aéreos e campos de batalha, determinar paternidade com confiabilidade praticamente absoluta, elucidar trocas de bebês em berçários e detectar substituições e erros de rotulação em laboratórios de patologia clínica [10].

As evidências físicas tornaram-se cada vez mais importante nas investigações criminais, refutando muitas vezes os relatos de testemunhas oculares não confiáveis ou susceptível ao viés metodológico e indutível. Provas físicas podem, de forma independente e objetiva, estabelecer o nexo causal de um suspeito/vítima à cena de um crime, contestar um alibi, ou direcionar para outra linha de investigação. No entanto, as fases iniciais da perícia, bem como a análise do local e adequada coleta dos vestígios pode ser fundamental para a resolução bem-sucedida de investigações criminais. Os métodos utilizados para o reconhecimento, coleta e preservação de provas físicas, tais como DNA, foram rigorosamente escrutinados e contestados em tribunal [11].

Segundo Campos e colaboradores [12] o DNA está presente em todas as células nucleadas dos eucariotos, arranjados na forma de cromossomos, e também no interior das mitocôndrias. O DNA é a principal unidade biológica que compõe os seres vivos. Situa-se no núcleo de todas as células do corpo humano e nunca é igual de uma pessoa para outra, exceto gêmeos univitelinos que são geneticamente idênticos, chamados clones naturais, e em indivíduos biologicamente relacionados que apresentam semelhanças genéticas típicas. Isso se deve ao fato de que sempre metade do DNA de um indivíduo é herdada de seu pai biológico e a outra metade é da mãe biológica como uma marca registrada da herança genética das pessoas [13]. Em estudos de identificação humana utiliza-se, principalmente o DNA nuclear, sendo o diagnóstico e o mapeamento genético técnicas fundamentais empregadas na identificação do DNA para fins forenses [14].

Entretanto, existem alguns fatores que podem influenciar a qualidade da amostra como, por exemplo, a quantidade reduzida da amostra, degradação da amostra, a exposição prolongada do material ao meio ambiente, a contaminação bacteriana e a ausência de pureza da amostra, no que diz respeito aos polimorfismos genéticos e marcadores moleculares comuns entre a população [11]. Desse modo, o sequenciamento do DNA mitocondrial, vem suprindo estas lacunas e superando algumas dessas limitações. Se antes, eram somente utilizadas impressões digitais e outras pistas para desvendar crimes, hoje, são inúmeras possibilidades de extrair material genético, pois, qualquer tecido ou fluido biológico se torna útil como fonte de DNA. Pode ser encontrado na urina a partir de células da bexiga, mucosa do pênis e glóbulos brancos do sangue, da mesma forma que podemos extrair de

células presentes na saliva, lágrimas, suor e outros materiais orgânicos [15].

Estas técnicas são conhecidas como datiloscopia genética (*genetic fingerprinting*), embora o termo mais preciso e utilizado para designá-las seja perfil de DNA. O perfil de DNA se baseia no fato de que gêmeos idênticos são os únicos indivíduos que possuem cópias idênticas do genoma humano, mas este, em indivíduos diferentes, contém muitos polimorfismos, que são posições onde a sequência de nucleotídeos difere em cada membro da população. Para ser considerado um polimorfismo, o alelo raro de um determinado loco deve estar presente em mais de 1% dos indivíduos da população. Assim, com esta grande variação no número e no tipo de variações, fica possível identificar uma pessoa com base no seu padrão de polimorfismos [16].

3. REGIÕES HIPERVARIÁVEIS DO DNA

No genoma humano existem determinadas regiões polimórficas de um locus (local fixo onde está localizado determinado gene ou marcador genético) no qual dois ou mais alelos tem frequências gênicas maiores que 0,01 em uma população. Quando este critério não é preenchido, o locus é monomórfico [17]. Essas regiões são utilizadas nos exames de paternidade e de outros vínculos genéticos e podem constituir repetições consecutivas de números variáveis ou minissatélites (VNTR, do inglês, *Variable Number of Tandem Repeats*); ou repetições consecutivas curtas ou microssatélites (STR). São regiões, altamente polimórficas isto é, apresentam uma variedade de tamanhos na população e, assim, a análise permite discriminar pessoas ou linhagens de pessoas a partir de um DNA íntegro e em grandes quantidades [12].

As sequências VNTRs variam de 12 a 100 pares de bases de comprimento e são encontradas em conjuntos contendo cerca de 3.000 repetições. Assim, estas sequências ocupam segmentos consideravelmente mais curtos do genoma do que as sequências satélites. Por uma razão desconhecida, os minissatélites tendem a ser instáveis, e o número de cópias de em sequência particular, frequentemente, aumenta ou diminui de uma geração à outra. Como resultado, o comprimento de um locus particular de minissatélite é altamente variável na população, mesmo entre membros da mesma família. Uma região VNTR típica consiste de 500 a 1000 pb, compreendendo principalmente unidades repetidas em sequência, cada qual com cerca de 15 a 35 pb de comprimento. Os VNTRs são particularmente empregados como marcadores moleculares para a identificação humana em casos criminais ou de paternidade, por serem bastante variáveis (polimórficos), contendo um número muito grande de alelos diferentes [14,18,19].

Por outro lado, os STRs, embora sejam muitos similares aos VNTRs, são as mais curtas sequências (1 a 5 pares de bases de comprimento) e estão presentes em pequenos agrupamentos de cerca de 50 a 100 pares de bases de comprimento. Os microssatélites estão espalhados de forma bastante homogênea no DNA, pelo menos 30.000 loci diferentes no genoma humano. As enzimas da maquinaria de replicação do DNA não conseguem copiar as regiões do genoma que contém essas sequências repetitivas, o que faz com que elas apresentem taxa de mutação extremamente alta. Estes locos são muito abundantes no genoma humano [18], e cada um deles possui um grande número de diferentes alelos, inclusive maior do que o encontrado em VNTRs, o que os torna ainda mais úteis para identificação humana.

Em média, 01 STR a cada 6 ou 10 kb (quilobase) ocorre no genoma humano [20] e, portanto, atualmente, as investigações genéticas nas populações pelos perfis de locos STRs têm sido amplamente empregadas, as quais permitem o uso de amostras contendo pequenas quantidades de DNA e/ou degradadas. Contudo, quando analisados individualmente não apresentam um poder de discriminação comparável aos VNTRs e, por isso, é preciso uma análise em conjunto de vários locos STRs para garantir resultados satisfatórios [21]. Marcadores STRs são suficientemente polimórficos e passíveis de multiplexagem para permitir a identificação inequívoca de um indivíduo, e assim pode colocar o DNA daquela pessoa na cena de um crime com um elevado grau de certeza. No entanto STRs não transmitem ao investigador quaisquer informações sobre quando ou como o material foi depositado, qual a fonte do material coletado (de células / fluido / tecido) ou quaisquer descrições fenotípicas de outra pessoa anônima que deixou que o material na cena do crime, que não seja o seu sexo [21].

Baseados nesses conceitos, os produtos comercializados hoje em dia para paternidade e identificação de suspeitos, quase que na sua totalidade, amplificam até 16 loci em uma única reação de PCR (Reação da Cadeia Polimerase). A análise do produto amplificado pela PCR em sequenciadores de DNA e as escadas alélicas (*ladders*) possibilita a identificação dos alelos existentes nos loci analisados [7]. Na maioria dos testes de paternidade por STRs a informação genética é obtida pelos resultados provenientes de quinze loci, podendo ser realizada pelo uso de kits comerciais disponíveis, esses números podem ser aumentados para se alcançar maiores confiabilidade nos resultados [22,23]. Segundo *Genetic Identity* [24], 16 loci (15 STR e Amelogenina, para determinação de gênero) são necessários para obter uma análise precisa e confiável, assim satisfazendo as necessidades das principais organizações mundiais.

Quando a análise de STRs se torna difícil ou impossível devido à quantidade ou qualidade do DNA que foi recuperado, há a opção, como já foi mencionado anteriormente, de se fazer o exame a partir do DNA mitocondrial (mtDNA). Embora esteja longe de ser tão informativo como as análises STRs, o mtDNA pode fornecer informações úteis tanto no quesito investigativo quanto na confirmação da identidade. Geralmente é feita por didesoxinucleótidos ("*Sanger*") e sequenciamento da região hipervariável de controle do genoma mitocondrial e foi revista para a utilização na Biologia Forense por Holland e colaboradores em 2013 [25].

Recentemente, o estudo da identificação humana tem se direcionado ainda para o uso de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) que, por serem marcadores de inserção/deleção (*indels*) pode atuar como coadjuvantes para fornecer informação genética decisiva em favor, a favor ou contra a relação assumida e, também, por permitem a identificação de evidências degradadas, comuns na Criminalística [26]. Ambos SNPs e *indels* agora podem ser obtidos com mais facilidade usando multiplexes de até 50 loci com base em comprimento de fragmentos, tornando possível a ampliação do leque de marcadores utilizados até o momento (STRs) [27].

4. MARCADORES MOLECULARES: SISTEMAS STR MULTIPLEX

Segundo Ferreira e Grattaplaglia [28] um marcador molecular é qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA. O fundamental é exatamente a diversidade nessas regiões gênicas culminando em um número de repetições variáveis de um indivíduo para outro, e, também pelo fato de serem passíveis de ser estudadas com sondas de DNA e com amplificação por PCR [29]. Como já fora dito, existe uma constante evolução envolvendo as práticas em Biologia Molecular direcionando para um esclarecimento melhor da identificação humana e cabe lembrar que o primeiro sistema de PCR usado na Genética Forense se preocupou em analisar o locus HLA-DQA1, que faz parte do complexo de histocompatibilidade principal humano nos leucócitos. Este sistema foi denominado *Amplitype DQA1* e continha inicialmente 6 alelos. Quando era testado em uma evidência, aproximadamente em 16% dos casos duas pessoas apresentavam o mesmo genótipo, fazendo com que fosse necessário a adição de outros sistemas de PCR para identificar os indivíduos [30].

O sistema desenvolvido posteriormente, usando princípios similares de análise de *Dot Blot*, foi o *Amplitype Polymer*. Sua maior contribuição foi a de

que ele realmente aumentou o poder de exclusão durante o teste (*discrimination power*). Na sequência surgiu o *AmpliFLP DIS80 kit* de amplificação por PCR, mais conhecido como DIS80. Este foi usado para a detecção de variações genéticas no locus polimórfico VNTR, DIS80. A sequência de repetição de base no locus DIS80 foi de 16 pb com o número de repetições que variam entre 14 e 41 (350-1000 pb). Todavia, devido ao fato de que este sistema foi desenvolvido analisando somente um locus gênico, o poder de exclusão não foi grande. Entretanto, em combinação com outros sistemas (multiplex) mostrou-se bastante útil [30].

Como no sistema de RFLP, os primeiros testes para análise de DNA em Medicina Forense foram baseados na variabilidade de sequências de DNA (polimorfismo sequencial). A classe de locos polimórficos com blocos repetitivos curtos (2-9 nucleotídeos repetidos), é chamada de STR ou microssatélite e se coloca em contraste com os sistemas DIS80 (minissatélites). Estes marcadores moleculares já foram discutidos, e tem sido mencionado que uma das suas principais vantagens é a possibilidade de processamento relativamente simples, rápido, e simultâneo de mais de 10 loci STR. Quase todos os sistemas utilizados nos testes forenses têm repetições de 4 pb (tetranucleotídeo) ou 5 pb (pentanucleotídeos) que ocorrem cerca de 50 vezes, dependendo do locus gênico [31,32]. Estes tipos de marcadores moleculares são muito curtos (100-400 pb) e muito usados em DNAs degradados. O produto da reação de amplificação dos STRs é detectado de acordo com seus respectivos tamanhos (peso molecular) após migração em gel de eletroforese capilar de alta resolução, semelhante ao observado no sequenciamento automático. Quando há a presença de STRs de mesmo tamanho, é possível diferenciá-los através das marcações fluorescentes [19].

Perfis de DNA forense são atualmente caracterizados utilizando um painel de alelos de multi-marcadores de STR que são estruturalmente análogos aos originais minissatélites, porém, com muito mais intervalos curtos de repetição e, portanto, mais fácil para amplificar com PCR multiplex. Primeira vantagem, já mencionado é que mais loci pode ser amplificado simultaneamente (multiplex). Outras características importantes no desenvolvimento incluem: alelos discretos e distinguíveis, a amplificação do locus que tende a ser grande, alto poder de discriminação, a ausência de ligação genética com outros loci a ser analisado, e níveis baixos de contaminação durante a amplificação [33].

Diversos kits comerciais validados, fornecidos por várias empresas, permitem a amplificação de múltiplos loci e constituem um considerável avanço na resolução de perícias do âmbito da Genética e Biologia Forense

[34]. Os sistemas STR mais comuns utilizados no trabalho forense de rotina são comercializados e cada kit de PCR multiplex utiliza colorações específicas e amplifica diversos STRs. Por exemplo, os kits comerciais *ProfilerPlus™* analisa simultaneamente 10 marcadores, o kit *PowerPlex™* para 16 STRs, e o *Identifiler™* para 16 marcadores [19], dentre outros como *AmpFLSTR® Identifiler™ PCR Amplification Kit* para 15 STRs, *PowerPlex®* sistemas ESX (16 STRs) e ESI (os mesmos 16 STRs com adição do SE33), *AmpFISTR® NGM™ PCR Amplification Kit* (10 loci incluídos no kit SGM plus com adição de 7 loci ESS junto com 5 loci adicionais), *Investigator ESSplex Plus Kit* (15 STRs e Amelogenina), *IDplex Plus kit* (13 STRs, mais D2S1338, D19S433 e Amelogenina) [29].

Devido ao fato destes alelos serem transmitidos por herança mendeliana, é possível que se faça vinculações genéticas tais como paternidade, maternidade e irmandade, bem como utilizar para tipagem individual e comparação com amostras questionadas obtidas em locais de crime e para vítimas de crimes sexuais. Para tanto, são utilizados cálculos populacionais das frequências alélicas previamente obtidas na população, implicando assim em resultados estatisticamente significantes e válidos [26]. Basicamente, existem dois conjuntos de marcadores STR conformes com as normas solicitadas pelos bancos de dados criminais em todo o mundo: o conjunto padrão Europeu de 12 marcadores STRs [35] e o padrão dos Estados Unidos, denominado CODIS (*Combined DNA Index System*) com 13 marcadores STRs [36].

5. BANCO DE DADOS CRIMINAL

O primeiro banco de dados de perfis genéticos de criminosos foi criado na Inglaterra, o Banco de Dados Reino Unido DNA Nacional (NDNAD) criado em 1995. A partir do final de 2005, ele levou os perfis de cerca de 3,1 milhões de pessoas. Em março de 2012 a base de dados continha um número estimado de 5.950.612 indivíduos. O banco de dados, que cresce em 30.000 amostras a cada mês, é alimentado por amostras recuperadas de cenas de crime e levado de suspeitos da polícia e, em Inglaterra e no País de Gales, qualquer pessoa detida e presa em uma delegacia [37]. Entretanto, o sistema de Índice de DNA Combinado (CODIS) criado pelo FBI, que começou como um projeto piloto em 1990 e ganhou força em 1994, deu ao FBI a autoridade de estabelecer um banco de dados em nível nacional para fins de investigação criminal [29].

Existem dois arquivos diferentes de perfis genéticos com objetivos complementares. O “Índice Forense” (*“Forensic Index”*) que contém perfis genéticos obtidos a partir de cenas de crimes e o “Índice de Criminosos” (*“Offender Index”*) com perfis genéticos de criminosos

condenados por crimes sexuais e outros crimes violentos [29]. A partir de fevereiro de 2016 o CODIS contava com 684.519 perfis forenses e 14.464.461 perfis criminosos, sendo a maior base de dados de DNA no mundo. Ultrapassou a base NDNAD do Reino Unido, estimada em cerca de 5.950.612 perfis em março de 2012 [38].

A Unidade CODIS gerencia o Índice de DNA Sistema Combinado (CODIS) e o Sistema de Índice de DNA Nacional (NDIS) [39]. O Programa CODIS é designado para unidade federal, estadual e laboratórios de criminalidade locais nos Estados Unidos e internacionais, e também para laboratórios de criminalística com aplicação para fomentar o intercâmbio e a comparação das provas de DNA forense a partir de investigações de crimes violentos. Esta unidade também fornece gestão administrativa e apoio ao FBI para vários conselhos consultivos, Departamento de Justiça (DOJ) dos programas de outorga, e legislação sobre DNA [38].

Segundo o site oficial do FBI [38], o Índice de DNA Nacional (NDIS) contém, atualmente, mais de 12.205.768 perfis de criminosos, 2.258.693 perfis de detidos e 684.519 perfis forenses. Em última análise, o sucesso do programa CODIS é garantido pelos crimes que ajuda a solucionar, tendo em vista que em fevereiro de 2016, o CODIS teve mais de 322.011 acessos em mais de 309.614 investigações.

São adotados 13 loci de STR para o banco de dados nacional de suspeitos, que inicialmente foi limitado a estupradores e assassinos condenados [40]. A base do CODIS é a comparação dos perfis genéticos obtidos dos vestígios biológicos em local de crime com os cadastros no banco de identificação a partir de outros crimes (bancos de dados de perfis de DNA de criminosos), portanto, todo material biológico colhido em cena de crime fornece perfil genético para o Índice Forense. Em termos de aplicações forenses específicas, o objetivo do banco de dados é auxiliar na prova da inocência ou culpabilidade de suspeitos, identificar restos mortais e amostras biológicas, culminando em celeridade na investigação criminal, resolução de crimes antigos e produção de informações para a investigação criminal [40].

Os marcadores moleculares do CODIS foram selecionados de forma a coincidir com outros loci escolhidos pelo *Forensic Science Services* na Grã-Bretanha para o seu banco de dados e organizações como a INTERPOL nacional. Dois fatores importantes estão relacionados com o CODIS, ou seja, nenhum dos marcadores estão ligados dentro de exons, e não estão associados a fenótipos conhecidos, são eles, o CSFIPO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, VWA e a Amelogenina para identificação do sexo [41].

Do ponto de vista jurídico, são discutidas as possibilidades legais e éticas da construção de bancos de dados com informações genéticas de criminosos, a fim de auxiliar a investigação na busca de suspeitos de crimes, especialmente a partir de evidências de crimes sexuais. Além da necessidade de se tomar os cuidados necessários para que o domínio de informações genéticas não implique em uma nova visão biológica (genética) do crime. No Brasil, a introdução dos bancos de dados de perfis genéticos baseia-se em algumas resoluções importantes, como a Lei nº 12.654, publicada em 28 de maio de 2012, que altera dispositivos da lei de execução penal, admitindo coleta e armazenamento em bancos de dados dentre outros, como os destacados nos Art. 5º, 7º-A e B e Art. 3º. A Lei nº 7.210, de 11 de julho de 1984 - Lei de Execução Penal acrescida do Art. 9º-A [42].

Art.5º-A Os dados relacionados à coleta do perfil genético deverão ser armazenados em banco de dados de perfis genéticos, gerenciado por unidade oficial de perícia criminal; (§ 1º As informações genéticas contidas nos bancos de dados de perfis genéticos não poderão revelar traços somáticos ou comportamentais das pessoas, exceto determinação genética de gênero, consoante as normas constitucionais e internacionais sobre direitos humanos, genoma humano e dados genéticos. § 2º Os dados constantes dos bancos de dados de perfis genéticos terão caráter sigiloso, respondendo civil, penal e administrativamente aquele que permitir ou promover sua utilização para fins diversos dos previstos nesta Lei ou em decisão judicial. § 3º As informações obtidas a partir da coincidência de perfis genéticos deverão ser consignadas em laudo pericial firmado por perito oficial devidamente habilitado).

Art. 7º-A exclusão dos perfis genéticos dos bancos de dados ocorrerá no término do prazo estabelecido em lei para a prescrição do delito. 7º-B. A identificação do perfil genético será armazenada em banco de dados sigiloso, conforme regulamento a ser expedido pelo Poder Executivo.

Art. 9º-A. Os condenados por crime praticado, dolosamente, com violência de natureza grave contra pessoa, ou por qualquer dos crimes previstos no art. 1º da Lei nº 8.072, de 25 de julho de 1990, serão submetidos, obrigatoriamente, à identificação do perfil genético, mediante extração de DNA - ácido desoxirribonucleico, por técnica adequada e indolor [43].

6. ANÁLISES FORENSE DE DNA: RECENTES AVANÇOS

O avanço em várias áreas da Biologia Molecular tem impulsionado novos conhecimentos a respeito dos ácidos nucleicos, os quais vão muito além da estrutura e sequência do DNA propriamente dito. Inúmeras variantes são muitas vezes agrupadas como "epigenética". Padrões de metilação específicos também estão associados com características fenotípicas, e são passíveis de serem detectados por novas tecnologias de sequenciamento de DNA, não muito diferentes das propostas inicialmente. Em um contexto forense, estes

avanços na biologia molecular já demonstraram um grande potencial na identificação de tipos de tecido, bem como na detecção de várias características comportamentais [44].

Dentro do contexto epigenético podemos observar cinco alterações importantes, como a metilação de DNA (metilação nas regiões promotoras de genes – CpG) promovendo o silenciamento da expressão gênica; as modificações pós-traducionais de histonas; a remodelação da cromatina (um fator ATP-dependente); histonas variantes, as quais podem aumentar estabilidade ou diminuir a estabilidade, modificar aminoácidos, dentre outros; e por fim, os *noncoding* RNAs, dentre eles os microRNAs (miRNAs) (importante no silenciamento de genes pós-transcrição) [45].

Sequências específicas de DNA tornam-se metiladas durante o curso do desenvolvimento de um organismo. A metilação no âmbito da epigenética é bem adequada para a detecção e identificação de fluidos corporais, explorando a metilação diferencial dos sítios cromossômicos específicos entre os tecidos [46] e entre os indivíduos, incluindo até gêmeos idênticos [47]. Do mesmo modo, a expressão de tecido de miRNA pode ser utilizada para a identificação dos fluidos corporais num ambiente forense [48,49].

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas não-codificantes com funções reguladoras importantes; muitas têm padrões de expressão específicos. Seu tamanho muito pequeno, em princípio, os torna menos propensos a processos de degradação, ao contrário de RNA mensageiro (mRNA), que foram anteriormente propostos como ferramentas moleculares para identificação de fluido corporal forense [48].

A grande maior parte dos avanços em análise forense se baseia em inovação metodológica com diferentes marcadores a fim de aumentar a viabilidade e amplitude da identificação e, muitas vezes, na ânsia de diminuir custos. Pois, para um diagnóstico ser considerado conclusivo após a detecção de uma possível exclusão ou mutação é necessária a utilização de mais marcadores para alcançar um índice de semelhanças acumuladas para liberação ou confirmação dos resultados. A análise do cromossomo Y, por exemplo, é muito útil em casos em que há um excesso de DNA de vítima mulher e pequenas quantidades de DNA masculino. Por exemplo, em casos que incluem agressão sexual sem ejaculação, agressão sexual por um homem vasectomizado, DNA masculino sob as unhas de uma vítima, DNA masculino sobre a pele (no toque), e roupas ou pertences de uma vítima do sexo feminino [50].

A utilização de marcadores forenses e cromossomo Y (Y-STR) aumentaram consideravelmente nos últimos anos. Os kits desenvolvidos e comercialmente

disponíveis STR-multiplex contém um número crescente de marcadores Y-STR, tal como o 12 para o Sistema Y *PowerPlex1* (PPY, 2003), 17 no *AmpFlSTR1 Yfiler1*, (Yfiler, 2004), 23 no *PowerPlex Y23System* (PPY23, 2012) e 27 no Kit *AmpFlSTR1 Yfiler1* (2014). Y-STRs, além de serem muito importantes em violência sexual, também podem ser muito úteis em análises de parentesco, devido ao rigoroso padrão de herança paterna [51]. Contudo, como a taxa de mutação para o Y-STRs usado é relativamente muito baixa, é difícil, se não impossível, a diferenciação entre indivíduos do sexo masculino geneticamente relacionados.

Em um esforço colaborativo mundial, foram analisados 19.630 cromossomos Y de 129 populações diferentes em 51 países, utilizando o Sistema PPY23 (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385AB, DYS437, DYS438, DYS439, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635, GATAH4, DYS481, DYS533, DYS549, DYS570, DYS576, e DYS643. Foi verificado então, que esse sistema se mostrou mais forte do que outros kits disponíveis, mas ao mesmo tempo revelou os mesmos padrões gerais de estrutura populacional [52]. No Brasil, estudo semelhante foi realizado no Estado de Goiás, no qual foi analisado um total de 353 homens para 12 Y-STRs. Os resultados foram condizentes com a história de miscigenação da população do Brasil Central e permitiu o estabelecimento de haplótipos que servem como referência na elucidação de casos criminais e testes de paternidade [53].

Baseado na busca de novos marcadores, cada vez mais tem se utilizado, não somente o cromossomo Y, mas também o DNA mitocondrial (mtDNA), haplogrupos valiosos para as investigações em Ciência Forense, Antropologia Molecular e Genética Humana. Mitchell e colaboradores [54] desenvolveram um painel personalizado de 61 marcadores de mtDNA para a classificação de alto rendimento para indivíduos europeus, africanos e do nativo americano/asiático. As distribuições haplogrupos mitocondriais classificados foi altamente concordante com a auto-identificado raça/etnia (SIRE) em brancos não-hispânicos (94,8%), mas foi consideravelmente menor em populações miscigenadas, incluindo negros não-hispânicos (88,3%), os mexicanos-americanos (81,8%), e outros hispânicos (61,6%). Mostrando, contudo, que é importante considerar inconsistências entre SIRE e ascendência genética ao realizar estudos de associação genética.

Além desses 61 marcadores já descritos, outros grupos se empenham em outras perspectivas utilizando o mtDNA, como a análise genética de ossos na busca de DNA confiável para a identificação humana, demonstrada por Higgins e colaboradores [55], os quais observaram que a amostragem do cimento dos dentes enterrados por até 16 meses pode fornecer uma fonte

confiável de DNA nuclear enquanto que o mtDNA é melhor preservado na dentina, especialmente dentro da raiz, tornando as raízes dos dentes de mais valor do que os tecidos coronais. E o mapeamento genômico do mtDNA (*mtGenome*), como apresentado na revisão feita por Just, Irwin e Parson [56].

Outra perspectiva de futuro na análise de DNA forense é o sequenciamento de próxima geração (NGS) com a sua capacidade de alto rendimento e baixo custo. Esta tecnologia pode ser aplicada para analisar simultaneamente múltiplos loci de interesse forense em diferentes contextos genéticos, como autossomos mitocondrial e cromossomos sexuais. Além disso, a tecnologia de NGS também pode ter aplicações potenciais em muitos outros aspectos da pesquisa, o qual inclui a construção de banco de dados de DNA, ascendência e inferência fenotípica, estudos com gêmeos monozigóticos, fluido corporal e identificação das espécies animal, planta e microbiológicas forense [57].

Desde 2005, as tecnologias NGS vêm evoluindo de maneira significativa até o presente, com tecnologia que não só permite a detecção de moléculas individuais, mas também permite o sequenciamento em tempo real. O atual líder neste campo é o sistema *RS PacBio*. Com isso, pode atingir uma média de leitura de comprimentos de 55.008.500 pb e pode também detectar de forma direta as modificações epigenéticas. Considerando a compatibilidade e custo, bem como as limitações do sequenciamento de primeira geração, a tecnologia NGS provavelmente em breve deve substituir o STR convencional para estudos forenses [57].

Cientistas forenses têm investigado como fazer a transição da eletroforese capilar (CE) para o sequenciamento paralelo maciço (MPS) para aperfeiçoar as análises de perfis de DNA. MPS oferece várias vantagens sobre CE, tais como STR multiplex com números ilimitados de loci gênico e polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), pequenos fragmentos amplificados, sem restrições de separação de tamanho e com maior poder de discriminação.

Van Neste e colaboradores [58] apresentaram uma estrutura bioinformática My-Forenses-Loci-consultas (MyFLq) para análise de MPS em dados forenses e um método para avaliar o desempenho global e utilidade de um locus em relação ao MPS. Pode ser utilizado também para estimar se um alelo desconhecido, cuja sequência não se encontra presente na base de dados MySQL, é de fato um novo alelo ou um erro sequenciamento. Os resultados mostram, tecnicamente, que o MPS forense caracteriza uma grande promessa para aplicação na rotina genômica forense, devido tanto ao fato já descrito acima, como também por ser aplicável à autópsia molecular na medicina legal e em pesquisas de mtDNA.

7. CONCLUSÕES

A Biologia Molecular tem ganhado cada vez mais espaço nas questões investigativas, legais ou de segurança, apesar de ser mais direcionada para a identificação humana e teste de paternidade. As tecnologias aplicadas e os métodos relacionados ao DNA progrediram a ponto de não colocar em dúvida a admissibilidade dos dados quando estes forem coletados e analisados de maneira adequada. Por outro lado, atualmente, a Genética Forense também pode ser aplicada na identificação ou individualização de animais, plantas e microrganismos presentes em resíduos, provas ou até mesmo no corpo de um cadáver, sempre em busca de um desfecho que não possa ser questionado juridicamente.

A inovação da ciência e novos conhecimentos metodológicos proporcionam progressos importantes na investigação criminal desde a descoberta das impressões digitais. Um número crescente de cientistas está convencido de que o sequenciamento de DNA em breve vai substituir os métodos baseados na análise de comprimento de fragmentos devido ao fato de poderem ser expandidos e analisados de forma rápida e com satisfatório custo benefício. A inclusão de um conjunto mais abrangente de marcadores para amostras de referência irá sobrepor-se aos bancos de dados atuais de investigação. Além do que, com a evolução da tecnologia, é provável que em um curto prazo de tempo os MPS sejam capazes de oferecer a sensibilidade de detecção para amostras de baixa quantidade e qualidade de DNA.

AGRADECIMENTOS

Ao IPOG - Instituto de Pós-graduação e Graduação por proporcionar o ensino de pós-graduação em Perícia Criminal e Ciência Forense.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] E. Alberi. *Perícia Criminal e Cível: Uma Visão Geral Para Peritos e Usuários da Perícia*. 3. ed. Campinas: Millenium, 512p, 2011.
- [2] A.J. Jeffreys; V. Wilson; S.L. Thein. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature* **314**, 67-7, 1985.
- [3] R. Wolff; Y. Nakamura; S. Odelberg; R. Shiang; R. White. Generation of variability at VNTR loci in human DNA. *DNA Fingerprinting: Approaches and Applications* **58**, 20-38, Birkhäuser Basel: Springer 1991.
- [4] E. de C. Gomes. *Perícias Genéticas, Paternidade e Responsabilidade pela Procriação*. In: MARTINS-COSTA, J.; MÖLLER, L.L. (Org) *Bioética e Responsabilidade*. Ed. Forense. 1.ed 361-390, 2009.
- [5] R. J. Medeiros. *A Genética na Prova Penal*. São Paulo: Pilares, 120p, 2009.
- [6] A. Biedermann; J. Vuille; F. Taroni. DNA, statistics and the law: a cross-disciplinary approach to forensic inference. *Front. Genet.* **5**, 136, 2014.
- [7] M.R. Jobim; G. Ewald; M.J. Wilson; B. Chamum; L.F. Jobim. *Novos testes de DNA na investigação de paternidade com o suposto pai falecido*. RT/Fasc. Civ. **874**, 55-69, 2008.
- [8] C. R. Hill; D. L. Duewer; M. C. Kline; C. J. Sprecher; R. S. McLaren; D. R. Rabbach, B.E. Krenke; M.G. Ensenberger; P.M. Fulmer; D.R. Storts; J.M. Butler. Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex (R) ESX 17 and ESI 17 systems. *Forensic Sci. Int. Genet.* **5(4)**, 269-75, 2011.
- [9] M. Benecke. DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. *Naturwissenschaften.* **84**, 181-188, 1997.
- [10] S. D. J. Pena. *Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA* (2005). In: KOCH, A.; ANDRADE, F. M. The use of molecular biology techniques in forensic genetics: a review. *RBAC* **40(1)**, 17-23, 2008.
- [11] H.C. Lee; C. Ladd. Preservation and Collection of Biological Evidence. *Croat. Med. J.* **42(3)**, 225-228, 2001.
- [12] C.K.P. Campos; M.N. Siqueira; J.P. Borges; L.A. Rodrigues; J.S. Oliveira; A.R. Marcelo; A.F. Neves. Exames de paternidade pelo DNA: Uma metodologia para ensino da genética molecular. *Genética na escola*, **5(2)**, 7-13, 2010. Disponível em: <http://www.geneticanaescola.com.br/#!volume-5---n-2/c1i3t>. Acesso em 20 de julho de 2015.
- [13] S. Raskin. *Manual Prático do DNA para investigação de paternidade*. Curitiba: Juruá Editor, 2008.
- [14] F. Duarte; A. Perez; S. Pena; M. Barros; E. Rossi. *A avaliação do DNA como prova forense*. Ribeirão Preto: FUNPEC. 283p, 2001.
- [15] L. A. F. Silva; N. S. Passos. *DNA forense – coleta de amostras biológicas em locais de crimes para estudo do DNA*. Maceió: UFAL, 84p, 2006.
- [16] T.A. Brown. *Clonagem Gênica e Análise de DNA: Uma introdução*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed (2001) 376p. In: KOCH, A.; ANDRADE, F. M. The use of molecular biology techniques in forensic genetics: a review. *RBAC* **40(1)**, 17-23, 2008.
- [17] L. B. Jorde; J. C. Carey; R.L. White. *Genética Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1996.
- [18] W. C. Thompson. Evaluating the Admissibility of New Genetic Identification Tests: Lessons from the D.N.A. War. *J. Criminal Law and Criminology*, **84**, 22-104, 1993.
- [19] V.K. Kashyap; T. Sitalaximi; P. Chattopadhyay; R. Trivedi. DNA Profiling Technologies in Forensic Analysis. *Int. J. Hum. Genet.* **4(1)**, 11-30, 2004.
- [20] J.S. Beckman; J.L. Weber. Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* **12**, 627-631, 1992.
- [21] A.C.S. Góes. Análise de regiões polimórficas do DNA com o objetivo de estabelecer vínculos genéticos, identificar restos mortais ou realizar perícias criminais. *Revista do Biomédico*. **65**, 22-23, 2005. Disponível em:

- http://www.crbl.gov.br/bio65/artigocien_65.asp . Acesso em: 24 de julho 2015.
- [22] M.S. Figueiredo; F. Fernandez-Rosado; I. Kunii; A. C. Pacheco; J.A. Lorente; B. Budowle. Brazilian Caucasian Population Data for 15 STR Loci (PowerPlex 16TM Kit). *J. Forensic Sci.* **49(1)**, JFS2003274–491, 2004.
- [23] L.C. Dolinsky; L.M.C.V. Pereira. DNA Forense. *Saúde e ambiente em Revista*, **2(2)**, 11-22, 2007.
- [24] GENETIC IDENTITY. Powerplex 16 systems. Promega. .Net Disponível em: <https://www.promega.com.br/products/genetic-identity/str-analysis-for-forensic-and-paternity-testing/powerplex-16-system/> . Acesso em: 20 de julho 2015.
- [25] M. Holland; T. Melton; C. Holland. Forensic Mitochondrial DNA Analysis: Current Practices and Future Potential. *Forensic DNA Analysis, Current Practices and Emerging Technologies*, NW: CRC Press, pp. 249-278, 2013.
- [26] J.M. Butler. *Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. 2. ed. USA: Elsevier Academic Press, 688p, 2005.
- [27] P. M. Schneider. Beyond STRs: The Role of Diallelic Markers in Forensic Genetics. *Transfusion Medicine Hemotherapy* **39**, 176–180, 2012.
- [28] M.E. Ferreira; D. Grattapaglia. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. 3.ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220p, 1998.
- [29] S. D. J. Pena. Segurança Pública: determinação de identidade genética pelo DNA. *Seminários Temáticos para a 3ª Conferência Nacional de C, T & I. Parcerias Estratégicas* **20**, 447-460, 2005.
- [30] D. Primorac; M. Schanfield. *Forensic DNA Applications: An Interdisciplinary Perspective*. Boca Raton: CRC press, 647p, 2014.
- [31] H.A. Hammond; L. Jin; Y. Zhong; C.T. Caskey; R. Chakraborty. Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am. J. Hum. Genet.* **55**, 175-189, 1994.
- [32] R.L. Alford; H.A Hammond; I. Coto; C.T. Caskey. Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* **55**, 190-195, 1994.
- [33] W. Goodwin; A. Linacre; S. Hadi. *An Introduction to Forensic Genetics*, 2.ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011.
- [34] P. M. Oliveira; S. A. Resende. Interesse do estudo de STRs na investigação médico legal. *Dissertação de Mestrado*, ICBAS, Universidade do Porto, 2003.
- [35] P. Gill; L. Fereday; N. Morling; P.M. Schneider. The evolution of DNA databases - Recommendations for new European STR loci. *Forensic Sci. Int.* **156**, 242–244, 2006. In: ROEWER, L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Roewer Investigative Genetics* **4**, 22, 2013.
- [36] B. Budowle; T.R. Moretti; S.J. Niezgodá; B.L. Brown. *CODIS and PCR-based short tandem repeat loci: law enforcement tools, Proceedings of the Second European Symposium on Human Identification*. Madison, WI: Promega Corporation: 73-88, 1998. In: ROEWER, L. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Roewer Investigative Genetics* **4**, 22, 2013.
- [37] UK. National DNA database.Net . Disponível em <http://www.freebase.com/m/06qmqj>. Acesso em: 13 de abril 2016.
- [38] FBI. Laboratory Service. *CODIS-NDIS Statistics*. .Net. Disponível em: <https://www.fbi.gov/about-us/lab/biometric-analysis/codis/ndis-statistics>. Acesso em 13 de abril 2016.
- [39] BRASIL. Projeto Rede Integrada de Bancos de Perfis Genéticos. 18p, 2009.
- [40] D. R. Hares. Expanding the CODIS Core Loci in the United States. *Forensic Sci. Int. Genet.* **6**, 52-54, 2011.
- [41] S.H. Katsanis; J.K.J. Wagner. Characterization of the standard and recommended CODIS markers. *Forensic Science*, 2013.
- [42] R. Garrido; C. Pessoas. Genética e Prevenção ao Crime. *Revista do laboratório de estudos de virulência da UNESP*. 10.ed., 2012.
- [43] BRASIL. Decreto-lei no 12.654, DE 28 DE MAIO DE 2012. Lei de Execução Penal. 191º da Independência e 124º da República. Net, Brasília (2012). Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal=1&pagina=1&data=29/05/12>. Acesso em: 26 de julho de 2015.
- [44] P. Gunn; S. Walsh; C. Roux. The nucleic acid revolution continues –will forensic biology become forensic molecular biology? *Frontiers in Genetics* **5**, 44, 2014.
- [45] H. R. Muller; K. B. Prado. Epigenética: Um Novo Campo da Genética. *RUBS* **1(3)**, 61-69, 2008.
- [46] T. Madi; K. Balamurugan; R. Bombardi; G. Duncan; B. Mccord. The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. *Electrophoresis*, **33(12)**, 1736-1745, 2012.
- [47] C. Li; S. Zhang; T. Que; L. Li; S. ZHAO. Identical but not the same: the value of DNA methylation profiling in forensic discrimination within monozygotic twins. *Forensic Sci. Int. Genet.* **3(1)**, 337–338, 2011.
- [48] D. Zubakov; A. W. M. Boersma; Y. Choi; P. F. Kuijk; E. A. C. Wiemer; M. Kayser. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int. J. Legal Medicine* **124(3)**, 217-26, 2010.
- [49] C. Courts; B. Madea. Specific micro-RNA signatures for the detection of saliva and blood in forensic body-fluid identification. *J. Forensic Sci.* **56**, 1464-1470, 2011.
- [50] L. Roewer. DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Roewer Investigative Genet.* **4**, 22, 2013.
- [51] K.B. Gettings. *Yfiler Plus Kit, Improved Haplotype Discrimination Using “Rapidly Mutating” Y-STR Markers in a Large Multiplex Kit*. (2014). Disponível: http://www.cstl.nist.gov/strbase/pub_pres/YfilerPlus_H_ofTopics%20Workshop_MAAFS_2014.pdf. Acesso em: 26 de julho 2015.
- [52] J. Purps; S. Siegert; S. Willuweit. A global analysis of Y-chromosomal haplotype diversity for 23 STR loci. *Forensic Sci. Int. Genet.* **12**, 12-23, 2014.

- [53] T. C. Vieira; M. A. Gigonzac; D. M. Silva; R. G. Rodovalho; G. S. Santos; A. D. Da Cruz. Y-STR haplotype diversity and population data for Central Brazil: implications for environmental forensics and paternity testing. *Genetic Molecular Research* **13(2)**, 3404-3410, 2014.
- [54] S. L. Mitchell; R. Goodloe; K. Brown-Gentry; S. A. Pendergrass; D. G. Murdock; D. C. Crawford. Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. *Human Genetics* **133(7)**, 861-868, 2014.
- [55] D. Higgins; A. B. Rohlfach; J. Kaidonis; G. Townsend; J. J. Austin. Differential nuclear and mitochondrial DNA preservation in post-mortem teeth with implications for forensic and ancient DNA studies. *PLoS ONE* **10(5)**, e0126935, 2015.
- [56] R.S. Just; J.A. Irwin; W. Parson. Mitochondrial DNA heteroplasmy in the emerging field of massively parallel sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* **18**, 131-139, 2015.
- [57] Y. Yang; B. Xie; J. Yan. Application of Next-generation Sequencing Technology in Forensic Science. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **12**, 190–197, 2014.
- [58] C. Van Neste; M. Vandewoestyne; W. Van Criekinge; D. Deforce; F. Van Nieuwerburgh. MyForensic-Loci-queries (MyFLq) framework for analysis of forensic STR data generated by massive parallel sequencing. *Forensic Sci. Int. Genet.* **9**, 1-8, 2014.