



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

JUDAS TADEU NUNES NÓBREGA

**SEPULTAMENTOS PRÉ-HISTÓRICOS:
UM PROTOCOLO ALTERNATIVO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DOS
OSSOS ANTIGOS NO BIOMA CERRADO DO BRASIL CENTRAL**

GOIÂNIA

2012

JUDAS TADEU NUNES NÓBREGA

**SEPULTAMENTOS PRÉ-HISTÓRICOS:
UM PROTOCOLO ALTERNATIVO PARA EXTRAÇÃO DE DNA DOS
OSSOS ANTIGOS NO BIOMA CERRADO DO BRASIL CENTRAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientadora:

Prof^ª Dr^ª Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Co-orientadora:

Prof^ª Dr^ª Rosiclér Theodoro da Silva

GOIÂNIA

2012

N754s Nóbrega, Judas Tadeu Nunes.

Sepultamentos pré-históricos : um protocolo alternativo para extração de DNA dos ossos antigos do bioma cerrado do Brasil Central [manuscrito] / Judas Tadeu Nunes Nóbrega. – 2012.

79 f. : il., colors.

Bibliografia: f. 70-74

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Mestrado em Genética, 2012.

Orientadora: Prof^a. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosiclér Theodoro da Silva.

Inclui lista de figuras, fichas técnicas, tabelas, abreviaturas.

Inclui anexos. 1. Arqueologia – Brasil Central. 2. Bioma cerrado – povos primitivos – Brasil Central. 3. Povos primitivos. 4. DNA – ossos antigos – extração – protocolo alternativo. I. Título.

CDU: 902((817)(043.3)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 ● Setor Universitário
Caixa Postal 86 ● CEP 74605-010
Goiânia ● Goiás ● Brasil
Fone: (62) 3946.1070 ● Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br ● prope@pucgoias.edu.br

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA EM 29 DE MARÇO DE 2012 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM CONCEITO A**

Prof^ª. Dr^ª. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura / PUC Goiás
(presidente-orientadora)

Prof^ª. Dr^ª. Rosiclér Theodoro da Silva / PUC Goiás
(membro)

Prof^ª Dr^ª Sibeles Aparecida Viana / PUC Goiás
(membro)

Prof^ª. Dr^ª. Daniela de Melo e Silva / UFG
(membro)

Este trabalho dedico ao meu Criador
que me capacitou e à minha esposa Viviane
que me incentivou e me deu incondicional
apoio nesta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial a Prof^a. Dr^a Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura que aceitou me orientar neste projeto e que esteve sempre presente orientando e incentivando.

Agradeço a minha Co-orientadora, Prof^a Dr^a Rosiclér Theodoro da Silva, do Instituto Goiano de Pré-história e Antropologia pela paciência e ensino do necessário ao desenvolvimento do projeto, no que tange à Arqueologia

Agradeço a minha esposa Viviane Martins de Moura Nóbrega, arqueóloga, pelos ensinamentos e ajuda no que se refere à arqueologia inclusive nos trabalhos de campo e documentação.

Agradeço as minhas colegas Ariane e Nathalie, mestres em Genética, que me apoiaram, ensinaram, incentivaram e me introduziram a prática no laboratório do MGene.

Agradeço aos funcionários do MGene, pela atenção que dedicam aos alunos do Mestrado, enfatizando a cordialidade de atendimento do secretário do curso de Mestrado, José Renato.

Agradeço ao IGPA, Museu Histórico de Jataí e a Griphus Consultoria em Arqueologia pela prontidão em ceder as amostras ósseas utilizadas neste trabalho.

Agradeço aos colegas de curso pela convivência pacífica e amiga.

Agradeço a cada professor do mestrado pela dedicação ao ensino e respeito ao aluno..

Agradeço o apoio do IGPA pelos ensinamentos dos professores e ajuda da Maria Socorro para acesso ao acervo.

Agradeço o apoio de minha filha Juliana, meu genro Cristiano e do Prof. Romeu Henkes, meu cunhado, que acompanharam meu trabalho desde o início.

Agradeço a todos os amigos que me incentivaram na pessoa da sempre presente amiga, Arqueóloga Patrícia Fernanda.

Viver e não ter a vergonha de ser feliz
Cantar... (E cantar e cantar...)
A beleza de ser um eterno aprendiz
Gonzaguinha - Eterno Aprendiz

RESUMO

Arqueologia, *Archaios* = antigo, passado e *Logos* = estudo, ciência que estuda a cultura material das sociedades passadas, objetivando compreender a estrutura, funcionamento e processos de mudanças daquelas sociedades. Elucidar a origem do homem americano é um de seus desafios e dentre as teorias existentes tem mais notoriedade a travessia, do homo sapiens, pelo estreito de Bering, migrando para fora da África a partir de 150.000 anos antes do presente (AP), terminando por ocupar, no final do pleistoceno e início do holoceno o último grande reduto da Terra: as Américas. O mapeamento genético dos haplogrupos sinaliza positivamente para essa hipótese porém se o homem se dispersou por todas as Américas procura-se saber quem eram os moradores primitivos do Bioma Cerrado do Brasil Central cujo material esquelético foi encontrado em diversos sítios arqueológicos. O material encontrado em sítios arqueológicos, datados, apontam para mais de 7 mil anos antes do presente e com o intuito de saber quem eram esses povos que para aqui migraram é necessário classificá-los haplotipicamente sendo o passo inicial a obtenção do DNA, de difícil extração em virtude das contaminações e intempéries próprias do Bioma Cerrado. Com a obtenção dos ossos e dentes fornecidos pela academia Arqueológica a busca de um protocolo para extração de DNA, eficiente, passou por inúmeras tentativas e modificações de métodos já existentes. Mais de uma centena de tentativas de extração de DNA foram realizadas, concluindo finalmente um protocolo, adaptado, com maiores quantidades de determinadas substâncias e utilizado para extração de DNA de 32 amostras de ossos e dentes de diversos sítios arqueológicos. O material extraído foi quantificado e submetido à PCR para amplificação do gene ZFX/Y tendo como controle DNA extraído de sangue periférico humano pela técnica de NaCl, e sendo comprovado serem ossos e dentes humanos. Estabelecido um protocolo alternativo, eficiente, para extração de DNA fica menos árdua a tarefa de sequenciamento e identificação dos povos primitivos do bioma Cerrado no Brasil Central.

Palavras-Chave: Genética, Arqueologia, DNA Humano, Protocolo.

ABSTRACT

Archeology, from the Greek *archaios* (ancient) and *logos* (study), is the science that studies the material culture of past societies in order to understand their structure, how they work, and how change occurs. Finding the origins of the American man is one of its challenges. Among the theories put forward to explain the origins of the American man, the most famous affirms that *Homo sapiens* crossed the Bering Strait, having migrated from Africa 150.000 BCE, eventually occupying, at the end of the Pleistocene and the beginning of the Holocene, the last great landmass of the Earth: the Americas. The genetic mapping of haplogroups may be a positive evidence for that hypothesis. But if primitive man spread throughout the Americas, one needs to know who the central Brazilian Cerrado inhabitants were, whose skeletal material was found in various archeological sites. Dated material found in archeological sites point to more than 7.000 years ago. In order to know who were those people, we need to classify them into haplogroups. The first step is the collection of DNA, which is difficult because of contamination and bad weather in the cerrado. Once bones and teeth were provided, the search for a protocol for efficient DNA extraction began, going through countless trials and modifications of existing methods. More than one hundred extraction trials were done, finally concluding an adapted protocol with greater amounts of certain substances, which was used to extract DNA from 32 bone and tooth samples collected in various archeological sites. The extracted material was quantified and presented to PCR for the amplification of the ZFX/Y gene, having as a control DNA extracted from peripheral human blood through NaCl technique, after it was proved that they were human bones and teeth. Having established an efficient alternative protocol for DNA extraction, the task of sequencing and identification of primitive peoples of the central Brazilian Cerrado is made easier.

Keywords: Genetic, Archeology, DNA, Human, Protocol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Escavações de Herculano, 1782	17
FIGURA 2 – Beríngea	20
FIGURA 3 - Rotas prováveis das primeiras dispersões do homem	20
FIGURA 4 - Rotas de migração pelo continente Americano	21
FIGURA 5 - Ossos de tigre dente-de-sabre	23
FIGURA 6 - Crânio humano- escavações na região de Lagoa Santa	23
FIGURA 7 - DNA humano	28
FIGURA 8 - Genoma mitocondrial humano	29
FIGURA 9 - Mapa da distribuição e migração do mtDNA	33
FIGURA 10 -. Fragmento de corpo de costela.....	40
FIGURA 11 -. Falange proximal Direita	40
FIGURA 12 - Porção distal da clavícula Direita	40
FIGURA 13 - Dente 2º molar.....	40
FIGURA 14 - Porção medial da fíbula Direita	40
FIGURA 15. Processo espinhoso da vértebra.....	41
FIGURA 16.. Costela porção posterior.....	41
FIGURA 17 - Fragmento de vértebra.....	42
FIGURA 18. Maléolo lateral, fíbula Direita.....	42
FIGURA 19..Fragmento mastoideo Esquerdo.....	42
FIGURA 20 . Maléolo medial tibia Direita.....	42
FIGURA 21 Fragmento proximal úmero Direito.....	42
FIGURA 22 Fragmento medial tibia Direita.....	43
FIGURA 23 Fragmento posterior de costela.....	44
FIGURA 24 Dentes 2º e 3º molar.....	44
FIGURA 25 Dentes 1º Pré-molar e 1º Molar.....	45
FIGURA 26 Fragmento de crânio Parietal Esquerdo.....	45
FIGURA 27. Fragmento proximal de Ulna.....	45
FIGURA 28. Protuberância do Mento E. c/ dente 1º Molar.....	46
FIGURA 29..Fragmento de Fíbula Direita	46
FIGURA 30 Fragmento proximal tibia Direita.....	46
FIGURA 31 Fragmento proximal de metacarpo -.....	47
FIGURA 32 - Fragmento de osso longo	47

FIGURA 33 - Cadinho de porcelana	50
FIGURA 34 - Ossos acondicionados após moagem em cadinho	50
FIGURA 35 - Gel de eletroforese de extração sem sucesso	62
FIGURA 36 - Gel de eletroforese de extração com kit IQ-PROMEGA modificado	62
FIGURA 37 - PCR para amplificação do gene ZFX/Y.....	65

LISTA DE FICHAS TECNICAS

FICHA TECNICA 1 – AMOSTRAS GO-Ja 01.....	39
FICHA TECNICA 2 – AMOSTRAS GO-Ja 03	41
FICHA TECNICA 3 – AMOSTRAS GO-Rs 01	42
FICHA TECNICA 4 – AMOSTRA VALE DOS SONHOS	43
FICHA TECNICA 5 – AMOSTRAS GO-Pa 64	44
FICHA TECNICA 6 – AMOSTRAS OLHOS D'ÁGUA	45
FICHA TECNICA 7 – AMOSTRAS SENHORINHA DA CRUZ.....	46
FICHA TECNICA 8 – AMOSTRAS CANGAS I.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA I: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POR INSTITUIÇÃO	48
TABELA II: SEQÜÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO PRIMER ZFX/Y	58
TABELA III: PROTOCOLO DE TERMOCICLAGEM PARA AMPLIFICAÇÃO DOS PRIMERS ZFX/Y.....	59
TABELA IV: PROTOCOLO PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>ZFX/Y</i> (DNA AMOSTRA: SANGUE PERIFÉRICO)	59
TABELA V: PROTOCOLO PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>ZFX/Y</i> (DNA AMOSTRA: OSSOS E DENTES)	60
TABELA VI : RESULTADO DE QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO	63

LISTA DE ABREVIATURAS

A	- Adenina
ABPB	- Associação Brasileira de Pesquisa e Cultura
Al³⁺	- Alumínio (13 prótons / 10 elétrons)
AP	- Antes do Presente
BA	- Bahia
C	- Citosina
CIB	- Comitê Internacional de Bioética
CNPq	- Conselho Nacional de Pesquisas
C14	- Carbono 14
D-Loop	- <i>Displacement Loop</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DTT	- Dithiothreitol
EDTA	- <i>Ethlenediamine Tetraacetic Acid</i>
Fe	- Ferro
Fig.	- Figura
G	- Guanina
H	- cadeia pesada (mtDNA)
HV – I	- Região Hipervariável I
HV – II	- Região Hipervariável II
IGPA	- Instituto Goiano de Pré-história e Antropologia
Km	- quilometro
Km²	- quilometro quadrado
L	- cadeia leve (mtDNA)
m	- metro
M	- mol
mg	- miligrama
MGene	- Mestrado em Genética
mL	- mililitro
mm	- milímetro
Mn	- Manganês
mtDNA	- Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
NaCl	- Cloreto de Sódio

°C	- Grau centígrado
PAG	- Programa Arqueológico de Goiás
pb	- pares de bases
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	- Reação em Cadeia de Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pg	- página
pH	- potencial de Hidrogenio ionico
PRONAPA	- Programa Nacional de Pesquisas Arqueológicas
PUC	- Pontifícia Universidade Católica
RJ	- Rio de Janeiro
RNA	- Ácido ribonucleico
RPM	- Rotações por minuto
RS	- Rio Grande do Sul
SDS	- Dodecil Sulfato de Sódio
SNP	- <i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
STR	- <i>Short Tandem Repeats</i>
T	- Timina
TA	- Temperatura ambiente
TE	- Tampão de lise
TM	- <i>Trade Mark</i>
Tris-HCl	- Tris-aminometanohidrocloreto
UCG	- Universidade Católica de Goiás
UFGo.	- Universidade Federal de Goiás
UFPa	- Universidade Federal do Pará
Un	- Unidade
UNESCO	- <i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
UNISINOS	- Universidade Vale dos Sinos
UTM	- <i>Universal Transverse Mercator</i>
UV	- Ultravioleta
VDS	- Sistema de Video Documentação
μ	- micro
μL	- microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 ARQUEOLOGIA	16
1.1.1 Definição	16
1.1.2 Histórico	16
1.1.3 Arqueologia Contemporânea.....	17
1.1.4 Ocupação do Continente Americano pelo Homem	19
1.1.5 Arqueologia Brasileira.....	22
1.1.6 Arqueologia do Brasil Central.....	24
1.2 BIOMA CERRADO.....	25
1.3 IDENTIDADE.....	25
1.4 GENÉTICA	26
1.4.1 Definição	26
1.4.2 Histórico	26
1.4.3 DNA	27
1.4.4 Mitocôndrias.....	28
1.4.5 DNA Mitocondrial.....	28
1.4.6 Extração de DNA.....	30
1.4.7 Eletroforese.....	31
1.4.8 Reação em Cadeia de Polimerase – PCR	31
1.4.9 Haplótipos / Haplogrupos	32
1.5. GENÉTICA E ARQUEOLOGIA.....	32
2 JUSTIFICATIVA	35
3. OBJETIVO	36
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	36

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1 AQUISIÇÕES DE AMOSTRAS	37
4.2 COLETA DE MATERIAL ÓSSEO.....	38
4.3 PREPARO DO MATERIAL PARA EXTRAÇÃO DE DNA	49
4.4 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	50
4.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	58
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE DNA	58
4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	58
5 RESULTADOS	61
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS	70
ANEXO	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 ARQUEOLOGIA

1.1.1 Definição

Originado do grego *Archaios*=antigo, passado e *Logos*=estudo, a arqueologia é uma Ciência que estuda a cultura material das sociedades passadas, e tem por objetivo buscar compreender a estrutura, funcionamento e processos de mudanças das sociedades pretéritas, estudando, analisando, interpretando e contextualizando os restos materiais gerados e descartados por esses povos (SOUZA, 1997).

Como ciência possui caráter multidisciplinar atuando em conjunto com outras áreas de conhecimentos como antropologia, geologia, geomorfologia, história, dentre outras. Sendo assim, por meio da recuperação e interpretação do passado, cabe ao arqueólogo uma permanente reflexão sobre seu grau de envolvimento, suas ideologias e condicionamentos evitando-se o comprometimento científico de suas pesquisas (LIMA, 1988).

1.1.2 Histórico

O surgimento da arqueologia data da época do feudalismo, quando as grandes mudanças econômicas marcaram o fim do sistema feudal na Itália, levando os intelectuais da Renascença a se voltar para a literatura, refletindo os interesses da nobreza ascendente e da burguesia de cujo patrocínio, segundo TRIGGER (2004), dependiam. Houve, com o tempo, uma dicotomia entre o descrito e a realidade da vida social e cultural da antiguidade clássica. Eruditos renascentistas constataram que épocas diferentes determinavam padrões diferentes. O apreço da antiguidade clássica, objeto de interesse de mercadores ricos e da nobreza italiana, não ficou restrito à literatura, incorporando à nobreza ascendente e à burguesia a posse das artes e arquitetura. Ciríaco de Ancona fez inúmeras viagens pelo mar mediterrâneo e pela Grécia com o objetivo de coletar dados de monumentos antigos. Nestas viagens reproduziu centenas de inscrições, desenhou monumentos, colecionou livros, moedas e obras de arte. Diversos Papas, Cardeais, nobres e burgueses seguiram a busca daquelas obras, porém sem se preocupar com o contexto em que eram feitas as descobertas e muito menos como eram coletadas. A busca incessante por objetos de valor levou, na primeira metade do século

XVIII, às escavações de Herculano (FIGURA 1) e Pompeia, até então íntegras, com o intuito de caça aos tesouros (TRIGGER, 2004).

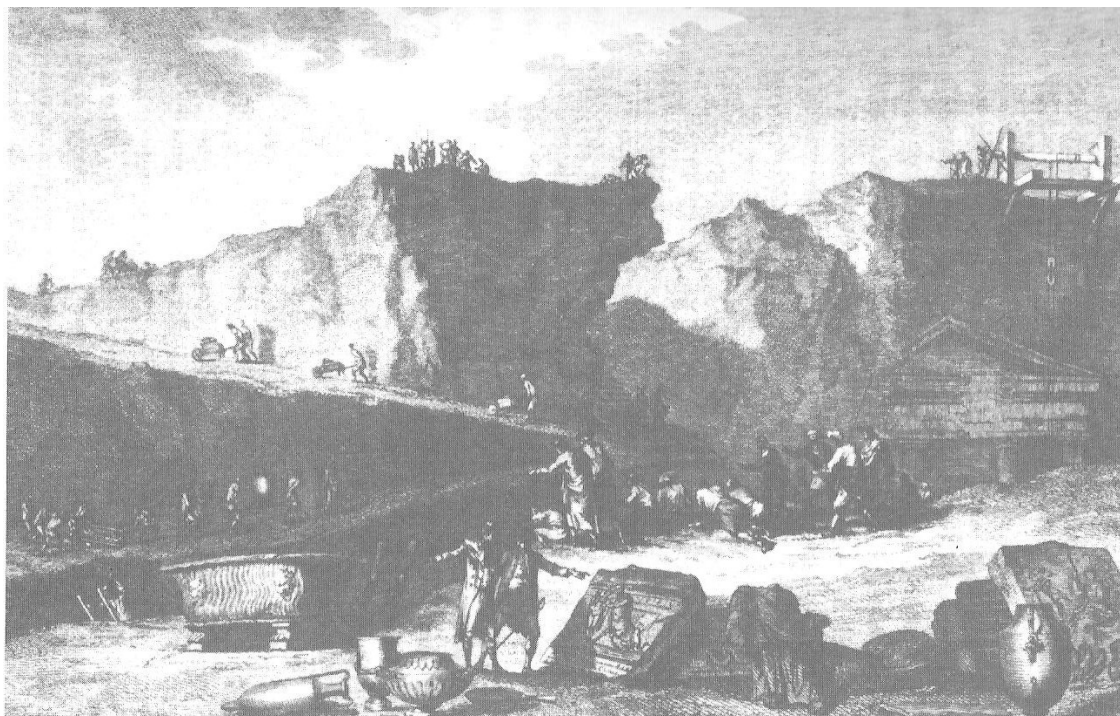


FIGURA 1 - Escavações de Herculano, 1782

Voyage pittoresque et description de Naples de Sicile, Paris.

Fonte: TRIGGER: 2004.

1.1.3 Arqueologia Contemporânea

No século XIX, abandona-se aos poucos o colecionismo e antiquarismo que na realidade eram crônicas repletas de ufanismo. A invenção de técnicas de datação para os achados arqueológicos torna possível o estudo dos mesmos de uma forma científica, surgindo inicialmente na Escandinávia a arqueologia pré-histórica que assume ao lado da arqueologia clássica importante papel no estudo do desenvolvimento humano. Entretanto, é na França e Inglaterra que surgem os primeiros estudos de Arqueologia Paleolítica absorvida pelas discussões entre criacionistas e evolucionistas, centro das atenções dentro e fora da academia, em virtude da publicação, em 1859, por Charles Darwin de “A origem das espécies”. Em 1959, Joseph Caldwell publica na revista *Science*: “A Nova Arqueologia Norte-Americana”, na qual enfatizou a crescente valorização da ecologia e dos padrões de assentamento, bem como o interesse pelo processo cultural. Caldwell também apoiou o neoevolucionismo segundo o qual o básico, para arqueólogos, seria entender que, num processo cultural, fatos culturais diferentes têm importâncias diferentes, no que se refere a mudanças naquela cultura.

Os conceitos do referido artigo, com o acréscimo de novos elementos, por Lewis Binford, foram transferidos para as novas gerações de arqueólogos surgindo aí uma Nova Arqueologia (processualismo). Binford publica ainda os artigos “*Archeology as Anthropology*”, e “*Archaeological systematics and the study of culture process*”, em 1962 e 1965 respectivamente, acabando de delinear uma nova arqueologia, redesenhando as novas tendências e sendo seguido por arqueólogos em todo o mundo. (TRIGGER, 2004).

Surgem teorias arqueológicas que implicam em motivações da prática, do contexto sociocultural e da problemática de interpretação arqueológica. Num sentido amplo, todos os arqueólogos estariam de acordo com teorias gerais como as relacionadas à evolução social e biológica. Entretanto vários conceitos foram considerados teóricos e às vezes confundidos com o método. As novas teorias e procedimentos metodológicos motivam os arqueólogos a escavar em determinados locais, e os métodos são as maneiras como são feitas as escavações. As provas disponíveis e os graus de importância são estudados por critérios teóricos (TRIGGER, 2004).

Surge o difusionismo, antropologia difusionista que teve início no século XX, veio em resposta ao evolucionismo sendo sua contemporânea. Não admitia a reta constante e ascendente cultural, defendida pelos evolucionistas. A cultura para o difusionismo era um mosaico de traços advindos de outras culturas precursoras com várias origens e histórias. Havia três difusionistas radicais: Rivers (o primeiro a declarar guerra contra o evolucionismo), W. Perry e Elliot Smith, discípulos de Rivers. Explicavam as diferenças e semelhanças culturais apelando a convenientes combinações de migrações, adições e mesclas. O difusionismo tem respaldo científico, a partir do momento que suas inferências são baseadas em achados arqueológicos e pesquisas etnográficas, porém muitas de suas ideias foram derrubadas pelas comprovações arqueológicas de que no mundo antigo as ideias originais em diferentes culturas eram mais frequentes do que hoje em dia. O difusionismo propunha que as diferenças e semelhanças culturais eram consequência da tendência humana para imitar e absorver traços culturais, ao contrário do que pensavam os evolucionistas que acreditavam que a humanidade possuía uma "unidade psíquica". Franz Boas (1858-1942), nos EUA, entre 1915-1930 defendeu uma corrente denominada Histórica. Rejeitou o evolucionismo e defendeu essa visão histórica da cultura porque era a única capaz de permitir compreender a situação e as características de qualquer sociedade. Boas se preocupava com a individualidade e a diversidade das culturas (ERIKSEN *et al*, 2007).

No final do século XIX e início do século XX, ressaltou-se também arqueólogos como Gustaf Kossinna, Gustav Oscar Montelius, Vere Gordon Childe e, mais recentemente,

Colin Renfrew trabalhando cultura, etnicidade e nacionalismo, enfatizando a arqueologia Histórico-Culturalista na qual, dos vestígios materiais do passado, pretende-se determinar-lhes as funções e classificá-los em tipologia, ou seja, saber o que o homem tinha em mente ao fazer determinado objeto. É a arqueologia histórico-culturalista pretendendo definir culturas, seus contatos e influências (ALARCÃO, 1996).

Surge o pós-processualismo. O pensamento pós-processual penetrou de tal forma na arqueologia que modificou muitos dos paradigmas até dos mais positivistas, e inspirou a criação de mudanças no processualismo, a Arqueologia Cognitivo-Processual, em meados da década de 1990. Seus defensores ainda são vistos com certa desconfiança pela comunidade mais tradicional e tentam colaborar em projetos plurais e diversificados. Por haver certo antagonismo entre as duas correntes atualmente há um esforço para diminuição de hostilidades entre as duas correntes (TRIGGER, 2004, ALARCÃO, 1996). Ressalta-se que as teorias são propostas que devem ser debatidas, aceitas ou rejeitadas. O pensamento teórico se torna difícil porque requer do arqueólogo pensar por si mesmo (JOHNSON, 2000).

1.1.4 Ocupação do Continente Americano pelo Homem

O início da ocupação pela espécie humana do continente hoje denominado “Americano” (Américas do Norte, Central e do Sul) ocorreu no final do pleistoceno, sendo considerado o último grande episódio de ocupação territorial do planeta. O homem já havia se dispersado por todo o Velho Mundo, terminando a época das grandes migrações e dispersões do *Homo Sapiens* iniciada, possivelmente, no continente Africano há aproximados 150 mil anos antes do presente (A.P). (LIMA, 2006).

Várias teorias de migração e ocupação das Américas são discutidas, sendo considerada, no momento, a entrada principal mais viável o Estreito de Behring. Com o nível dos oceanos cerca de 120 a 150m abaixo do nível atual, a região da Beringea, de águas pouco profundas, tornou-se uma extensa planície com aproximadamente 1500 km de largura, unindo o atual Continente Asiático ao Continente Americano, tendo o oceano Ártico ao norte da planície e o Pacífico ao sul. Essa região que se convencionou denominar de Beríngea (FIGURA 2) compreende não somente a plataforma emersa como também o nordeste da Sibéria, o Alaska e Yukon do lado noroeste do Canadá (LIMA, 2006).



FIGURA 2 – Beríngia: Nordeste da Sibéria, Alaska e extensão da região de águas pouco profundas.
 Fonte: www.creativecommons.org.br - FERNANDO KITZINGER DANNEMANN em 22/05/2011.

Grupos humanos dispersos pelo continente asiático teriam avançado em direção ao Leste Siberiano penetrado no Continente Americano, iniciado uma migração com grande dispersão (FIGURA 3). Tal fato pode ter ocorrido quando, no final do Pleistoceno a glaciação de Wurm fez baixar o nível das águas nos oceanos por retenção nas grandes geleiras (LIMA, 2006).

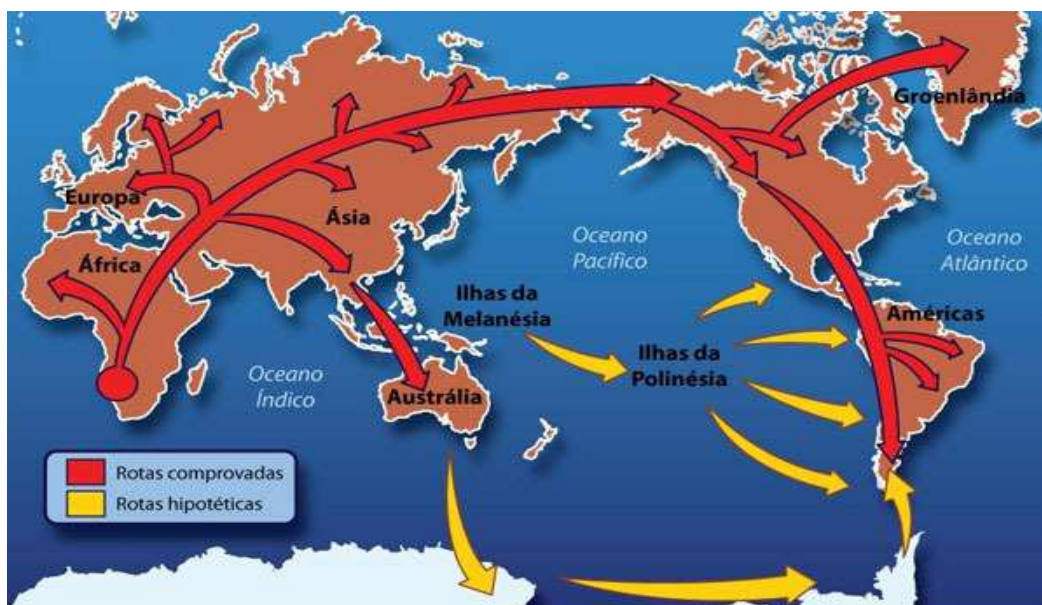


FIGURA 3 - Rotas prováveis das primeiras dispersões do homem
 Fonte: <http://revistaescola.abril.com.br>, em, em 22/05/2010

Pesquisas realizadas por Dikov na região siberiana de Chukotka e Kancharka evidenciaram aproximadamente 200 sítios arqueológicos, porém, até o momento, os sítios mais antigos a oeste da Beríngia são datados de 14 a 11 mil anos A.P. e a leste de 11,5 mil anos A.P. No território americano, teoricamente, três (03) rotas poderiam ter sido seguidas (FIGURA 4) em busca de caça e coleta de alimentos, duas delas em direção sul, possivelmente corredores entre as geleiras que desembocavam nas pradarias centrais da atual América do Norte onde existem sítios com datação de 11,5 a 11 mil anos A.P., basicamente de matança e descarnamento de animais de grande porte, onde aparecem ossos da extinta megafauna, equipamentos de captura e processamento como pontas acanaladas, facas, raspadores e furadores (LIMA, 2006).

Uma terceira via seria pela borda do Pacífico, trajeto difícil, hoje aceitável pelas pesquisas recentes que atestam estar o litoral do Alaska e Columbia Britânica já em degelo entre 14 a 13 mil anos A.P. A comprovação dessa passagem é difícil, pois com o degelo o mar elevou-se ao nível atual (LIMA, 2006; FLADMARK, 1979).



FIGURA 4: Rotas de migração dentro do continente Americano

Fonte:<http://revistaescola.abril.com.br>, em 25/06/2011

Entre 8.000 a 5.000 anos A.P., o ambiente volta a assemelhar-se ao que hoje conhecemos e aparecem novas formas de povoamento, subsistência e de tecnologia. O mar volta ao nível atual, as florestas substituem os campos, desaparece a ligação da Beríngia (MEGGERS, 1979).

1.1.5 Arqueologia Brasileira

O Brasil é um país de grande extensão territorial com 8.511.965 Km², possui uma área de costa marítima de 7.408 km. Quase na sua totalidade, o país apresenta um clima semi-tropical ou tropical. Na região norte, a densa floresta da Bacia Amazônica inserida na bacia hidrográfica homônima recobre metade do país (FUNARI, 2008).

É nesse cenário tropical que, após a chegada dos conquistadores, iniciam-se os primeiros relatos descritivos da fauna, da flora e dos povos que aqui habitavam (indígenas) em forma de cartas e crônicas (SOUZA, 1991).

José de Anchieta registrou os sambaquis¹ no litoral do Rio de Janeiro em suas anotações e seguem-se as crônicas e narrativas dos naturalistas-viajantes como “Histoire d’un fait em la there du Brésil” de Jean de Lery que, para Lévi-Strauss, autor de “Tristes Trópicos”, foi o primeiro exemplo de etnografia participatória e de importância. Foram inúmeros os textos do século XVI sendo o de maior importância na época o “Tratado Descritivo do Brasil” no qual Gabriel Soares de Souza descreveu os sambaquis e a prática de queimá-los para se obter cal para a construção das primeiras casas coloniais (SOUZA, 1991).

Na primeira metade do século XIX, surgem os “primeiros arqueólogos brasileiros” em busca das cidades perdidas, todos autodidatas, fazendo suas pesquisas ao lado dos naturalistas viajantes. As questões em voga eram muitas como evolucionismo, criacionismo, poligenismo (variedade de origens na espécie humana), monogenismo (origem única de um tipo primitivo), origens dos índios e várias outras. Vários países enviaram seus estudiosos e havia pesquisadores em várias partes do território brasileiro como o Príncipe Adalberto da Prússia, a Comissão Científica Brasileira sob a ordem de D. Pedro II e o naturalista Dinamarquês Peter W. Lund que, embora sem documentos comprobatórios contribuiu decisivamente para o surgimento da arqueologia brasileira (SOUZA, 1991).

Peter Lund, ao pesquisar as grutas do Vale do Rio das Velhas, MG, encontrou grande quantidade de restos da fauna pleistocênica (FIGURA 5) e restos humanos (FIGURA 6) o que sugeria a antiguidade do homem no continente americano, fato posteriormente comprovado (SILVA, 2006).

Vale ressaltar a importância da chamada “Grande Região Arqueológica de Lagoa Santa” onde Lund efetuou suas pesquisas. São complexos de grutas com inúmeras datações de radiocarbono em torno de nove a 10 mil anos A.P. e ainda com grande potencial de pesquisa.

¹Sambaqui do tupi= tamba’ki – amontoado de conchas

Toda a coleção de material pré-histórico retirado da região de Lagoa Santa por Peter Lund foi, no final do século XIX, enviada à Dinamarca onde se encontra acessível a pesquisadores internacionais (SOUZA, 2006).



FIGURA 5 – Ossos de tigre dente de sabre, megafauna do cerrado (pleistoceno).

Fonte: <http://ultimaparada.wordpress.com>, em 24/05/2011



FIGURA 6- Crânio humano. Escavações na região de Lagoa Santa.

Fonte: <http://ultimaparada.wordpress.com>, 24/05/2011

Em 1964 foi criado o Programa Nacional de Pesquisas Arqueológicas (PRONAPA) com duração prevista para cinco anos (1965/1970) com o apoio do *Smithsonian Institution of Washington* e *Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional*. Foram seus coordenadores os arqueólogos Clifford Evans e Betty Meggers (FUNARI, 1998).

O PRONAPA é considerado por alguns arqueólogos como o início da profissionalização de pesquisadores arqueólogos no Brasil. É considerado um marco na arqueologia brasileira, pela padronização metodológica e uniformização das técnicas e métodos de pesquisa no Brasil (SOUZA, 1991),

O programa baseava-se em coletas superficiais em campo para que se pudessem estabelecer padrões cronológicos a partir de seriações, reunindo-as em fases e tradições culturais. (DIAS, 1995).

O crescimento de arqueologia Brasileira continuou, após o término do PRONAPA, e no contexto teórico atual enfatiza a epistemologia da ciência como o predomínio das visões críticas, o relativismo e a hermenêutica. Os arqueólogos atuais buscam construir uma arquitetura intelectual, teórica, de superação de dificuldades e a produção intelectual da arqueologia brasileira apresenta sucessos semelhantes à arqueologia mundial. Apresenta um desenvolvimento constante buscando abrir novos horizontes aceitando a pluridisciplinaridade, hoje, necessária ao desenvolvimento de uma ciência. (KERN, 1999).

1.1.6 Arqueologia do Brasil Central

Os estados do Centro Oeste não se inseriram no PRONAPA, sendo posteriormente criada em Brasília a Associação Brasileira de Pesquisa e Cultura (ABPC), quando Carlos E.P. Milss apresentou a Pedro Agostinho (BA), Pedro Ignácio Schmitz (RS) e Alfredo Mendonça de Souza (RJ) os sítios arqueológicos do Planalto Central, despertando interesses, o que culminou com a criação, em 1972, do Gabinete de Arqueologia na Universidade Católica de Goiás (UCG)², em convênio com o Instituto Anchieta de Pesquisas do Rio Grande do Sul, Universidade Vale dos Sinos (UNISINOS). Em 1975, o então Gabinete de Arqueologia torna-se Instituto Goiano de Pré-História e Antropologia (IGPA), sendo as pesquisas arqueológicas realizadas com o apoio e recursos financeiros de ambas as instituições e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (SOUZA, 1991).

²Atual Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC Goiás.

Na década de 70, vários sítios arqueológicos de importância para a Arqueologia Brasileira foram catalogados e pesquisados no Brasil Central e em vários deles foram encontrados enterramentos humanos (SCHMITZ, 1982).

1.2 BIOMA CERRADO

Localizado principalmente no Planalto Central do Brasil, o solo do Bioma Cerrado ocupa 24% do território nacional, abrange a totalidade do Distrito Federal e parte do território dos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, Rondônia, São Paulo e Tocantins. É a segunda maior formação vegetal do país, perde apenas para a Amazônia que é a área mais rica do mundo em biodiversidade. No ambiente do Cerrado, foram catalogadas mais de 1.500 espécies animais, formando o segundo maior conjunto animal do planeta. (5% de flora e da fauna mundiais). É no Planalto Central Brasileiro e no Bioma Cerrado que as três maiores bacias hidrográficas da América do Sul, Franciscana, Amazônica e Paraná, têm suas nascentes. (SOUZA 2011).

Originado de várias camadas do Terciário, os solos do Bioma Cerrado são geralmente de cor avermelhada, porosos e intensamente lixiviados. Predomina a fração de areia, seguida de argila e silte. Praticamente não tem capacidade de retenção de água. São bastante ácidos com pH que varia de 4 a 5,5. Sua forte acidez se deve em parte aos altos níveis de Al^{3+} , de íons Fe e Mn contribuindo para sua toxidez que é devida ao alumínio e baixos teores de cátions básicos (OLIVEIRA, 2005).

1.3 IDENTIDADE

De acordo com Gardner (1986), todo indivíduo da espécie humana possuiria um perfil genético único, exceção apenas a gêmeos monozigóticos que compartilhariam o mesmo genótipo. Nos dias atuais, pesquisadores como Charles Lee do Laboratório de Pesquisa Citogenética em Brigham e no Hospital da Mulher / *Harvard Medical School*, Carl Bruder et cals, geneticistas da *University of Alabama, Birmingham*, discordam, baseados no fato de que as pessoas podem apresentar variação no número de cópias de genes, mesmo sendo gêmeos monozigóticos, fato de grande relevância para a evolução humana.

Identidade Genética, juridicamente, corresponde ao genoma de cada ser humano e ao direito de conhecimento de suas origens genéticas garantido em normas elaboradas pelo Comitê Internacional de Bioética (CIB) da UNESCO (CONSALTER, 2009).

No Brasil o direito ao conhecimento das origens, do estado de filiação ou, ainda, direito ao conhecimento da ascendência genética é garantido pela Constituição Federal do Brasil (1988) que em seu art. 1º contempla a dignidade humana. Posteriormente, leis complementares citaram a prevalência dos direitos humanos inclusive do conhecimento de sua Identidade Genética (PETTERLE, 2006).

Há um vínculo estreito entre identidade, espaço e temporalidade. É fundamental, na construção da identidade relacionar o espaço e reconhecer a importância de território de pertencimentos. A importância da temporalidade se dá porque a conformação das identidades coletivas está estreitamente relacionada com o passado comum e seus valores (WASSERMAN, 2001).

Compreensão de identidade, para a socioantropologia, implica em transcender barreiras de ideologias, de interesses de classes, da contextualização histórica e de outros fatores. Deve-se buscar a Identidade, no tempo e no espaço, pelos referenciais que a caracterizam (MACHADO, 1998). Segundo Menezes (1984), o suporte fundamental da identidade é a memória, que retém informação, conhecimento, experiência, tanto em nível individual quanto social dando-lhe lógica e inteligibilidade.

1.4 GENÉTICA

1.4.1 Definição

Conforme Klug (2010), Genética é um ramo da biologia relacionado ao estudo da hereditariedade. A ciência da genética une toda a biologia funcionando como seu centro. Em 1905, Willian Bateson deu a essa ciência em desenvolvimento o nome de Genética a partir de uma palavra grega “genetikos” que significa “capaz de procriar” (GARDNER, 1986).

1.4.2 Histórico

As primeiras pesquisas mencionadas referem-se aos trabalhos de Gregor Mendell, publicados em 1866, realizados com ervilhas de jardim, de características altamente estatísticas. Posteriormente (1900) Hugo de Vries, na Holanda, Carl Correns, na Alemanha e Eric von Tschermak-Seysenegg, na Áustria, pesquisando várias plantas, inclusive ervilhas, confirmaram, isoladamente, os trabalhos de Mendell. No final do século XIX, Wilhelm Roux postulou que os cromossomos, dentro dos núcleos das células, eram os portadores dos fatores

hereditários. O único modelo imaginado para a transmissão daqueles fatores era que o núcleo da célula deveria conter estruturas invisíveis, enfileiradas, que se dividiam quando a célula se dividia. Johannsen, botânico dinamarquês, estudando a influência da hereditariedade e do ambiente, nas plantas, utilizou pela primeira vez a palavra “gene” proveniente do termo Darwiniano “pangene”³. Morgan e colaboradores, estudando a mosca de fruta, *Drosophila Melanogaster*, teorizaram o gene como uma unidade do cromossomo. Posteriormente Muller promoveu a fusão da Citologia com a Genética constituindo a “Citogenética” (GARDNER, 1986).

1.4.3 DNA

Kossel, bioquímico alemão, evidenciou a existência de dois ácidos nucleicos: o ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). O DNA é composto quimicamente por um açúcar denominado de desoxirribose, um fosfato e quatro bases nitrogenadas: Adenina (A) e Guanina (G), com estrutura de anel duplo, característica das purinas e ainda Citosina (C) e Timina (T), com estrutura em anel de um tipo denominado de pirimidina. Esses componentes arranjados em grupos denominados de nucleotídeos são compostos de um grupamento fosfato, uma molécula de desoxirribose e uma das quatro bases. São polinucleotídios, macromoléculas formadas pelo encadeamento de nucleotídeos. O DNA é encontrado principalmente no núcleo das células e nas mitocôndrias e cloroplastos (GRIFFITHS et al, 2001).

Tendo por base os estudos de difração de raios-X, em 1953, Watson e Crick propuseram a estrutura helicoidal do DNA. É arranjado em uma estrutura chamada de cromossomo e ocorre nas células somáticas aos pares, homólogos, sendo 23 pares na espécie humana (FIGURA 7). Os cromossomos que formam pares (mesmos *locus* gênicos) são denominados de homólogos (ALBERTS, 1997). Neste caso, genes alelos idênticos, diz-se haver homozigose. Quando não há esta condição de parilha diz-se que os genes são heterozigóticos (ALBERTS, 1997; GRIFFITHS et al, 2001).

³pan=abrangente e genesis=nascimento .



FIGURA 7 – DNA humano

Fonte: <http://biologiasoberana.webnode.com.br>, em 14/09/2011

1.4.4 Mitocôndrias

As mitocôndrias são corpúsculos em forma de bastonetes ou esféricas, relacionados com a respiração celular e que estão imersos no citoplasma sendo encontrados em todas as células de eucariotas anaeróbicos. A quantidade de mitocôndrias por células sofre variação de acordo com as necessidades energéticas das células e uma única célula pode possuir mais de 5.000 cópias dessa organela. Formadas pela divisão de outras mitocôndrias pré-existentes no citoplasma, o processo acontece graças à existência de DNA em seu interior, DNA esse mitocondrial (mtDNA), circular, com regiões codificantes e uma região variável denominada de controladora ou alça D, sendo esta utilizada para identificação humana (JOBIM *et al*, 1999; STRACHAN e READ, 2002).

1.4.5 DNA Mitocondrial

O genoma mitocondrial humano foi sequenciado em 1981, sua sequência nucleotídica já foi totalmente determinada. Em 1986 criou-se o projeto “Genoma Humano” a fim de se identificar o máximo de genes possíveis (BROWN, 1998). Somente 10% de sua totalidade

não é codificante, seu genoma é haploide, de herança estritamente materna e não está submetido ao processo de recombinação (CANN, 1987; GILES, 1980).

Possui formato circular, tamanho de 16.569 pares de base (pb), foi completamente sequenciado em 1981 por Anderson e colaboradores que indicaram a todos os genes mitocondriais, suas funções e seus produtos gênicos. As fitas de distribuição do mtDNA têm distribuição assimétrica de Citosinas e Guaninas o que forma uma cadeia pesada (H) e outra leve (L) (FIGURA 8). A transcrição de cada fita se dá a partir de um ponto localizado na região controle, de grande importância forense por ser uma região hipervariável e pequena para ser abordada por meio de sequenciamento por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (GOES, 2003).

As regiões hipervariáveis ou polimórficas de função estrutural são de importância para a genética forense. Têm sido toleradas ao longo da evolução humana, pois além de função estrutural não possuem função fisiológica definida (VOGEL e MOTULSKY, 2000).

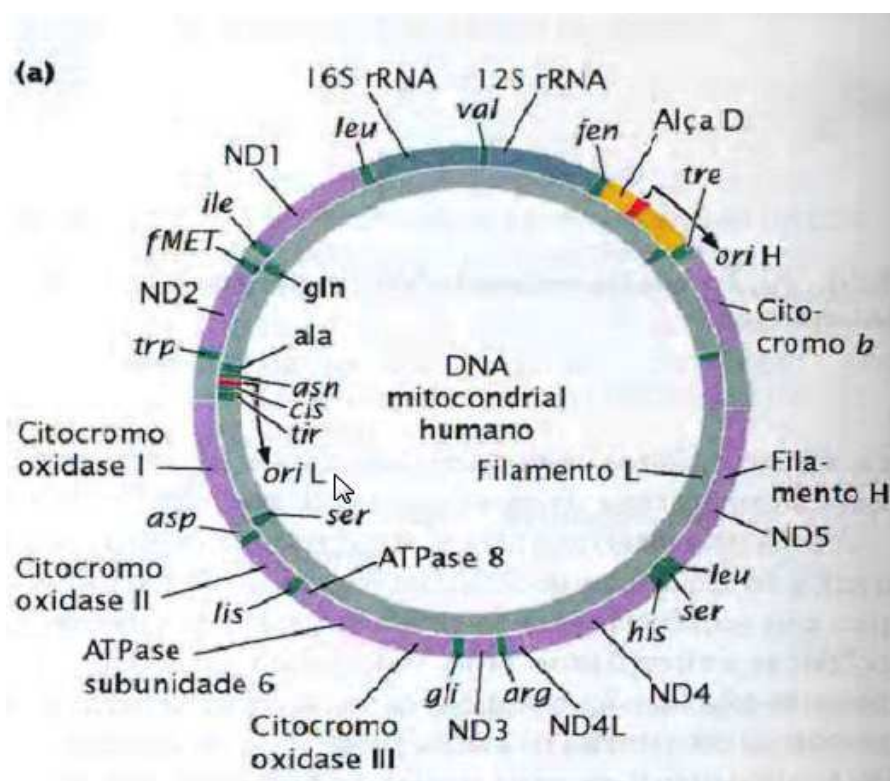


FIGURA 8 - Genoma mitocondrial humano. 16.569 pb, altamente econômico em sua organização. Possui dois círculos, o externo representa o filamento pesado (H), e o círculo interno representa o filamento leve (L).

Fonte: http://www.ufpe.br/biolmol/genomas_organelas.htm, em 16/08/2011

O polimorfismo genético caracteriza-se pela presença de diferentes versões de uma sequência de DNA (alelos), em um determinado local cromossômico (locus) e encontra-se em uma frequência superior a 1% nos cromossomos da população em geral. Diferente do polimorfismo, o termo mutação se refere a qualquer mudança na sequência de nucleotídeos ou DNA e ocorre em frequência inferior a 1% da população (WILLARD, 2002).

Normalmente se analisa a região controle por sua grande variabilidade. Sua medida é aproximadamente 1.100 pb dividindo-se em duas regiões – Região Hipervariável I (HVI) e Região Hipervariável II (HVII). A região controle é responsável pela regulação da replicação e da transcrição de todo o mtDNA. A replicação tem início nesta região e é realizada por deslocamento de uma fita em relação à outra, formando uma alça, denominada *Displacement Loop (D-Loop)*. Na região controle, são verificados os polimorfismos do mtDNA (UPHOLT e DAWID, 1977). A estrutura *D-Loop*, onde há formação momentânea de fitas simples pode influenciar o padrão de mutação pontual (REYES, 2002).

Para estudo de polimorfismos do mtDNA, o método mais utilizado é a amplificação da região controle por meio de uma técnica denominada de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), podendo-se verificar inserções, deleções ou mutações em relação à sequência padrão descrita em 1981 por Anderson. A substituição do tipo transição é o polimorfismo dominante sendo a troca entre as bases T e C mais frequentes. Um estudo sobre o padrão de substituição de nucleotídeos nas regiões HVI e HVII, observou uma taxa de substituição em HVI duas vezes maior que HVII (MEYER, 1994).

1.4.6 Extração de DNA

As estruturas celulares são compostas por substâncias de diferentes propriedades químicas tornando possível a separação do DNA de outras macromoléculas, sendo que aproximadamente 90% (noventa por cento) do mesmo é de origem nuclear e apenas 1% (um por cento) é de origem mitocondrial ou de cloroplastos. Para realização de extração do DNA, existem numerosos métodos que variam em complexidade conforme sua aplicação final, estado de degradação ou inibição das proteínas intracelulares. Os métodos amplamente empregados utilizam homogeneização, solubilização com detergentes, sendo em seguida feita a desnaturação. O DNA é então separado de macromoléculas celulares contaminantes, sendo a seguir precipitado e purificado (WALKER, 1999).

1.4.7 Eletroforese

É uma técnica bioquímica relativamente simples e de grande poder informativo. Foi introduzida por Tiselius em 1937 e é amplamente usada nos estudos de Taxonomia, Bioquímica, Fisiologia e Genética Humana. Atualmente muito usada na determinação e caracterização de moléculas de ácido nucleico e, com os recentes progressos na tecnologia do DNA recombinante, mapeamento de fragmentos e sequenciamento de nucleotídeos, tem permitido avanços expressivos com maior precisão nos resultados (WALKER, 1999).

Consiste na migração de moléculas ionizadas de acordo com suas cargas elétricas e pesos moleculares. Para tal, utiliza-se um sistema tampão do gel e um sistema tampão da cuba eletrolítica na qual se encontram os eletrodos, permitindo a troca entre elétrons e íons. Podem ser usados diferentes meios como sílica gel, filtro de papel, acetato de celulose, gel de agarose e outros, de acordo com as condições e necessidades. No caso de géis, a porosidade determina o poder de resolução das bandas e também devem ser considerados o tempo, temperatura e voltagem (BRAMMER, 2001)

O uso de brometo de etídio para a detecção das bandas é feita por luminescência emitida por este corante quando na presença de luz ultravioleta. Outros métodos também podem ser empregados para se detectar bandas como radioatividade, nitrato de prata e quimioluminescência (WALKER, 1999).

1.4.8 Reação em Cadeia de Polimerase – PCR

Em 1986, Kary Mullis desenvolveu uma técnica de clonagem do DNA denominada de *Polymerase Chain Reaction (PCR)*⁴, a partir da aceleração do ritmo das pesquisas biológicas. É um método que se realiza em três etapas: desnaturar o DNA a ser clonado, podendo este ser genômico, amostra forense como cabelo, sangue, semem ou ainda restos mortais mumificados. Primeiro, um aquecimento a 95°C que desdobra a dupla fita em fita simples. Esta elevação de temperatura ocorre, geralmente, por um curto período, geralmente em torno de um minuto. Numa segunda etapa a temperatura é reduzida para um valor entre 50 a 70°C chamada de temperatura de anelamento. Neste ponto, oligonucleotídios sintéticos, iniciadores, servem como ponto de partida para novas fitas de DNA complementares. É então adicionada uma forma termoestável de DNA-polimerase, no caso, Taq-polimerase que estende os

⁴Reação em Cadeia da Polimerase

iniciadores, adicionando nucleotídeos na direção 5' a 3', produzindo uma cópia da fita dupla do DNA alvo. A temperatura considerada otimizada para tal fim fica entre 70 e 75°C (KLUG, 2010).

1.4.9 Haplótipos / Haplogrupos

A genética de populações estuda as variações de frequência alélicas nas populações humanas e entre elas os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (*Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs*) que são as trocas de bases únicas, bem como estuda as sequências curtas de repetição (*Short Tandem Repeats–STRs*) que são sequências curtas com dois a nove pares de base (pb) de comprimento. SNPs e STRs podem ser herdados, e estes sítios polimórficos, quando herdados, determinam diferentes haplótipos. Pode-se dizer então que haplótipos são blocos de variações de sequência ligados a um cromossomo e herdados como uma unidade (KLUG, 2010).

Haplótipos são classes genéticas descritas por uma sequência de DNA ou de genes que estão juntos fisicamente no mesmo cromossomo. A existência dos diferentes sítios polimórficos determina a existência de diferentes haplótipos. No sentido taxonômico, a diversidade haplotípica está relacionada com agregação ou separação de espécies próximas e no sentido ecológico pode-se relacioná-la com a pressão da seleção natural. No caso de estudo de evolução molecular, haplogrupo é então um grande aglomerado de haplótipos semelhantes (GRIFFITS, 2006).

1.5. GENÉTICA E ARQUEOLOGIA

Em 1995, Jeffreys, Brookfield e Semeor, utilizaram, pela primeira vez, a tipagem molecular de material genético de forma oficial, posteriormente também utilizada para elucidação de crimes. Nascia a Genética Forense. A partir de então, a Criminalística e a Medicina Legal ganharam uma nova técnica elucidativa no esclarecimento de delitos e na identificação humana (REMUALDO, 2005).

Os estudos populacionais e forenses contribuem com a Arqueologia na identificação de linhagens de ancestralidade, paterna pelo cromossomo Y e materna pelo mtDNA, com possibilidade de pesquisa de ascendência até ao ancestral comum a todos os *Homo Sapiens*. A incansável busca do homem moderno pelo conhecimento de sua origem terminou por criar uma associação entre a Genética e a Arqueologia o que pode levar a simulações de cenários já

desenhados no passado e testar combinações, eventos mutacionais e ainda estimar o tempo das diversas colonizações (MATSUMURA, 2008).

Na última década, têm-se criado Bancos de Dados tanto de caráter público quanto privado os quais oferecem subsídios às pesquisas de ancestralidade humana (MATSUMURA, 2008).

Com o conhecimento da estrutura do mtDNA, grandes avanços ocorreram e nos dias atuais já se pode analisar geneticamente, com êxito, restos humanos antigos e situá-los dentro do contexto da Arqueologia. A análise de variações do mtDNA permite a reconstrução das migrações das mulheres ancestrais, as divisões de haplótipos com formação dos haplogrupos e aceita-se a proposta de que o *Homo Sapiens* com a anatomia moderna, surgiu na África há aproximadamente 150 mil anos (VIGILANT, 1991).

Para identificar os haplogrupos mais antigos, os haplótipos humanos foram comparados ao mtDNA de chimpanzé. Os haplótipos africanos apresentam a maior variação, e a raiz mais profunda da árvore filogenética, da espécie humana, tem origem na África. A árvore filogenética consiste nos seguintes grupos: Africano, com três haplogrupos (L1, L2, e L3); Europeu com nove haplogrupos (H, T, U, V, W, Y, I, J, K); Asiático, com dois macrohaplogrupos, divididos em vários haplótipos e Americano com cinco haplogrupos (A, B, C, D e X). Uma vez que os haplótipos formadores de A, B, C e D contêm as características dos grupos Asiáticos, os haplogrupos Americanos, denominados grupos fundadores das Américas, teriam se originado de migrações a partir da África, passando pela Sibéria (FIGURA 9) e por consequência os povos primitivos do Bioma Cerrado do Brasil Central também seriam frutos das migrações que teoricamente tenham ocorrido (LIMA, 2006).

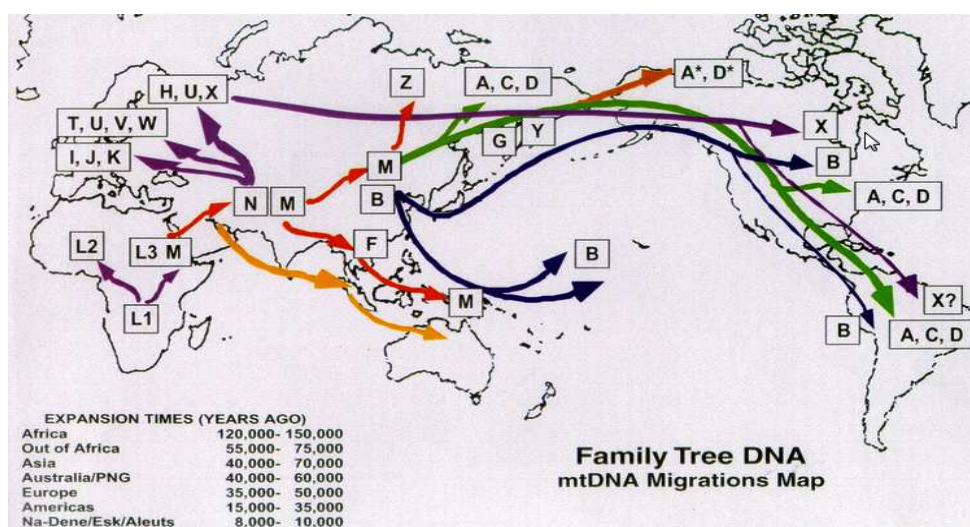


FIGURA 9- Mapa da distribuição e migração de mtDNA.

Fonte: <http://www.roperld.com/mtdna.htm>, em 18/10/2010

O crescente interesse, recente, na fusão de estudos Genéticos com Arqueologia tem levado Geneticistas e Arqueólogos a pesquisas conjuntas com o intuito de desvendar a origem e ocupação do planeta pelo homem e prevê-se que, no final da próxima década, começarão a surgir resultados desta fusão que já é denominada, extraoficialmente, de Arqueogenética (RENFREW, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Conforme teorias vigentes sobre ocupação do Continente Americano, último grande espaço global ocupado pelos *Homo Sapiens*, os primeiros povos das Américas tiveram origem na Ásia, Austrália, Malásia ou Polinésia, advindos de uma ou várias correntes migratórias e, conseqüentemente, os povos primitivos do Bioma Cerrado seriam oriundos daquelas migrações. Nas últimas décadas, a Genética tem evoluído a passos largos e nos dias atuais tem prestado uma inestimável colaboração para a compreensão e o desenvolvimento de outras ciências, complementando, ratificando ou retificando teorias já existentes. Na arqueologia, a contribuição da Genética ainda é incipiente.

Constata-se, em revisão bibliográfica, que as pesquisas arqueogenéticas se utilizaram, principalmente, de dados da Genética de Ancestralidade o que levou à identificação dos principais haplótipos fundadores, denominados de “A”, “B”, “C”, “D” e “X” presentes nos paleoíndios, povos Na-Dene, esquimós, entre outros, do extremo norte do continente Americano, bem como em vários povos Andinos.

No que tange às pesquisas no Bioma Cerrado, muito se refere às dificuldades de estudos biológicos. Possuidor de características que o tornam ácido, com pH em torno de 4 a 5, elevados níveis de íons ferro e manganês, somado às ações climáticas, próprias da região, o solo do Cerrado, rico em ácido húmico e fúlvico, atua sobre a matéria orgânica como um agente decompositor, tornando-a frágil em parte ou em toda a sua extensão, ocasionando sua extinção total. Tais características têm inibido, sem dúvida, o investimento em projetos nesse Bioma, contudo as novas tecnologias e metodologias da Biologia Molecular moderna possibilitam pesquisas em material orgânico degradado, como é o caso dos ossos dos sítios arqueológicos do Bioma Cerrado, porém ainda com poucos estudos disponíveis na literatura.

Há, portanto, necessidade de se ter um protocolo eficiente, para extração de DNA dos ossos exumados dos referidos sítios arqueológicos. Protocolo que forneça mtDNA suficiente para estudos, envolvendo Genética e Arqueologia. É necessário que o DNA extraído dos ossos encontrados nos sítios arqueológicos seja suficiente para sequenciamento e identificação dos habitantes primitivos do Bioma Cerrado, em especial do Brasil Central.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Este trabalho tem como objetivo principal estabelecer um protocolo, eficiente, para extração de DNA de ossos humanos antigos, quase sempre degradados, exumados de Sítios Arqueológicos existentes no Bioma Cerrado do Brasil Central, bem como tentar contribuir com as pesquisas tanto para a Genética quanto para a Arqueologia no que tange às dificuldades da extração de DNA em ossos humanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Revisar a literatura disponível sobre a Arqueologia do Brasil Central.

Adquirir amostras de ossos e dentes, contatando as entidades guardiãs de material arqueológico de sítios escavados na Região do Bioma Cerrado no Brasil Central, coletando o material ósseo cedido com o máximo cuidado para evitar novas contaminações.

Revisar, na literatura disponível, as rotinas e protocolos existentes para coleta, manuseio e classificação anatômica de material ósseo degradado.

Preparar amostras para extração de DNA, pesquisando métodos de limpeza e descontaminação das mesmas, especialmente no que se refere ao solo do cerrado.

Testar a eficiência de diferentes técnicas disponíveis para extração de DNA em amostras ósseas, revisando a literatura atualizada sobre extração de DNA de ossos e dentes antigos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AQUISIÇÕES DE AMOSTRAS

Realizou-se uma pesquisa, via e-mail, dos locais que poderiam ter sob sua guarda material arqueológico, ósseo, humano, exumado dos sítios arqueológicos do Bioma Cerrado na região do Brasil Central.

Com esse levantamento feito, foi enviado para as Instituições, Museus e Empresas um kit para Coleta de informações que contava com:

Questionário – visando a coleta de material em que o mesmo estivesse disponível (modelo anexo - 1).

Carta de apresentação - fornecida pela PUC-Goiás, pelos departamentos de Genética e Arqueologia, a ser apresentada aos responsáveis pela guarda do material arqueológico necessário ao desenvolvimento do projeto (modelo anexo – 2).

Carta de anuência, para se obter a autorização e concordância do(s) responsável(is) pela guarda do material arqueológico em referência (anexo – 3).

Análise dos dados coletados em questionários enviados ou ‘in loco’ quando necessário.

Quatro unidades acadêmicas e uma empresa de prestação de serviços em Arqueologia responderam à solicitação:

- Instituto Goiano de Pré-História e Antropologia IGPA/PUC-Goiás, liberando o material dos diversos sítios sob a guarda da instituição;
- Museu Histórico de Jataí, colocando-se à disposição do trabalho e liberando coletas de amostras do acervo, material esquelético humano, retirado do sítio GO-Ja 01;
- Griphus Consultoria em Arqueologia, colocando o material sob sua guarda à disposição do projeto.
- Unisinos(RS), informando que o material, foco da pesquisa, se encontra sob a guarda do IGPA;
- Museu de Antropologia da UFGO, justificando a impossibilidade de cessão do material solicitado, por estar em exposição de museu.

4.2 COLETA DE MATERIAL ÓSSEO

Protocolo de Coleta de material ósseo e dentes:

Participação obrigatória do mestrando, de um arqueólogo e de um representante da instituição cedente do material;

- Uso de máscaras cirúrgicas por todos os que se aproximarem do material;
- Uso de luvas de látex, descartáveis, para procedimentos;
- Campo de forro do local de realização das coletas;
- Assepsia local, sistemática, com ethanol a 70%;
- Uso de lâminas de bisturi, descartáveis a cada coleta;
- Troca sistemática do material a cada coleta;
- Registro, por imagem, de cada peça coletada;
- Classificação anatômica do material retirado;
- Embalagem de cada amostra coletada, separadamente, em papel alumínio;
- Etiquetagem de identificação do material com informações sobre o mesmo;
- Embalagem do material, já protegido, junto com a etiqueta de identificação em sacos plásticos herméticos tipo zip;
- Registro, por imagem, de todo o material catalogado.

O protocolo descrito tem apoio no protocolo de coleta e preparo de ossos para extração de DNA do Laboratório de Arqueologia e Ciências Forenses da Universidade de Indianápolis (Latham K & Ritke M (2002). Bone DNA Purification) e foi utilizado para coleta dos materiais oriundos de oito sítios arqueológicos pré-históricos nos estados de Goiás, Tocantins e Bahia (FICHAS TECNICAS 1 a 8 e TABELA 1).

A amostragem foi considerada representativa em virtude da pouca quantidade de sítios arqueológicos com ossos humanos.

FICHA TECNICA 1 – AMOSTRAS GO-Ja 01	
Nome do sítio:	GO-Ja 01 (Goiás-Jataí 01)
Local:	Serranópolis – Goiás – Brasil
Tipo de sítio:	Pré- histórico
Localização:	Em abrigo
Ambiente:	Cerrado
Datação:	10.580 +- 115 anos AP
Resp. Guarda:	Instituto Goiano de Pré-História e Antropologia – IGPA / PUC de Goiás Museu Histórico de Jataí (2ª etapa)

Descrição do Sítio

Projeto Paranaíba do Programa Arqueológico de Goiás (PAG)

Um abrigo, à margem esquerda do Rio Verde, afluente do rio Paranaíba, com grandes blocos caídos, entrada ampla, sol em toda a sua extensão, mantendo-o seco e iluminado. O interior é aberto, formando um salão único, coberto, ventilado, com 1300 m². No sítio encontrou-se pinturas, gravuras, restos cerâmicos, cocos, caroços de frutas e restos humanos. Efetuou-se a escavação numa parte do sítio de aproximadamente 40 m², sendo 10 m de extensão por 4 m de largura, em quadrículas de 4 m². Metodologia de escavação, a retirada da camada superficial de 10 cm e a seguir escavações por camadas de 10 cm. Foram, as camadas, designadas por letras e datadas, sendo a última denominada de camada “Q” que terminou a 170 cm abaixo, datada de 10580 +/- 115 anos AP.. Ao nível 13 da escavação, apareceram os sepultamentos humanos, o primeiro deles denominado de sepultamento “0” (zero) que vai de 128 a 170 cm de profundidade, um humano em posição *fletida* possivelmente um sepultamento primário (enterramento *post-mortem* no local em questão). Na quadrícula 12H, junto à rocha, cercado por pedras e coberto por uma laje, foi encontrado outro sepultamento de uma criança fletida, níveis 3 e 4. Um terceiro sepultamento foi encontrado na quadrícula 16H a aproximadamente 120 cm de profundidade de um humano, adulto, com dentes e com várias fraturas à esquerda. Na quadrícula 16I detectou-se uma cova circular na fase Paranaíba (material no bordo da cova), porém dentro do contexto da fase Serranópolis, nível 14 e não havia ossos no sepultamento. No nível 15 (150 cm), o sepultamento quatro, quadrícula 14-I detectou-se 01 esqueleto completo, sepultamento primário de um jovem, posição fletida, coberto de pedras a partir do nível 10, tinha quase todos os dentes definidos como incisivos, caninos, pré-molares e molares. Na parte Sul da mesma quadrícula 14I sobre sedimento vermelho, a 170 cm de profundidade detectaram-se os ossos de um pé com o resto do esqueleto dentro da parede, sendo este sepultamento não estudado (SCHMITZ; *et als*,1989).

GUARDA: IGPA / PUC GOIÁS



FIG. 10 –Frag. de corpo de costela
Foto: Viviane Nóbrega



FIG. 11 Falange proximal Direita
Foto: Viviane Nóbrega



FIG. 12-Porção distal da clavícula D.
Foto: Viviane Nóbrega

GUARDA: MUSEU HISTÓRICO DE JATAÍ





FIG. 13 –Dente 2° molar
Foto: Viviane Nóbrega






FIG. 14 - Porção medial da fíbula Direita
Foto: Viviane Nóbrega

FICHA TECNICA 2 – AMOSTRAS GO-Ja 03	
Nome do sítio:	GO-Ja 03 (Goías-Jataí 03)
Local:	Serranópolis – Goías – Brasil
Tipo de sítio:	Pré- histórico
Localização:	Em abrigo
Ambiente:	Cerrado
Datação:	+/- 1.000 A.P. (Tradição Uma – Fase Jataí)
Resp. Guarda:	Instituto Goiano de Pré-História e Antropologia – IGPA / PUC de Goías
<p>Descrição do Sítio:</p> <p>Projeto Paranaíba do Programa Arqueológico de Goías (PAG)</p> <p>Sítio lítico-cerâmico em abrigo de pouca profundidade, próximo ao córrego Pedreira, margem direita do Rio Verdinho, aproximadamente 80m de extensão formado pela inclinação de camadas de arenito teto inclinado para dentro permitindo muita luz solar e sombra à tarde, contendo blocos desprendidos do paredão com gravuras e pinturas. Metodologia dos demais sítios locais, região de Serranópolis, foram separados e analisados tipos de solo, material cerâmico, lítico e outros, inclusive 01 sepultamento de pouca profundidade, 2 covas pareadas localizadas a 35 cm abaixo do solo, junto a uma plataforma rochosa, sendo uma delas de uma criança muito pequena com esqueleto praticamente destruído pelo tempo e ao lado outra cova com esqueleto de uma pessoa bastante jovem, em <i>decúbito dorsal</i> e sobre o corpo inúmeras “continhas” todas furadas de um possível colar (SCHMITZ; <i>et als</i>, 1989; SCHMITZ; BARBOSA, 1986).</p> <p>.</p>	
	
<p>FIG.15 - Processo espinhoso da vértebra</p> <p>Foto: Viviane Nóbrega</p>	<p>FIG.16 - Costela porção posterior</p> <p>Foto: Viviane Nóbrega</p>

FICHA TECNICA 3 – AMOSTRAS GO-Rs 01		
Nome do sítio:	GO-Rs 01 (Rasmunsen Nóbrega)	
Local:	Monte do Carmo – Tocantins - Brasil	
Tipo de sítio:	Pré- histórico	
Localização:	Em abrigo	
Ambiente:	Cerrado	
Datação:	4.000 a 1000 anos AP.	
Resp. Guarda:	Instituto Goiano de Pré-História e Antropologia – IGPA / PUC de Goiás	
<p>Descrição do Sítio:</p> <p>Projeto Médio Tocantins do Programa Arqueológico de Goiás (PAG)</p> <p>Abrigo, em arenito, próximo ao rio Balsas, afluente do rio Tocantins, com grande número de sepultamentos (10 sepultamentos em 20 m² de escavações), gravuras distribuídas em quatro painéis no paredão, material lítico e cerâmico. Possui uma plataforma paralela, local de enterramentos, apresentando sepultamentos primários e secundários. Pelas características possivelmente o abrigo tenha servido também para sepultamentos de outros grupos quando acampados nos arredores. Os sepultamentos eram primários, com datação aproximadamente 4.000 AP. Evidencia-se, posteriormente, um segundo período de sepultamentos em torno de 2.000 AP e finalmente um terceiro período ocorreu, provavelmente, em torno de 1.000 AP (SCHIMITZ; BARBOSA, 1986).</p>		
		
FIG. 17 - Fragmento de vértebra Foto: Viviane Nóbrega	FIG 18- Maléolo lateral, fíbula D Foto: Viviane Nóbrega	FIG. 19 - Fragmento mastoideo E. Foto: Viviane Nóbrega
		
FIG. 20 - Maleolo medial tibia D Foto: Viviane Nóbrega	FIG 21 - Fragmento proximal úmero D Foto: Viviane Nóbrega	

FICHA TÉCNICA 4 – AMOSTRA VALE DOS SONHOS	
Nome do sítio:	Vale dos Sonhos
Local:	Goiânia – Goiás - Brasil
Tipo de sítio:	Pré- histórico
Localização:	Céu aberto
Ambiente:	Cerrado
Datação:	1.200 anos A.P.
Resp. Guarda:	Instituto Goiano de Pré-História e Antropologia – IGPA / PUC de Goiás
<p>Descrição do Sítio:</p> <p>Sítio Vale dos Sonhos – Goiânia</p> <p>Sítio lito-cerâmico, a céu aberto, sob um loteamento da Cidade de Goiânia, capital do Estado de Goiás, denominado de Vale dos Sonhos de implantação inicial irregular em 1999. Em maio de 2001, foi encontrada uma urna funerária pré-histórica, a 1,5 m de profundidade, com restos esqueléticos humanos. Foram identificados dentes e diversos fragmentos ósseos.(VIANA; MELLO; BARBOSA, 2004)</p>	
	
<p>FIG. 22 - Fragmento medial tíbia D</p> <p>Foto: Viviane Nóbrega</p>	

FICHA TECNICA 5 – AMOSTRAS GO-Pa 64	
Nome do sítio:	GO-Pa-64
Local:	São Domingos - Goiás - Brasil
Tipo de sítio:	Pré- histórico
Localização:	Em abrigo
Ambiente:	Cerrado
Datação:	Aproximadamente 500 anos AP
Resp. Guarda:	Instituto Goiano de Pré-História e Antropologia – IGPA / PUC de Goiás
<p>Descrição do Sítio:</p> <p>Localizado no município de São Domingos-GO, região da Serra Geral, junto a um paredão de calcário, às margens do rio São Bernardo, num desnível de 50 m cuja plataforma foi utilizada como local de enterramentos, onde foram feitas três (03) escavações denominadas de “sepultamentos 1, 2, e 3”. Na escavação denominada de “sepultamento 1” foram encontrados ossos de um crânio humano junto a outros ossos longos com características de um indivíduo adulto. Na escavação denominada de “sepultamento 2”, encontrados ossos de três (03) indivíduos sendo um adulto jovem e dois indivíduos muito jovens. Na escavação denominada de “sepultamento 3”, foram encontrados ossos que correspondem a um adulto.</p> <p>O material ósseo cedido para o presente projeto é referido como da escavação denominada de sepultamento 1 e de acordo com os trabalhos apresentados por Schmitz <i>et colls</i>, o referido material pode ser de uma época próxima à descoberta do Brasil.</p> <p>Em todas as escavações, foram encontrados fragmentos cerâmicos evidenciando desde cerâmicas sem nenhuma decoração a cerâmicas decoradas e com pinturas (SCHMITZ; BARBOSA; MIIRANDA; RIBEIRO; BARBOSA, 1996).</p>	
	
<p>FIG. 23 - Fragmento posterior de costela</p> <p>Foto: Viviane Nóbrega</p>	<p>FIG. 24- Dentes 2º e 3º molar</p> <p>Foto: Viviane Nóbrega</p>

FICHA TECNICA 6 – AMOSTRAS OLHOS D'ÁGUA		
Nome do sítio:	Olhos D'Água	
Local:	São Desidério – Bahia – Brasil	
Tipo de sítio:	Pré- histórico	
Localização:	Céu aberto	
Ambiente:	Cerrado	
Datação:	Em fase de relatórios ainda não concluídos	
Resp. Guarda:	Griphus Consultoria em Arqueologia	
<p>Descrição do Sítio:</p> <p>Município de São Desidério-BA, coordenada: UTM 23L 506443/8626087, em um vale plano, a céu aberto, circundado no sentido leste-oeste por uma pequena cadeia montanhosa com reentrâncias, cavernas e abrigos.</p> <p>Foram identificadas 2 urnas funerárias resgatadas.(Griphus consultoria, relatório).</p> <p>É um sítio líto-cerâmico, de média a alta densidade e restos materiais distribuídos numa área de aproximadamente 400m².</p>		
		
<p>FIG. 25-Dentes 1º Pré-molar e 1º Molar Foto: Viviane Nóbrega</p>	<p>FIG 26-Frag. Crânio Parietal E. Foto: Viviane Nóbrega</p>	<p>FIG 27-Frag. proximal de Ulna Foto: Viviane Nóbrega</p>

FICHA TECNICA 7 – AMOSTRAS SENHORINHA DA CRUZ		
Nome do sítio:	Senhorinha da Cruz	
Local:	São Desidério – Bahia – Brasil	
Tipo de sítio:	Pré- histórico	
Localização:	Céu aberto	
Ambiente:	Cerrado	
Datação:	Em fase de relatórios ainda não concluídos	
Resp. Guarda:	Griphus Consultoria em Arqueologia	
<p>Descrição do Sítio:</p> <p>Município de São Desidério–BA, coordenadas: UTM 23L 503022/8631532, numa região de calcário de solo argiloso e de alta compactação, a céu aberto, com dimensão aproximada de 350 x 300 m, escavação realizada com níveis de 10 em 10 cm onde foram identificados restos líticos, cerâmicos bem como 3 urnas funerárias. (Griphus consultoria, relatório).</p>		
		
<p>FIG. 28 - Protuberância do Mento E. c/ dente 1º Molar Foto: Viviane Nóbrega</p>	<p>FIG 29 - Fragmento Fíbula D Foto: Viviane Nóbrega</p>	<p>FIG. 30 - Fragmento proximal tibia D Foto: Viviane Nóbrega</p>



FICHA TECNICA 8 – AMOSTRAS CANGAS I	
Nome do sítio:	Cangas I
Local:	Aruanã – Goiás - Brasil
Tipo de sítio:	Pré- histórico
Localização:	Céu aberto
Ambiente:	Cerrado
Datação:	Em fase de relatórios ainda não concluídos
Resp. Guarda:	Griphus Consultoria em Arqueologia
<p>Descrição do Sítio:</p> <p>Situado às margens do médio rio Araguaia, entre a cidade de Aragarças e o sul da ilha do Bananal, coordenadas: UTM 22L 0499330/8384780, num terraço fluvial onde hoje está edificado um hotel. Foram efetuadas escavações em 11 sondagens e poço teste, todos de 1X1 m e encontrados em cinco quadrículas, fragmentos de ossos humanos, produtos de enterramentos. É um sítio lito-cerâmico. (Griphus Consultoria, relatório).</p>	
	
<p>FIG. 31 - Fragmento proximal de metacarpo Foto: Viviane Nóbrega</p>	<p>FIG 32 - Fragmento de osso longo Foto: Viviane Nóbrega</p>

TABELA I: CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA POR INSTITUIÇÃO.

INSTITUIÇÃO	SÍTIO	DESCRIÇÃO ANATÔMICA
IGPA – PUC-Goiás	GO-Ja-01	Costela: fragmento Falange: proximal D Clavícula D: tubérculo coróide
	GO-Ja 03	Vértebra: proc.espinhoso Costela: tórax posterior
	GO-Rs 01	Fíbula D: maléolo Crânio: temp.- mastóideo Tíbia D: maléolo Vértebra: fragmento Úmero D.
	GO-Vale dos Sonhos.	Tíbia D frag. Medial
Museu Histórico de Jataí	GO-Ja 01	Dente: 2º molar Fíbula D: frag. Medial
Griphus Consultoria em Arqueologia	GO-Pa-64	Tíbia D: Condilo lateral, Costela: fragmento Dente: 2º molar (2 Un)
	BA-Olhos D'água	Dente: pré-molar Dente: 1º molar Ulna: porção proximal Crânio: fragmento com sutura lambdoide
	BA-Senhorinha da Cruz	Mento: mandíbula E Dente: 2º molar Tíbia D: porção medial Fíbula: fragmento
	GO-Cangas 1	Ossos longos: fragmento Metacarpo: fragmento

4.3 PREPARO DO MATERIAL PARA EXTRAÇÃO DE DNA

O preparo do material contemplou a limpeza e descontaminação isolada, amostra por amostra, retirando-se o material aderido, do solo do cerrado, já que advém de sepultamentos em vasilhames de barro que se quebraram ou de enterramentos diretamente no solo.

Protocolo de limpeza e descontaminação do material ósseo e de dentes: (adap. de Kalmar, 2000)

(adaptação do protocolo utilizado por KALMAR e cols no artigo publicado em *Nucleic Acids Research*, 2000, Volume 28, nº 12 – *Oxford University Press*).

1. Imersão por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 2%;
2. Lavagem com água deionizada por 3 vezes;
3. Secagem em estufa (Fanem modelo315.SE) a 60° C;
4. Retirada da camada mais externa da amostra, aproximadamente 2mm, por raspagem com lâmina de bisturi descartada após cada amostra;
5. Lavagem com água deionizada;
6. Secagem em estufa a 60° C;
7. Radiação UV por 15 minutos.
8. Acondicionamento das amostras à temperatura ambiente em frascos estéreis previamente identificados.
9. Moagem dos ossos por maceração com cadinho estéril (FIGURA 33), sob proteção em capela, exceto os dentes cujo material foi extraído a partir da raiz com o uso de uma broca estéril, de baixa rotação, entrando pela região da abertura apical, retirando-se a parte interna da dentina até próximo ao esmalte dentário;
10. Pó do osso/dente submetido à radiação por luz UV por 15min;
11. Armazenamento em novo frasco estéril previamente identificado (FIGURA 34).



FIGURA 33 - Cadinho de porcelana utilizado para moagem dos ossos

Foto: JTNóbrega.



FIGURA 34 - Ossos após moagem em cadinho, embalados e rotulados

Foto: JTNóbrega.

4.4 MÉTODOS UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Com a finalidade de extração de DNA Genômico das amostras, foram testados diferentes métodos:

I - Método de NaCl:

1. 500 μ L de sangue total mais 1200 μ L de reagente 1 (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, SDS 0,6%)

2. Homogeneizar no vórtex e incubar em temperatura ambiente por 10 minutos
3. Centrifugar (centrífuga Universal 32-R) 14000 RPM por 5' para formar pellet das células nucleadas
4. Descartar o sobrenadante sem tocar o pellet
5. 300 µL de reagente 1 e 20 µL de proteinase K
6. Homogeneizar lentamente e incubar a 55°C por 30'
7. 200 µL de NaCl (6M saturado) e homogeneizar no vórtex
8. 800 µL de clorofórmio e homogeneizar no vórtex
9. Centrifugar a 14000 RPM por 10'
10. Transferir o sobrenadante-fase aquosa- para um novo microtubo identificado
11. Adicionar 1000 µL de etanol absoluto gelado para precipitar o DNA
12. Homogeneizar por inversão 10 X, lentamente
13. Centrifugar a 14000 RPM por 5'
14. Desprezar 2500 µL do sobrenadante
15. Adicionar 1000 µL de etanol 70% gelado
16. Homogeneizar por inversão 1X lentamente
17. Centrifugar a 14000 RPM por 5'
18. Desprezar todo o sobrenadante
19. Secar o tubo, aberto, em temperatura ambiente ou a 40°C por 15' em estufa
20. Adicionar 100 µL de Reagente 2 (TrisHCl 10mM e EDTA 0,1 mM) para hidratar o DNA.

Obs. I: Todos os reagentes devem estar em temperatura ambiente exceto proteinase K, etanol a 100% e etanol a 70% devem estar a -20°C no freezer.

Obs.II: No caso de aplicação para ossos, o primeiro item foi modificado:

500 mg de pó de osso (ou fragmentos);

1.000µL de tampão de incubação;

Homogeneizar em vórtex;

Incubação overnight em banho-maria a 56°C

Utilizar 500 µL para iniciar a reação por NaCl.

TRIS-HCl ($C_4H_{12}ClNO_3$) – Tris (hidroximetil) aminometano hidrocloreto -usado para preparação de tampões biológicos possui peso molecular = 157,60 e atividades de Dnase, Rnase e Protease não detectadas.

EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈) - Ethylenedianime Tetraacetic Acid (ácido etilenodiamínico tetraacético) – quelante que forma complexos estáveis com diversos íons metálicos dentre eles cálcio, manganês, ferro, zinco cobalto, cobre e chumbo.

SDS (CH₃(CH₂)SO₄.Na)- Dodecil Sulfato de Sódio – composto surfactante

PROTEINASE K é utilizada para eliminar contaminações e digestão de proteínas.

II - Método do fenol-clorofórmio:

(Sambrook, 1989)

1. Centrifugar a amostra (1.500rpm x 10') e lavar 2x em PBS gelado pH 7,2.
2. Homogenizar o tecido com auxílio de um pistilo em tubo eppendorf.
3. Suspender o pellet em tampão de extração (o volume do tampão deve ser de 4x o volume do pellet). É necessário uma concentração de 50µg de Proteinase K/mL de tampão de lise.
4. Incubar 42°C por pelo menos 1h. Adicionar a Proteinase K, na hora do uso.
5. Adicionar igual volume de Fenol equilibrado. Misture com cuidado (batidas no tubo e inversão) por 10 minutos;
6. Centrifugar por 10 minutos a 14.000RPM em temperatura ambiente. Se a fase aquosa aparecer “nebulosa”, adicionar um igual volume de clorofórmio, misturar com cuidado e centrifugar (spin) a 14.000RPM por 10 minutos. Se a fase aquosa aparecer clara, transferir a mesma para um novo tubo (não levar a fase oleosa).
7. Adicionar o mesmo volume de uma mistura Fenol-Clorofórmio (1:1), misturar por inversão do tubo, com cuidado, por 10 minutos.
8. Centrifugar por 10 minutos a 14.000RPM, preferencialmente a 4°C ou alternativamente em temperatura ambiente (TA).
9. Transferir a fase líquida para um tubo limpo e adicionar um volume igual de Clorofórmio;
10. Misturar cuidadosamente por 10 minutos, centrifugar a 14.000RPM por 10 minutos a 4°C ou em TA.
11. Transferir a fase aquosa para um novo tubo e adicionar o volume de 1/10, de uma solução 3M de acetato de sódio pH 5,2 e 2,5x o volume total de etanol 100% gelado.
12. Incubar em geladeira 4°C por 15 minutos.
13. Centrifugar por 30 minutos a 14.000RPM em 4°C ou TA.
14. Descartar o sobrenadante e lavar o pellet duas vezes com 500µL de etanol 70% gelado, centrifugando por 10 minutos a 14.000RPM a 4°C ou TA.

15. Secar, invertendo o tubo em TA por 10 minutos (evitar a perda do pellet) ;
16. Suspender o pellet em 50µL de TE (pode-se incubar o pellet por alguns minutos a 60°C para auxiliar na solubilização)
17. Tratar com 1 µL de RNase (estoque a 10 µg/mL) por 1 hora a 37°C.

Para utilização em PCR de baixa estringência, re-extrair o DNA a partir do passo 8.

Checar a concentração de DNA em espectrofotômetro ou em gel de agarose e estocar a -20° C. PBS - *Phosphate Buffered Saline*.(Tampão fosfato salino) (Na₂HPO₄). usado frequentemente para diluir anticorpos secundários.

TE – Tampão de Lise

III - Método de fenolclorofórmio modificado UFPA

(Arqueologia Amazônica 1- DNA mitocondrial de populações humanas pré-colombianas da Amazônia, Belém, 2010).

Método do fenolclorofórmio com modificações, utilizado na UFPA, departamento de paleogenética: Um protocolo de procedimento de extração, amplificação e sequenciamento estabelecido pelo Laboratório de Paleogenética da UFPA.

1. Descalcificação das amostras por incubação em solução de 1,2 mL de tampão de incubação, 150 µL de DTT 1M e 150 µl de Proteinase K a 18 mg/mL;
2. Manter a incubação de 3 a 5 dias;
3. Prosseguir a extração utilizando o método do Fenol-Clorofórmio (Sambrook e col., 1989). Dependendo do estado de conservação das amostras, pode-se utilizar como alternativa o método do kit DNA IQ® (Dialab Diagnósticos);

O DTT é um antioxidante usado nas reações, para estabilizar enzimas e proteínas.

Tampão de incubação – preparo:

100 mL de água

0,157g de tris-HCl

0,584g de NaCl

0,292g de EDTA

2,0g de SDS

KITS COMERCIAIS

IV- Kit de extração de DNA: *Invisorv® Spin Blood*

Kit de protocolo simplificado fornecido pela própria Healthcare (G&E Healthcare) no caso utilizado com ossos.

500 mg de pó de osso;
400 µL de solução de lise;
20 µL Proteinase K
Incubação temperatura ambiente 10 minutos;
Centrifugar a 10.000 r.p.m. por 1 minuto
500 µL de solução de lise
Centrifugar a 10.000 r.p.m. por 1 minuto
Descartar o sobrenadante;
500 µL *Wash Buffer*
Centrifugar 3 minutos a 10.000 r.p.m.;
Descartar o sobrenadante;
200 µL de *Elution Buffer*;
Incubar 1 minuto a temperatura ambiente;
Centrifugar a 10.000 r.p.m. por 1 minuto
Estocar o sobrenadante a -20°C

V - Kit IQ- PROMEGA(TM)

Método utilizado- kit IQ- Promega com adição de tampão de incubação especial, denominado “*bone incubation buffer*”, seguindo o protocolo tradicional do bulário de fábrica, de forma simplificada, e fornecido pela representação Promega/Brasil e descrito abaixo:

1. Manter o material ósseo ou dente, no mínimo 24h no freezer a -80°C;
2. Utilizar o material em pó, no mínimo na marca de 0,5 mL em microtubos de 2mL;
3. Adicionar 600µL de *Bone Incubation Buffer*, acrescentar 35µL de proteinase K, homogeneizar e acrescentar 40 µL de DTT;
4. Homogeneizar em vórtex, incubar em banho-maria a 56°C por 3h e adicionar mais 35µL de Proteinase K;
5. Homogeneizar em vórtex e incubar overnight a 56°C;
6. Centrifugar a 10.000 RPM por 5 minutos;
7. Transferir o sobrenadante (cerca de 500µL) para um novo tubo de 1,5mL evitando-se arrastar partículas;
8. Adicionar o equivalente a 2 volumes de *Lysis Buffer* (cerca de 1000µL) à solução e homogeneizar bastante em vórtex
9. Deixar em repouso por 5 minutos (se necessária outra tentativa, deixar mais tempo para captura do DNA);

10. Homogeneizar em vórtex o tubo que contém a resina, 10 segundos, em alta velocidade até que a mesma fique em suspensão;
11. Pipetar 14µL da resina em suspensão e adicionar à amostra;
12. Agitar, manualmente, à temperatura ambiente, por 5 (cinco) minutos;
13. Homogeneizar em vórtex, em alta velocidade, por 5 segundos;
14. Colocar o tubo imediatamente na estante magnética (*MagneSphere®*, *technology Magnetic Separation Stand –Z5342*);
15. Com uso de uma pipeta, retirar e descartar toda a solução sem perturbar a resina que deve estar imobilizada na parede do tubo, rente à estante; (não girar o tubo na estante para não desprender a resina);
16. Acrescentar 150µL de Lysis Buffer;
17. Homogeneizar em vórtex por 2 segundos em alta velocidade;
18. Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
19. Com uso de pipeta, retirar e descartar toda a solução sem perturbar a resina;
20. Acrescentar 100µL de 1X Wash Buffer;
21. Homogeneizar no vórtex por 2 segundos em alta velocidade;
22. Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
23. Com pipeta, retirar e descartar toda a solução sem perturbar a resina;
24. Repetir a descrição acima por mais 2X (total de 3 lavagens);
25. Deixar o tubo aberto para secar a resina por 5 minutos, à temperatura ambiente, na estante magnética. (Obs.: não ultrapassar 20 minutos, pois o DNA não irá se separar da resina);
26. Acrescentar 35µL de Elution Buffer;
27. Homogeneizar no vórtex por 2 segundos, em alta velocidade;
28. Incubar a 65°C por 5 minutos;
29. Homogeneizar no vórtex por 2 segundos, em alta velocidade;
30. Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
31. Retirar cuidadosamente com uma pipeta, a solução contendo o *DNA* e transferir para um novo microtubo.
32. Estocar a solução, contendo o DNA extraído, a 4°C por um período curto e a -20°C ou -70°C por longos períodos.

VI - Kit IQ-PROMEGA (TM)- modificado PUC-Goiás

(adaptação MGENE/PUC-Goiás para extração de DNA em ossos e dentes humanos, exumados de sítios arqueológicos pré-históricos, do Bioma Cerrado no Brasil Central).

Método utilizado- kit IQ- Promega com adição de tampão de incubação especial, “*bone incubation buffer*”, com alteração gradativa, modificando o protocolo tradicional fornecido no bulário de fábrica, até se conseguir otimização para extração de DNA de ossos antigos, a partir de então denominado nesta pesquisa como método de extração de kit IQ-Promega modificado/PUC-Goiás.

Optou-se por aumentar gradativamente o quantitativo de proteinase K, DTT e se necessário alterar os tempos de banho-maria e captura. Convencionou-se acrescentar 15µL de proteinase K ao quantitativo protocolar a cada experimento, bem como acrescentar DTT na fase overnight, elevar o tempo de banho-maria e o tempo de captura

Descrição do protocolo após otimização:

1. Manter o material ósseo ou dente, no mínimo 24h, no freezer a -80°C;
2. Utilizar o material em pó, no mínimo, na marca de 0,5 mL em microtubos de 2mL;
3. Adicionar 600µL de *Bone Incubation Buffer*, acrescentar 80µL de proteinase K, homogeneizar e acrescentar 40 µL de DTT;
4. Homogeneizar em vórtex, incubar em banho-maria a 56°C por 4h e adicionar mais 80µL de Proteinase K e 20 µL de DTT;
5. Homogeneizar em vórtex e incubar overnight a 56°C;
6. Centrifugar a 10.000 RPM por 10 minutos;
7. Transferir o sobrenadante (cerca de 500µL) para um novo tubo de 2mL, evitando-se arrastar partículas;
8. Adicionar o equivalente a 2 volumes do existente no tubo, de *Lysis Buffer* (cerca de 1000µL) à solução e homogeneizar bastante em vórtex;
9. Deixar em repouso por 15 minutos (se necessária outra tentativa, deixar mais tempo para captura do DNA);
10. Homogeneizar em vórtex o tubo que contém a resina, por 10 segundos, em alta velocidade até que a mesma fique em suspensão;

11. Pipetar 14 μ L da resina em suspensão e adicionar à amostra;
12. Agitar, manualmente, à temperatura ambiente, por 5 (cinco) minutos;
13. Homogeneizar em vórtex, em alta velocidade, por 5 segundos;
14. Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
15. Com uso de uma pipeta, retirar e descartar toda a solução sem perturbar a resina que deve estar imobilizada na parede do tubo, rente à estante; (não girar o tubo na estante para não desprender a resina);
16. Acrescentar 150 μ L de *Lysis Buffer*;
17. Homogeneizar em vórtex por 2 segundos em alta velocidade;
18. Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
19. Com uso de pipeta retirar e descartar toda a solução sem perturbar a resina;
20. Acrescentar 100 μ L de 1X *Wash Buffer*;
21. Homogeneizar no vórtex por 2 segundos em alta velocidade;
22. Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
23. Com uso de pipeta, retirar e descartar toda a solução sem perturbar a resina;
24. Repetir a descrição acima por mais 2X (total de 3 lavagens);
25. Deixar o tubo aberto para a resina secar, por 5 minutos, à temperatura ambiente, na estante magnética. (Obs.: não ultrapassar 20 minutos, após este tempo o DNA não irá se separar da resina);
26. Acrescentar 40 μ L de *Elution Buffer*;
27. Homogeneizar no vórtex por 2 segundos, em alta velocidade;
28. Incubar a 65°C por 5 minutos;
29. Homogeneizar no vórtex por 2 segundos, em alta velocidade;
30. Colocar o tubo imediatamente na estante magnética;
31. Retirar cuidadosamente com uma pipeta a solução contendo o DNA e transferir para um novo microtubo identificado.
32. Estocar a solução, contendo o DNA extraído, a 4°C por um período curto e a -20°C ou -70°C por longos períodos.

Preparo das soluções utilizadas com o kit relacionado:

Lysis Buffer (tampão de lise) = 100µL de tampão de lise + 1µL de DTT 1M

Wash Buffer (tampão de lavagem) = *Wash Buffer* 2X do kit (30 mL) + 15 ml de etanol 95 a 100% e 15 mL álcool Isopropílico, sendo o produto final 60 mL de *Wash Buffer* 1X.

4.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A integridade do DNA foi certificada, a cada método, por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (5µg/mL) e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (*Image Master VD*® - *Amersham Pharmacia Biotech*, USA). O DNA genômico foi mantido à temperatura preconizada de -20°C até a amplificação por PCR.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Foram realizadas as quantificações do DNA extraído de cada amostra em espectrofotômetro (*Spectrophotometer NANODROP 2000C* - *Thermo Scientific*), no laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da Associação de Combate ao Câncer de Goiás.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As amostras de DNA foram submetidas à PCR para amplificação do gene ZFX/Y com intuito de comprovar a presença de DNA humano. Como controle utilizou-se DNA extraído pela técnica do NaCl de sangue periférico humano. Os procedimentos foram realizados em duplicata. Os *primers* utilizados estão na tabela II, as condições de ciclagem estão resumidas na tabela III e os protocolos de amplificação para DNA de sangue periférico e de ossos e dentes estão resumidos nas tabelas IV e V, respectivamente.

TABELA II: SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO PRIMER ZFX/Y

Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do produto
ZFX/Y	F: ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACT C	495 pb
	R: GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T	

Mota *et al*, 2010.

O produto obtido em cada reação em cadeia da polimerase foi posteriormente submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em um campo elétrico de 10 V/cm, corado com brometo de etídio (5 μ g/mL) e o registro visual do gel feito com o auxílio do aparelho de Vídeo Documentação VDS® (*Image Master VD*® - *Amersham Pharmacia Biotech*, USA).

TABELA III:

PROTOCOLO DE TERMOCICLAGEM PARA AMPLIFICAÇÃO DOS PRIMERS ZFX/Y

Processos	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5	1
Desnaturação	95°C	1	
Anelamento	55°C	0,5	35
Extensão	72°C	1	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C	∞	

TABELA IV:

PROTOCOLO PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE ZFX/Y

(DNA AMOSTRA: SANGUE PERIFÉRICO)

Reagentes	Reagentes	Volume para 1 amostra
Tampão (5x)	1X	5,0 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1,5 mM	1,5 μ l
DNTPs	1,25 mM de cada	4,0 μ l
Taq polimerase 5 U/ μ l	2,5 U/ μ l	0,2 μ l
Primer sense	0,02 mM	0,5 μ l
Primer antisense	0,02 mM	0,5 μ l
H ₂ O Mili Q	---	10,3 μ l
DNA amostra	200 ng/ μ L	3,0 μ l
Volume final		25,0 μ l

TABELA V:**PROTOCOLO PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE *ZFX/Y***

(DNA AMOSTRA: OSSOS E DENTES)

Reagentes	[] reagentes	Volume para 1 amostra
Tampão (5x)	1X	5,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,5 Mm	1,5 µl
DNTPs	1,25 mM de cada	4,0 µl
Taq polimerase 5 U/µl	2,5 U/µl	0,2 µl
Primer sense	0,02 mM	0,5 µl
Primer antisense	0,02 mM	0,5 µl
H ₂ O Mili Q	---	4,3 µl
DNA amostra	200 ng/µL	9,0 µl
Volume final		25,0 µl

Após a limpeza dos ossos e autoclavagem (autoclave vertical Phoenix) do material, todos os demais passos, até o final da extração e PCR, foram realizados em “capela” com limpeza prévia e utilização de radiação UV (*Veco clean plus – bioprotector plus 12*) de todo o material, inclusive vidrarias, pipetas, ponteiros, e demais materiais envolvidos no processo a ser executado no momento.

5 RESULTADOS

Ao se utilizar o método de extração por NaCl, não se obteve sucesso em nenhuma das cinco tentativas, com gel de extração, negativo tanto para as amostras em forma de dois fragmentos ósseos (2) quanto para as amostras em forma de dois ossos pulverizados (2), mas obtendo resultado positivo, ou seja, extração de DNA de sangue periférico humano utilizado como controle da reação.

Em virtude do fracasso de extração de DNA, do material de pesquisa, pelo método por NaCl utilizou-se um segundo método, extração por fenol-clorofórmio (Sambrook, 1989), seguindo os parâmetros anteriores de duas amostras em forma de fragmentos ósseos e duas amostras em forma de pulverizado e uma de controle com sangue periférico humano. Foram realizadas três tentativas sem resultados, e como no descrito para a extração anterior, obtendo-se resultado positivo para o controle da reação, extraindo-se assim DNA de sangue periférico humano.

Pesquisas na literatura e informações sobre o método de extração por fenolclorofórmio, com modificações introduzidas na Universidade Federal do Pará, foram analisadas e consideradas viáveis de se aplicar para as amostras em questão. Consistiam as modificações, basicamente, em aumentar o tempo de incubação das amostras para 3 a 5 dias, em banho-maria a 56°C ou ainda continuar a extração com uso de kit comercial. Procedeu-se como no descrito para o método de extração por fenolclorofórmio, aumentando apenas o número de dias de incubação, anteriormente de um dia para o descrito de 3 dias, mantendo-se o mesmo número de amostras (5) e obtendo-se resultados idênticos, ou seja, positivo para controle, sangue periférico humano, e negativo para as amostras de ossos.

Considerou-se então a utilização dos kits comerciais iniciando pelo kit de extração de *DNA Invisorv® spin blood mini-kit (G&E Healthcare)*: não se obteve sucesso, gel de extração negativo tanto para as duas amostras em forma de fragmentos ósseos (2), como para as duas amostras em forma de pulverizado (2), sendo positivo para sangue periférico humano, utilizado como controle.

Outra opção de kit comercial foi o IQ-Promega(TM) cujo método protocolar preconiza apenas amostras pulverizadas. Foram realizadas 4 tentativas em grupos de oito amostras diferentes em cada, num total de 32 amostras, não se obtendo sucesso (figura 35).

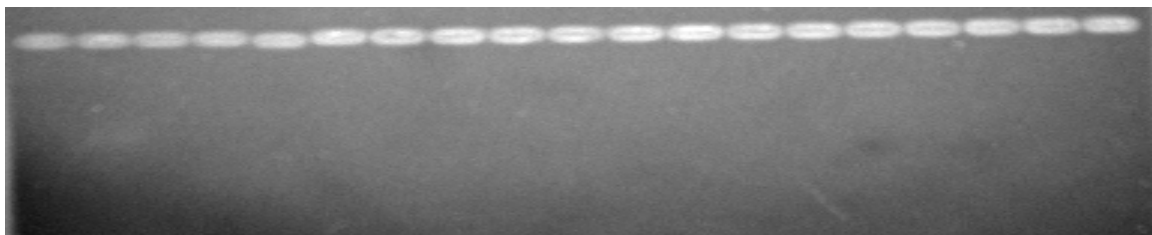


FIGURA 35 - Gel de eletroforese de extração sem sucesso

Fonte: VDS / MGENE/PUC Goiás

Géis similares foram obtidos nas extrações com as técnicas aplicadas, quais sejam: NaCl, Fenolclorofórmio (Sambrook), Fenolclorofórmio modificado, kits de extração Invisorv (G&E), IQ-PROMEGA™

Foram inseridas gradativas modificações no kit IQ-Promega(TM), e após eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado em brometo de etídio, visualizou-se no Sistema de Video Documentação VDS® (*Image Master VD® - Amersham Pharmacia Biotech, USA*), uma banda fraca, constante em todas as amostras (figura 36).

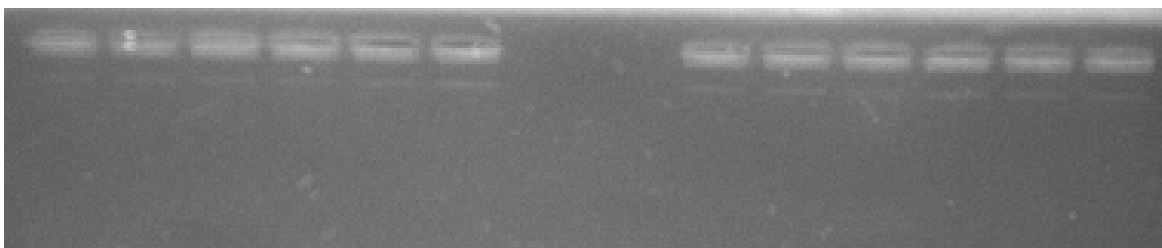


FIGURA 36 - Gel de eletroforese de amostras extraídas pelo kit IQ-PROMEGA modificado

Fonte: VDS / MGENE/PUC Goiás

Por apresentar uma fraca imagem em banda, o material foi quantificado no espectrofotômetro do Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da Associação de Combate ao Câncer do Estado de Goiás, de forma positiva, tabela VI.

A partir do resultado da quantificação, foram efetuadas as extrações do DNA das demais amostras ósseas, perfazendo o total de 32 extrações e todas foram quantificadas conforme resultados descritos na tabela VI.

O controle com sangue periférico humano foi sempre positivo, obtendo-se DNA em todas as técnicas de extração de DNA.

TABELA VI : RESULTADO DE QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

OSSOS					
SITE	SAMPLE	DATE AND TIME	NUCLEIC ACID CONC.	UNIT	SAMPLE TYPE
GO-Pa-64	Tíbia /proximal D	10/08/2011 15:56:32	1,9	ng/μl	DNA
GO-Pa-64	Costela	03/08/2011 10:35:12	8,1	ng/μl	DNA
BA-Olhos D'água	Ulna /proximal	10/08/2011 15:46:04	4,8	ng/μl	DNA
BA-Olhos D'água	Crânio - parietal E	03/08/2011 10:41:07	12,6	ng/μl	DNA
BA-Olhos D'água	Crânio - parietal E	10/08/2011 15:47:53	4,1	ng/μl	DNA
BA-Senhorinha da Cruz	Mento	03/08/2011 10:37:29	3,6	ng/μl	DNA
BA-Senhorinha da Cruz	Mento	10/08/2011 15:39:37	6,8	ng/μl	DNA
BA-Senhorinha da Cruz	Tíbia / medial D	03/08/2011 10:38:31	6,3	ng/μl	DNA
BA-Senhorinha da Cruz	Tíbia / medial D	03/08/2011 10:39:02	16,3	ng/μl	DNA
BA-Senhorinha da Cruz	Tíbia / medial D	10/08/2011 15:44:54	4,9	ng/μl	DNA
BA-Senhorinha da Cruz	Fíbula	03/08/2011 10:40:35	26,1	ng/μl	DNA
BA-Senhorinha da Cruz	Fíbula	10/08/2011 15:46:56	4,7	ng/μl	DNA
GO-Cangas 1	Osso longo	03/08/2011 10:35:42	4	ng/μl	DNA
GO-Cangas 1	Metacarpo / proximal	03/08/2011 10:36:17	5,1	ng/μl	DNA
GO-Ja 01	Costela	10/08/2011 15:30:14	9,1	ng/μl	DNA
GO-Ja 01	Falange /proximal D	10/08/2011 15:32:12	3,2	ng/μl	DNA
GO-Ja 01	Clavícula /distal D	10/08/2011 15:35:14	7,5	ng/μl	DNA
GO-Ja 01	Fíbula D	03/08/2011 10:42:18	3,2	ng/μl	DNA
GO-Ja 03	Processo espinhoso	03/08/2011 10:36:56	6,7	ng/μl	DNA

GO-Ja 03	Costela torax posterior	10/08/2011 15:38:39	6,9	ng/μl	DNA
GO-Rs 01	Fíbula D – Maléolo	10/08/2011 15:57:54	3,8	ng/μl	DNA
GO-Rs 01	Mastóideo D	03/08/2011 10:34:13	5,4	ng/μl	DNA
GO-Rs 01	Mastóideo D	10/08/2011 15:34:26	5,5	ng/μl	DNA
GO-Rs 01	Tíbia D – Maléolo	10/08/2011 15:59:07	11,7	ng/μl	DNA
GO-Rs 01	Processo espinhoso vertebral	10/08/2011 16:00:25	25,7	ng/μl	DNA
GO-Rs 01	Úmero / proximal D	03/08/2011 10:39:34	12,3	ng/μl	DNA
GO-Vale dos Sonhos	Tíbia / medial D	03/08/2011 10:41:48	12,9	ng/μl	DNA
DENTES					
Site	Sample	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	Sample Type
GO-Pa-64	2º molar	10/08/2011 15:48:58	2,6	ng/μl	DNA
BA-Olhos D'água	Pré-molar	10/08/2011 15:51:05	32,9	ng/μl	DNA
BA-Olhos D'água	1º molar	10/08/2011 15:52:31	32,1	ng/μl	DNA
BA-Senhorinha da Cruz	1º molar	10/08/2011 15:53:30	7,8	ng/μl	DNA
GO-Ja 01	2º molar	10/08/2011 15:50:08	3,1	ng/μl	DNA

Fonte: Laboratório de Oncogenética e Radiobiologia da ACCG.

Não há possibilidade de se fazer uma correlação entre os sítios arqueológicos e a quantidade de DNA extraído porque os enterramentos, sendo diversos, em profundidades diversas, foram submetidos a formas diferentes de intempéries nos seus locais de origem. Existem também diferenças nos períodos de enterramentos que variam de aproximadamente 7.000 a 500 anos A.P.

Após a quantificação do material extraído, o mesmo foi submetido a PCR para amplificação do gene ZFX/Y para certificar a condição de DNA humano, sempre em duplicata e utilizando-se como controle DNA de sangue periférico humano anteriormente

extraído pela técnica do NaCl. O material submetido a PCR foi positivo confirmando ser material humano (FIGURA 37).

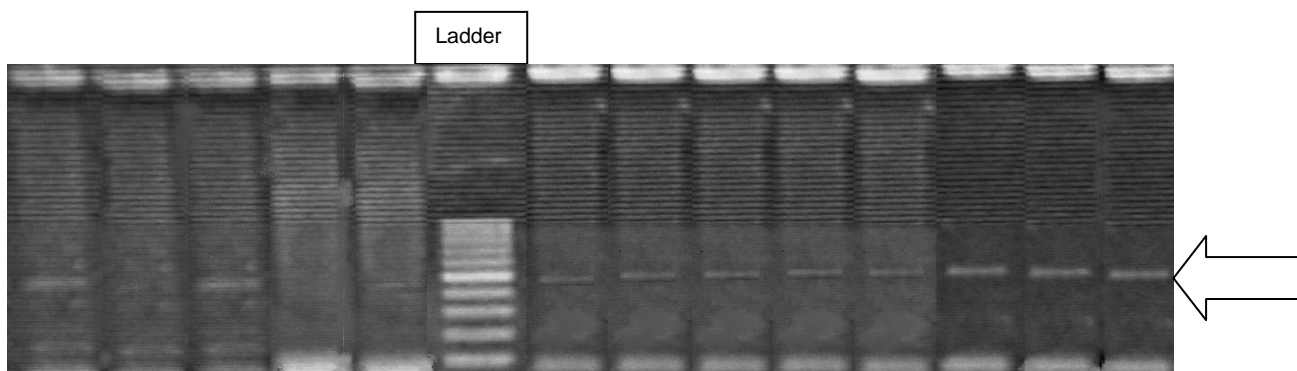


FIGURA 37 – PCR para amplificação do gene ZFX/Y. A seta mostra bandas amplificadas com tamanho esperado (495 pb), Ladder de 100 pb.

Fonte: VDS / MGENE/PUC Goiás

6 DISCUSSÃO

Relatos na literatura têm mostrado que o DNA pode persistir em restos antigos, especialmente em ossos e dentes. Essas amostras são abundantes em relação a restos de outros tecidos e geralmente preservadas, porém o estudo do material genético humano ainda é muito discutido no meio científico, pois a exposição às intempéries e o tempo de exposição às mesmas gera controvérsias, face às dificuldades de extração. Apesar do recente avanço na Biologia Molecular, pelo citado e por diversos outros fatores, ainda existem limitações para se obter DNA a partir de restos humanos (IWAMURA, 2003).

Diversas publicações, tais como as do Laboratório Forense da Universidade de Indianópolis, do Departamento de Antropologia da Universidade de Szeged na Hungria, da Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia, têm focado as dificuldades de extração de DNA de material antigo, sendo a presença de ácido fúlvico, ácido húmico e os radicais oxidantes os mais considerados e citados. O DNA de ossos antigos sofre modificações atribuídas ao processo oxidativo, responsável pela baixa recuperação de espécimes arqueológicas danificadas (OLIVEIRA, 2005).

Dificuldades na extração de DNA de ossos, encontrados em sambaquis em Santa Catarina, Brasil, em 212 amostras, com resultados negativos, de vários sítios pesquisados por SCHMITZ *et al* nos anos de 1992, 1993 e 1996 são citadas em artigo da MAE/USP, dentre elas a presença de radicais oxidantes, ácido húmico e fúlvico. O motivo da dificuldade de extrações, segundo o artigo, foi atribuído ao fato de que os ossos em questão apresentavam DNA degradado ou fragmentado, não obtendo sucesso nas diferentes tentativas de extração (ARRUDA, 2007).

KALMAR *et al*, (2000) estudando fatores que, em restos humanos nos casos históricos e forenses, impedem a extração do DNA e o sucesso quando da PCR, citaram haver variações das dificuldades de local para local, podendo esses fatores advir da própria degradação das amostras biológicas, do ambiente em forma de ácido húmico, capaz de inibir a ação da TaqDNA polimerase, do ácido fúlvico, da hidroxí-apatita e de taninos.

Na tentativa de se estabelecer um protocolo com eficiência para um projeto na Universidade de Szeged, foram utilizados diversos tampões de extração e diversos métodos tais como o do fenolclorofórmio, chelex e concluíram um protocolo alternativo baseado na precipitação com etanol, mais eficiente para o caso (ossos do Departamento de Antropologia

da Universidade Szeged/Hungria, oriundos de quatro diferentes escavações, bem documentadas dos séculos 7º ao 15º) (KALMAR *et All*, 2000).

Remualdo (2004), em um trabalho com dentes, extração recente e queima até 600°C relatou as dificuldades de extração de DNA, porém sendo possível encontrar o método apropriado. Além disso, aquela autora relatou, que ao se trabalhar com polpa dentária, as dificuldades de extração serão menores uma vez que a polpa dentária sofre pouca ação de pH externo, resiste à queima, não se degrada frente às condições do solo e, não tendo contato com água, não sofre mudanças químicas. As amostras submetidas a temperaturas elevadas apresentaram dificuldades de extração de DNA. O protocolo de extração que produziu resultados, ou seja, foi eficiente para extração de DNA, no caso em questão, foi extração pelo álcool isopropílico

No ambiente litorâneo, os inúmeros materiais arqueológicos pré-históricos, inclusive ossos humanos, em sambaquis, devido à presença da água do mar, sofreram profundas alterações na estrutura das moléculas de DNA, causando modificações químicas irreversíveis (ROCHA, 2009).

No ambiente do Cerrado do Brasil Central, cujo solo é extremamente ácido com pH de 4 a 5.5, com altos níveis de Al^{3+} , íons Fe e Mn, conferindo alta toxidez e baixos teores de cátions básicos (OLIVEIRA, 2005) há que esperar grandes dificuldades na extração de DNA de ossos de enterramentos antigos, principalmente do referido material ósseo, com datações aproximadas de 7.000 anos A.P., evidenciadas por carbono 14 (C^{14}). O solo do Cerrado e sua ação sobre ossos antigos promoveram contaminações e degradações, o que motivou a adaptação do protocolo do kit IQ-PROMEGA(TM) à situação imposta pelos enterramentos em solo do Bioma Cerrado.

Para minimizar os fatores que impedem a extração do DNA, uma das condições seria a eliminação das contaminações e de digestão das proteínas, o que levou ao aumento da proteinase K de forma gradativa, na proporção de 15µL a cada reação, tanto na fase de incubação curta, quanto na fase de incubação *overnight*, para se obter maior eficiência na eliminação das contaminações e digestão das proteínas.

Por ser agente antioxidante, com função, na reação, de estabilizar enzimas e proteínas, foi acrescido DTT na incubação *overnight* em 50% do valor da incubação de curta duração, que foi levada ao limite de 4 horas. Na terceira reação experimental com adaptação da quantidade de proteinase K, houve extração de DNA fixando o protocolo adaptado em 80µL de proteinase K nas duas fases de incubação, perfazendo um total de 160 µL.

Observa-se que os resultados positivos, quanto à extração de DNA de ossos e dentes apresentados por diversos autores, possuem adequações quanto ao método ou substâncias utilizadas, como ocorreu nos trabalhos com os ossos do Departamento de Antropologia, Universidade de Szeged na Hungria, onde vários protocolos foram utilizados sem sucesso e os trabalhos foram concluídos com métodos alternativos por precipitação de etanol. Observa-se, ainda, conforme relatado por Arruda *et al* (2007), que é necessário observar as dificuldades pela presença de radicais oxidantes, ácido húmico e ácido fúlvico.

O protocolo apresentado neste trabalho obteve sucesso por aumentar significativamente a quantidade utilizada de proteinase K e DTT, o primeiro otimizando a eliminação das contaminações e digestão das proteínas e o segundo como agente antioxidante e também digestor de proteínas.

A partir de DNA extraído pela utilização do protocolo alternativo apresentado neste trabalho, as próximas etapas serão os sequenciamentos, classificações de haplogrupos de cada amostra e comparações com Bancos de Dados Genéticos, indicando quem eram os indivíduos que na Pré-História migraram para o Bioma Cerrado no Brasil Central.

7 CONCLUSÃO

Este projeto pode fornecer subsídios para a Arqueologia, buscando protocolos alternativos para extração de DNA de material esquelético humano, histórico ou pré-histórico, raro e esgotável. Tais procedimentos visam remover possíveis inibidores de PCR, possibilitando a extração do DNA de ossos antigos, como ponto de partida para a amplificação, o sequenciamento e a identificação de haplótipos.

Apesar das dificuldades, é possível estabelecer, em genética, protocolos para extração de DNA dos ossos encontrados nos sítios arqueológicos na área Central do Brasil e o DNA extraído pelos protocolos adaptados é a chave que levará a Arqueogenética a auxiliar na elucidação da ancestralidade dos povos primitivos do Bioma Cerrado do Brasil Central.

Utilizando o protocolo apresentado como resultado deste projeto, é prevista a extração de DNA do material ósseo restante, avaliação do gene SRY (gene determinante do cromossomo Y), sequenciamento e classificação (haplogrupos) de cada amostra.

Os Arqueólogos poderão dar sua contribuição, sempre que encontrados enterramentos, através da inclusão do pensamento de ascendência humana em suas pesquisas. Procurar escavar, mantendo o material ósseo o mais intocado possível, fazendo uso de luvas, máscaras e aventais e/ou solicitando acompanhamento de um Geneticista para estudo do caso.

REFERÊNCIAS

- ALARCÃO, J. *Para uma conciliação das arqueologias*. Porto: Ed. Afrontamentos, 1996.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; WATSON, J.D. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 1997.
- ARAÚJO, A.; GONÇALVES, M.; FERREIRA, L.F. Migrações pré-históricas e paleoparasitologia in: SILVA, H.P.; CARVALHO, C. R. *Nossa Origem*, Rio de Janeiro: Ed. Vieira & Lent, 2006.
- ARRUDA, D.G.; HIRATA, M.H.; BARRETO, O.C.O. *Pitfalls in DNA extraction from ancient bones found in Brazilian Shell-mounds*. Revista do MAE, São Paulo, 2007.
- BRAMMER, S.P. *A técnica da eletroforese: Importância e aplicações em análises genéticas*. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001.
- BROWN, T. A. *Genética, um enfoque molecular*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998.
- CABELLO, P.H. A Genética: seu uso na determinação da origem do homem Americano In: SILVA, H.P.; CARVALHO, C. R. *Nossa Origem*, Rio de Janeiro: Ed. Vieira & Lent, 2006.
- CANN, R.L.; STONEKING, M.; WILSON, A.C. *Mitochondrial DNA and human evolution*. Revista Nature v.325, 1987.
- CONSALTER, Z.M. O Direito à Identificação genética nas filiações socioafetivas. In: *Ambito Jurídico*, Rio Grande, 2009.
- DIAS, A.S. Um Projeto para a Arqueologia Brasileira: Breve Histórico da Implementação do PRONAPA. In: *Revista do CEPA*. Santa cruz do Sul, 19 (22), março de 1995.
- ERIKSEN, T. H; NIELSEN, F. S. *História da Antropologia*. Petrópolis: RJ, Ed. Vozes, 2007.
- FLADMARK, K. R. *Rotas: corredores de migração alternativa para Homem Primitivo na América do Norte*. SAA, Vol 44, nº 1, 1979
- FUNARI, P.P.: A importância da Teoria Arqueológica Internacional para a Arqueologia Sul Americana: O Caso Brasileiro. In *Teoria Arqueológica da América do Sul*. Vol.76 UNICAMP, 1998.
- FUNARI, P.P. *Ética, capitalismo e arqueologia pública no Brasil*, Revista História, Unicamp, vol 27, 2008.
- GARDNER, E. J. *Genética*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1986.
- GILES, E.E; BLANC, H; CANN, H.M; WALLACE, D.C. *Maternal Inheritance of human mitochondrial DNA*. Acad. Sci. Genetics. USA, 1980.

- GÓES, A.C.S. *Tipagem Humana por DNA: Otimização de Condições para Análise Post Mortem*. Tese de Doutorado - Universidade do Rio de Janeiro (2003).
- GRIFFITHS, A.J.F. *Introdução à Genética*. Rio de Janeiro: Ed.Guanabara Koogan, 2006.
- GRIFFITHS, A.J.F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. *Genética Moderna*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001.
- GRIPHUS – Consultoria em Arqueologia Relatório parcial dos sítios Cangas I, Senhorinha da Cruz e Olhos D’Água, cópia 2010.
- IWAMURA, E.S.M. *Revista Saúde, Ética e Justiça*. São Paulo, 2003.
- JOBIM, L. F. ; JOBIM, M. R. ; BRENNER, C. *Identificação Humana pelo DNA*. Ed. Impa, v1, 1999.
- JOHNSON, M. *Teoria Arqueológica*. Espanha, Editorial Ariel, 2000.
- KALMAR, T.; BACHRATI, C.Z.; MARCSIK, A.; RASKÓ, I. A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press. Volume 28, nº 12, 2000
- KERN, A.A.; *Reflexões Epistemológicas sobre a Arqueologia Brasileira*. Anais de Reunião Científica sa SAB, Recife, 1999.
- KLUG, W.S; CUMMINGS, M.R. SPENCER, C.A; PALADINO, M.A.:*Conceitos de Genética*, 9ª Edição. Porto Alegre:. Artmed, 2010
- LATHAM, K; RITKE, M. *Bone DNA Purification - Protocols for Genetic Analysis*, University of Indianapolis Archeology & Forensics Laboratory, 2002.
- LEWIN, B. *Genes VII*, Porto Alegre: Artmed, 2001.
- LIMA, T.A. *Patrimônio arqueológico, ideologia e poder*. São Paulo: Revista de Arqueologia Brasileira, Nº 5, 1988
- LIMA, T. A. O povoamento inicial do continente americano: migrações, contextos, datações. In: SILVA, H.P.; CARVALHO, C. R. *Nossa Origem*, Rio de Janeiro: Ed. Vieira & Lent, 2006.
- MACHADO, L. A. Identidade cultural Origem do homem e memória – objetos de construção de patrimônio histórico IGPA/UCG, Goiânia, 1998. In: *Identificação Humana*, Porto Alegre: Editora Sagra Luzzatto, 1999.
- MATSUMURA, S.; FORSTER, P.; RENFREW, C. *Simulations, genetics and human prehistory*. Cambridge, UK, McDonald Institute for Archeological Research, 2008.
- McCLINTOCK, J. T. *Forensic DNA analysis*. Boca Raton –FL/USA: CRC Press, 2008.

MEYER, D; *A origem do Homo Sapiens Sapiens, uma questão ainda não esclarecida*; FFCH, USP, Cadernos de Arquivos, vol 2, pgs 124 a 131, USP Ribeirão Preto, SP, 1994.

MEGGERS, BJ; *American Antiquity*, vol 44, n° 2 pgs 252 a 256, SAA, USA, 1979.

MEGGERS, BJ; *América pré-histórica*, Rio de Janeiro: Ed. Paz e Terra, 1985

MENEZES, B. *Revista do IPHAN-RJ* n° 20, 1984.

MOTA, M. S; et all. *Caracterização molecular dos Alelos-S de incompatibilidade da gametofítica em Prunus salicina*. Revista Brasileira de Frutic. Vol 32 n. 3. São Paulo, 2010.

NETO, M. *Análise forense*, Panorama da Justiça 1998;

NEVES, W.A. Lapa Vermelha I.V., morphological affinities of the earliest known American, In: *Genetics and Molecular Biology*, vol 22 n° 4, 1999.

NEVES, W.A. Origens do homem nas Américas: fósseis versus moléculas? In: SILVA, H.P.; CARVALHO, C. R. *Nossa Origem*, Rio de Janeiro: Ed. Vieira & Lent, 2006

OLIVEIRA, I.D.; COSTA, C.A.P.; SANTOS, K.J.G.; MOREIRA, F.P. Considerações sobre acidez do solo do Cerrado, *Revista Eletrônica* (ISSN- 1808.8597), vol.1, n° 1, Fac. Montes Belos, GO (2005).

PETTERLE, S.R. *O direito fundamental à identidade genética na constituição brasileira*, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Direito, CDD DIR 341.12191, Porto Alegre: 2006.

REMUALDO, V.R. OLIVEIRA, RN. *The forensic analysis potencial DNA from different biologicals sammpls*, Rev. Assoc Paulista de Cirurgiões Dentistas, São Paulo-SP, 2005.

REMUALDO, V.R. *Avaliação de três métodos de extração de DNA de dentes humanos, submetidos ao Calor*, FO/USP; 2004.

RENFREW, C. XVI IUPPS, *Word Congress International Union of Prehistoric and Protohistoric Sciences*, palestra magistral, Florianópolis, Santa Catarina, 2011.

REYES, A; LARIZZA, A; PESOLE, G; SBISA, E; SACONNE, C. *Journal of Molecular Evolution*. Volume 54, n 1, 2002.

ROCHA, P.B. *O Estudo do comportamento do material genético humano em tecido ósseo sob ação de diversas temperaturas*. FO/USP; 2009.

RODRIGUES, J.E. IPHAN, *Patrimônio: atualizando o debate*, 2006, fls 237/238.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T; *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Nova Iorque, 1989

SANTOS,A.K.R; LEITE,D.S.; SANTOS,S.E.B. DNA mitocondrial de populações humanas pré-colombianas da Amazônia e as interações do passado (paleogenética), in: *Arqueologia Amazônica*. Belém: Ed. Museo Goeldi, 2010.

SCARANO, W.R ., *Mitocondria e Metabolismo Celular*, UFALFENAS, 2008.

SCHMITZ,P.I.; - *Caçadores e Coletores da Pré-História do Brasil*. São Leopoldo-RS: Editora Unisinos, 1984.

SCHIMITZ, P. I.; ROSA, A. O.; BITTENCOURT, A. L. V. *Arqueologia nos cerrados do Brasil Central-Serranópolis III*. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 2004

SCHMITZ, P. I.; BARBOSA, A. S. *Horticultores pré-históricos do estado de Goiás* São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1986.

SCHMITZ, P.I.; BARBOSA, A.S.; JACOBUS, A.L.; RIBEIRO, M.B. *Arqueologia nos Cerrados do Brasil Central –Serranópolis I*. Porto Alegre: Ed. Unisinos, 1989.

SCHMITZ, P.I.; BARBOSA, A.S.;MIIRANDA, A. F.; RIBEIRO, M.B.; BARBOSA, M. O. *Arqueologia nos Cerrados do Brasil Central Sudoeste da Bahia e Leste de Goiás*. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1996.

SCHMITZ, P.I.; RIBEIRO, M.B.; BARBOSA, A.S; BARBOSA, M. O.; MIIRANDA, A. F. *Arqueologia nos Cerrados do Brasil Central Caiaponia*. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1986.

SCHMITZ, P.I.; WUST, I.; COPÉ, S. M.; THIES, U. M. E. *Arqueologia do Centro-Sul de Goiás,uma fronteira de horticultores indígenas do Centro do Brasil*. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1982.

SILVA, H.P.; CARVALHO, C.R. A busca pelos primeiros americanos, In: *Nossa Origem*, Rio de Janeiro: Ed. Vieira & Lent, 2006.

SOUZA, A.M. *História da Arqueologia Brasileira*. São Leopoldo: Ed. Unisinos, 1991.

SOUZA, A. M. *Dicionário de Arqueologia*. Rio de Janeiro: Ed. Adesa, 1997.

SOUSA, E. V.; CAMARGO, A. J. A.; WALTER, B. M. T.; SANZONOWICS, C; SOUSA, D.M.G.; LOBATO, E; AQUINO, FG; RIBEIRO, IF; AGUIAR, LMS; VILELA, MF; MIRANDA, Z.J.G. *A Embrapa nos biomas brasileiros*. Brasília-DF.: Biblioteca eletrônica. 2011.

SOUZA, S.M.F.M.; Revisando a discussão sobre o Quaternário de Lagoa Santa e o povoamento das Américas: 160 anos de debate científico, In: SILVA, H.P.; CARVALHO, C. R. *Nossa Origem*. Rio de Janeiro: Ed. Vieira & Lent, 2006

STRACHAN, T; READ A.P. *Genética Molecular Humana*. Porto Alegre: Ed. Artmed; 2002.

TRIGGER, B.G. *História do pensamento arqueológico*. São Paulo: Ed. Odysseus; 2004.

UPHOLT, W.B.; DAWID, I.B. *Mapping of mtDNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region*. Cell. 11(1977) 571-583. 1977.

VIANA, S. A.; MELLO, P. J. C; BARBOSA, M. O. Sítio Arqueológico Vale dos Sonhos: Educação Patrimonial em contexto urbano, *In: Habitus*, Volume 2 nº 1, Goiânia :Gráfica Editorial UCG, 2004.

VIGILANT, L.; STONEKING, M.; HARPENDING, H.; HAWKES, K, WILSON, A.C. – *African Populations of human mitochondrial DNA*, Revista Science, Volume 253, september, 1991.

VOGEL, F., MOTULSKY A. G. *Genética Humana*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2000

WALKER, M. R.; RAPPLEY, R. *Guia de Rotas na Tecnologia do Gene*. São Paulo: Editora Atheneu. 1999.

WASSERMAN, *Migração e Identidade*. Revista Ágora Editora. UNISC, vol 7 nº 2, Jul/Dez/2001

WILLARD, H. Genética e câncer. In: Nussbaum RL, McInnes RR, Huntington Fn. *Genética médica* Thompson & Thompson. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002. p. 274- 293.

ZARA, A. (coord). *Biologia Molecular Básica*, Porto Alegre: Ed.Mercado Aberto. 2001.

Referências eletrônicas:

<http://ultimaparada.wordpress.com>, em 24/05/2011

www.antropologia.com

www.creativecommons.org.br - FERNANDO KITZINGER DANNEMANN em 22/05/2007.

: <http://revistaescola.abril.com.br>, em 22/05/2010

<http://revistaescola.abril.com.br>, em, em 22/05/2010

Fonte:<http://revistaescola.abril.com.br>, em 25/06/2011

<http://biologiasoberana.webnode.com.br>, em 14/09/2011

http://www.ufpe.br/biolmol/genomas_organelas.htm, em 16/08/2011

Fonte: <http://www.roperld.com/mtdna.htm>, em 18/10/2010

ANEXO

ANEXO 1

FICHA DE INFORMAÇÕES PARA COLETA DE AMOSTRA ÓSSEA HUMANA PARA FINS DE LEVANTAMENTO GENÉTICO EM ARQUEOLOGIA										
1	Instituição:									
	Endereço:									
	Telefone:					E-mail:				
	Responsável:									
2	Nome do sítio:									
	Local:									
	Tipo de sítio:		Pré- histórico:		Histórico:		Outro:			
	Localização:		Céu Aberto		Em abrigo:		Outro:			
	Ambiente:		Cerrado		Mata		Outro:			
	Documentação:		Relatórios		Croquis		Perfis			
	Datação:									
3	Material ósseo humano									
	Quantidade de indivíduos:									
	Sexo:		Masculino:		Feminino:		Não identificado:			
	Tipo de ossos:		Longos		Curtos		Mandíbula		Crânio	
	Dentes:		Avulso		Articulado mandíbula e/ou maxila					
	Estado de conservação:		Bom		Calcificado		Queimado			
			Antropizado		Outros:					
	Efetuado algum tratamento para preservação do material ósseo?				Sim		Não			
Qual?										
4	Sepultamento:		Primário		Secundário		Outro:			
	Em contexto cultural:		Sim		Não					
	Vestígios associados:		Lítico		Cerâmica		Carvão		Conchas	
Coprólitos			Outro							
5	Referências em publicações:		Sim		Não					
	Quais?									

ANEXO 2**CARTA DE APRESENTAÇÃO DE ALUNO**

Vimos, por meio dessa, apresentar o aluno **JUDAS TADEU NUNES NÓBREGA**, matrícula 2010.1 093.001.0007, mestrando em Genética pelo Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, que está realizando sua dissertação com o tema “Identidade genética dos povos primitivos do Bioma Cerrado do Brasil Central” sob a orientação da professora Dra Kátia Karina Verolli de Moura (Mestrado em Genética) e, co-orientação Dra. Rosicler Theodoro da Silva (Instituto Goiano de Pré-história e Antropologia).

Certos de sua compreensão, agradecemos desde já a valiosa colaboração e colocamos ao seu inteiro dispor para maiores esclarecimentos, se preciso for,

Atenciosamente,

Goiânia, 18 de março de 2010.

Profa. Dra. Kátia Karina V. de Moura

Silva

Orientadora

Departamento de Biologia

Mestrado em Genética (Mgene/PUC Goiás)

Profa. Dra. Rosicler Theodoro da

Co-orientadora

IGPA/PUC Goiás

ANEXO 3**CARTA DE ANUÊNCIA**

Pela presente, a (Nome completo da instituição), sediada à (Endereço completo, com números, complementos, CEP, cidade e estado), representada por (colocar nome do responsável), portador do RG nº _____ e CPF _____, autoriza o aluno **JUDAS TADEU NUNES NÓBREGA**, matrícula 2010.1 093.001.0007, mestrando em Genética pelo Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, a coletar amostras ósseas humanas para fins de levantamento genético populacional em arqueologia, acesso às publicações e demais documentos que possam contribuir ao pleno desenvolvimento de sua dissertação de mestrado.

Cidade, XX de XXXXX de XXXX.

Assinatura do responsável

Instituição