



ISSN 0102 - 0110

Dezembro, 2002

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Documentos 83

Análises Genéticas em Material Arqueológico

Fábio de Oliveira Freitas

Brasília, DF
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W5 Norte (Final) - Brasília, DF

CEP 70770-900 - Caixa Postal 02372

PABX: (61) 448-4600

Fax: (61) 340-3624

<http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária-Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Costa Allem

Marcos Rodrigues de Faria

Marta Aguiar Sabo Mendes

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares Campos Carneiro

Suplentes: Edson Junqueira Leite

José Roberto de Alencar Moreira

Supervisor Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Revisor de texto: Miraci de Arruda Camara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Alice Bianchi

Tratamento de Ilustrações: Alysson Messias da Silva

Editoração Eletrônica: Alysson Messias da Silva

Capa: Alysson Messia da Silva

1ª edição

1ª impressão (2002): tiragem 150

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Freitas, Fábio de Oliveira.

Análises Genéticas em Material Arqueológico / Fábio de Oliveira Freitas. - Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2002.

22 p. - (Documentos / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ISSN 0102-0110; n. 83)

1. Análise genética. 2. Arqueologia. I. Título. II. Série.

CDD 630

© Embrapa 2002

Autores

Fábio de Oliveira Freitas

Eng. Agr., PhD, Embrapa Recursos Genéticos e
Biotecnologia. E-mail: fabiof@cenargen.embrapa.br

Sumário

Introdução	7
Exemplos de Técnicas em Pesquisa com Amostras	
Arqueológicas	9
Imunologia	9
Extração de material genético de tecidos não vivos	9
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase	10
Procedimentos principais para se evitar contaminação	12
Revisão de trabalhos com resgate e uso de material genético ancião	12
Trabalhos de resgate de DNA em amostras arqueológicas de plantas	
cultivadas	15
Considerações Finais	18
Referências Bibliográficas	20

Análises Genéticas em Material Arqueológico

Fábio de Oliveira Freitas

Introdução

Até recentemente, antes do aparecimento de técnicas de genética molecular no início dos anos 70, o estudo de filogenia das espécies/raças era baseado quase que exclusivamente em medidas morfológicas dos indivíduos.

Através da morfologia comparada entre espécies/raças atuais ou mesmo com fósseis, construiu-se toda uma teoria de evolução dos diferentes gêneros, famílias, reinos, enfim, toda a árvore genealógica das espécies conhecidas.

Entretanto, com o passar do tempo e o aparecimento de novas técnicas, principalmente após a redescoberta da genética no início do século, passaram a existir dúvidas se a arquitetura desta árvore estava certa. Primeiro, porque existem lacunas ainda não totalmente esclarecidas, devido à falta de fósseis representativos de alguns grupos e, outro motivo é que, como esta classificação é baseada na morfologia, ou seja, no fenótipo, podem haver erros de classificação/ interpretação, já que, devido aos fatores ambientais, genótipos diferentes podem estar apresentando fenótipos parecidos e vice-versa.

Algumas das novas técnicas que surgiram com o desenvolvimento da genética foram a citologia e a imunologia. Inúmeros trabalhos compararam o número e tamanho dos cromossomos de diversas espécies, podendo-se assim elucidar diversas dúvidas sobre o grau de parentesco e o caminho evolutivo destas espécies (Skovsted, 1937; McClintock, 1959; McClintock et al., 1981).

Entretanto, nenhum avanço foi tão grande quanto ao obtido pelas técnicas moleculares, as quais permitiram que tivéssemos acesso a detalhes diretos sobre o material genético das espécies.

Técnicas como eletroforese de isoenzimas, RAPD, RFLP, sequenciamento, entre muitas outras, nos permitiram estimar o quanto uma espécie está distante da outra, podendo-se saber, por exemplo, quais nucleotídeos (A;C;G;T) são diferentes entre as espécies, permitindo estimar, por exemplo, o número médio de mutações por período de tempo e em quais posições no genoma ocorreram entre os indivíduos estudados, desde um ancestral comum.

Acontece que, mesmo com todo este avanço, muitas dúvidas continuavam, devido principalmente ao fato de que, a princípio, estas técnicas permitiam o estudo e a comparação entre material genético apenas de espécies vivas, ou seja, era necessário que a espécie/raça ainda existisse hoje em dia, pois muitas das técnicas comparam produtos de genes que estão se expressando, como é o caso da técnica de isoenzimas.

Portanto, através destas técnicas, acreditava-se que as comparações entre espécies atuais com espécies extintas fosse impossível, devido ao fato de que no momento em que um ser vivo morre, imediatamente suas células começam a entrar em colapso e morrer, e o material genético destas células começa a se quebrar, se degradar, devido às ações da hidrólise, da oxidação, de radiações cósmicas, entre outros fatores que o degradam rapidamente, restando apenas pequenos fragmentos deste material, o que, até recentemente, era impossível de ser aproveitado para estudos.

Este cenário modificou-se quando estudos e técnicas recentes mostraram que é possível o resgate de informação genética de espécies já extintas, permitindo assim o esclarecimento de diversas dúvidas e o estudo evolutivo a nível molecular, sem que haja um limite de escala de tempo (Herrmann & Hummel, 1994).

Exemplos de Técnicas em Pesquisa com Amostras Arqueológicas

Imunologia

A primeira técnica utilizada em material arqueológico a nível molecular foi obtida através da extração de albumina do músculo de um mamute extinto, encontrado na Sibéria, congelado (Prager et al, 1980).

Neste estudo, os autores isolaram esta proteína e compararam com a mesma proteína, extraída de elefantes asiático e africano atuais. Através de testes imunológicos, que consistem primeiramente no isolamento da proteína, a qual é posteriormente injetada em cobaias, no caso coelhos e, por fim, estudam-se os antígenos produzidos por estes animais para cada uma das albuminas injetadas (anticorpos). Neste trabalho, os autores perceberam que todas as amostras possuíam uma sequência primária muito próxima, confirmando o parentesco entre eles.

Extração de material genético de tecidos não vivos

Entretanto, foi somente em 1984 que surgiu o primeiro trabalho utilizando diretamente material genético arqueológico (Highuchi & Wilson, 1984).

Estes autores conseguiram extrair material genético de células da pele de um “quagga” (Fig. 1 e 2), animal parente da zebra e que foi extinto no século XIX. Eles retiraram estas amostras de peles que se encontravam em museus e estavam muito bem conservadas e, este fato, somado à pouca idade relativa do material, permitiu que ainda estivesse presente uma grande quantidade de material genético, fazendo com que análises genéticas fossem possíveis.

Entretanto, a grande limitação deste tipo de estudo em amostras arqueológicas é que para uma análise genética ser possível, existe a necessidade de termos uma grande quantidade repetida de material genético, o que necessitaria obtermos a mesma parte ou sequência genética de diversas células do organismo, pois, até então, a multiplicação em laboratório de seqüências específica de DNA era bastante limitada, impedindo que obtivéssemos uma boa quantidade de material genético para trabalho a partir da extração de poucas seqüências preservadas nas amostras.

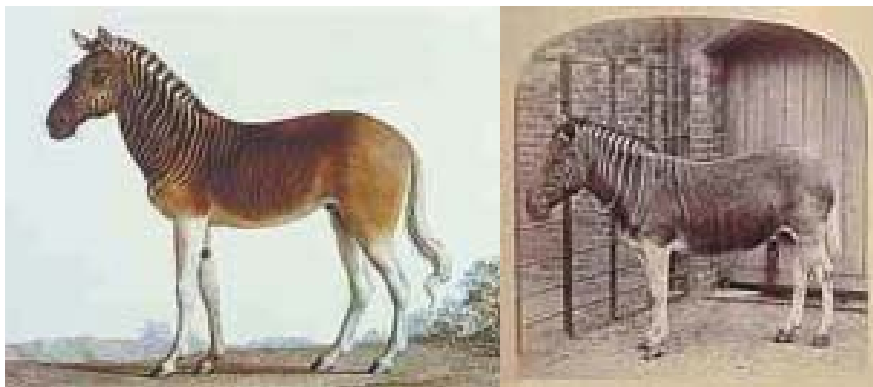


Fig. 1 e 2. Aquarela de Nicolas Marechal (Paris, 1793) mostrando um “quagga” e uma das cinco únicas fotografias existentes deste animal, tirada no Zoológico de Londres, por Frederick York e Frank Haes, ao redor do ano de 1870.

Deste modo, o material necessita estar muito bem conservado, para que seu material genético não esteja muito degradado. Isto inviabiliza os trabalhos com várias das amostras existentes, já que muito do material arqueológico disponível são pequenos fragmentos, cuja técnica iria consumir todo o material existente.

Esta limitação deixou de existir quando, em meados da década de 1980, foi desenvolvida a técnica de PCR ou reação em cadeia da polimerase (Saiki et al., 1985; Mulli & Faloona, 1987).

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

A técnica de PCR consiste basicamente em amplificar, fazer muitas cópias a partir de um único fragmento de DNA, produzindo assim uma quantidade de material genético possível de ser analisado.

A amplificação é feita utilizando, basicamente, dois oligodeoxinucleotídeos (primers), cada qual com mais ou menos 25 bases de comprimento; uma DNA polimerase termoestável e os quatro desoxiribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs).

Através da manipulação da temperatura, as duas fitas do fragmento do DNA são separadas (92°C – 95°C). Em seguida, um dos primers se liga a uma das fitas, enquanto o outro primer se liga à fita complementar (35°C – 65°C). Com a elevação da temperatura para 72°C, a polimerase monta o resto da sequência

complementar das fitas, a partir de cada primer. Este ciclo é repetido dezena de vezes e, com isso, este fragmento de material genético vai sendo multiplicado, clonado, em quantidade exponencial.

Esta técnica permitiu a análise de material genético de tecidos fósseis/arqueológicos, porque ela é capaz de, com os primers adequados, resgatar algum fragmento de material genético que ainda esteja presente na amostra, sem a necessidade de que todo o material genético da célula esteja intacto. Com isso, conseguimos fazer uma grande quantidade de cópias deste fragmento e compará-lo com fragmentos de material genético de espécies atuais ou não, bastando para isto que se utilizem os mesmos primers.

A partir da amplificação do material, diversas técnicas moleculares podem ser usadas para o estudo em questão. Uma das mais usadas, pela sua precisão é o sequenciamento (Pääbo et al., 1989; Höss & Pääbo, 1993; Allaby et al., 1994, Austin et al., 1997) no qual é determinada toda a seqüência de nucleotídeos dos fragmentos, permitindo, deste modo, uma comparação evolutiva base a base, indicando quais foram as mutações, mudanças que ocorreram entre as diferentes espécies ao longo do tempo, naquele fragmento específico.

O material genético mais trabalhado pelos pesquisadores é o de mitocôndrias, ribossomos e cloroplastos, pois estas organelas aparecem em grande número dentro da célula e, portanto, a chance de se encontrar uma seqüência de fragmento ainda intacta é muito maior do que o DNA nuclear que é cópia única (Lawlor et al., 1991).

Um dos problemas desta técnica e que gerou muita discussão no início é que a PCR não distingue entre um material genético da amostra e o de algum contaminante. Desde que o primer se encaixe na seqüência, a reação irá amplificar o material que ali estiver, podendo ser o da amostra em questão ou de uma bactéria que esteja ali ou mesmo de um microorganismo que já estivesse presente no momento da morte do indivíduo, ou até mesmo contaminações com DNA humano devido à manipulação (Lindahl & Nyberg, 1972; Lewin, 1994).

Portanto, deve-se tomar muito cuidado na manipulação do material e escolher os primers adequados para que se tenha certeza de estar amplificando o material desejado. A seguir, citamos alguns procedimentos principais para diminuir os riscos de contaminar as amostras.

Procedimentos principais para se evitar contaminação

Com o objetivo de se evitar a contaminação das amostras arqueológicas com DNA de amostras modernas, diversas precauções devem ser tomadas, entre as principais citamos: utilização de salas diferentes para extração de DNA de amostras modernas e arqueológicas; uso de luvas de caixas diferentes; jalecos protetores distintos; micropipetas separadas para cada fase; soluções estoques distintas para cada tipo de material; tubos e material para preparo de soluções de origem diferentes e mantidos em salas distintas; armazenagem de produtos de PCR em freezers e salas diferentes; preparo de PCR em sala isolada; e uso, em qualquer etapa do processo, de amostras controle, sem DNA, para traçar qualquer contaminação ao longo de cada fase.

A seguir, fazemos um breve resumo de alguns trabalhos que utilizaram material genético antigo, resgatando um pouco de informações a respeito do passado.

Revisão de trabalhos com resgate e uso de material genético ancião

Como já mencionado, o primeiro trabalho que utilizou diretamente material genético foi o realizado por Higuchi e Wilson em 1984. Extraíndo material genético de células da pele de um “quagga” (Fig. 1 e 2), animal que habitava a África e que foi extinto no século passado pela ação do homem, eles conseguiram elucidar uma dúvida que era objeto de uma longa discussão.

Existia a dúvida se, filogeneticamente, o “quagga” era mais correlacionado com o cavalo ou com as zebras. Os autores retiraram DNAMt (mitocondrial) de amostras de peles que se encontravam em museus e compararam com amostras de DNAMt de cavalo, zebras e asnos.

Através de mapas de restrição, eles conseguiram constatar o grau de divergência entre cada uma das espécies analisadas. Através deste e outro estudo posterior do mesmo grupo de pesquisa, o “quagga” foi considerado como tendo um grau de parentesco maior com as zebras (Higuchi & Wilson, 1987).

Posteriormente um trabalho foi publicado, relatando o sucesso de extração de seqüências repetitivas de DNA de uma múmia egípcia de 2.400 anos de idade, usando uma sonda para seqüências repetitivas “Alu” (Pääbo et al., 1989). Este trabalho trouxe dois importantes fatos: o primeiro foi de que DNA mais

antigo poderia ser preservado e, além disto, mostrou que não somente o DNAm, mas também o nuclear era passível de uso em amostras arqueológicas.

Ampliando o tempo de resgate e a gama de materiais arqueológicos passíveis de estudo, fato este possível com o surgimento da PCR, conseguiu-se obter seqüências de material genético cada vez mais antigo. Primeiramente foi o relato do estudo de DNAm de células de cérebro humano de 7.000 anos preservado em sítios arqueológicos na Flórida, EUA (Pääbo et al., 1988). Estas células estavam aderidas em restos de esqueletos excelentemente preservados, devido às condições anaeróbicas e neutras nas regiões alagadas de turfeiras desta área.

Em seguida, o mesmo autor relata a manipulação de material genético de um bicho preguiça gigante de 13.000 anos (Pääbo, 1989).

Em 1990 surgiu a mais surpreendente revelação, na qual Edward Golenberg e seus colegas afirmavam ter isolado fragmentos de DNA de folhas de magnólia de 17 milhões de anos, encontradas em um depósito sedimentar em um lago em Idaho, EUA (Golenberg et al., 1990).

Neste trabalho, os autores isolaram um fragmento de 820 pb, que continha uma parte do gene *rbdL* (rubisco) do cloroplasto. Amplificaram via PCR, sequenciaram e compararam com a seqüência deste gene em espécies atuais do mesmo gênero, encontrando 17 substituições, das quais somente 4 não ocorriam na primeira e na segunda bases. A partir disto, pôde-se construir um dendrograma, relacionando este fóssil com as demais espécies analisadas.

Este relato foi seguido, em 1992 e 1993, pelo sucesso na extração de material genético de uma abelha e de formiga de 25 milhões de anos e de um gorgulho de 120 milhões de anos, todos estes naturalmente preservados em âmbar (DeSalle et al., 1992; Cano et al., 1993).

No caso da amostra de formiga, os autores amplificaram DNA ribossômico do núcleo (18S) e da mitocôndria (16S), assim como seqüências destes genes de espécies atuais de formigas, baratas e louva-deus. Observou-se que a seqüência do material arqueológico era muito próxima à da espécie de formiga *Mastotermes darwinienses*, a qual ocorre na Austrália e é considerada uma das espécies mais antigas ainda vivas de Dictyoptera. Ainda, esta análise sugeria que a formiga

arqueológica era o provável elo entre as formigas e as baratas (DeSalle et al., 1992).

Um trabalho evolutivo muito interessante envolvendo espécies em risco de extinção foi realizado por Wayne, citado por Lewin (1994). O alvo do estudo eram duas populações naturais de cães selvagens, uma localizada na África Oriental, a qual está sob forte risco de desaparecer e a outra, no sul da África.

Mesmo a população de cães selvagens do sul sendo maior (por volta de 300 indivíduos), geneticamente ela é muito uniforme. Existia a dúvida se esta baixa variabilidade genética seria devido a um efeito fundador ou se ela teria sofrido erosão genética no passado, reduzindo sua diversidade.

Para responder esta questão, os pesquisadores examinaram seqüências de DNAm extraídas de 10 peles de animais da região sul, caçados há mais de sete décadas e compararam com amostras da população atual. Os resultados mostraram que a variabilidade encontrada nas amostras de peles antigas era mais de três vezes maior do que a existente atualmente, mostrando que o que houve foi um estrangulamento da variabilidade, conhecido pelo efeito de gargalo de garrafa – (“bottleneck”), principalmente devido à caça indiscriminada destes animais até tempos mais recentes.

Em termos de Brasil, até onde sabemos, o trabalho pioneiro nesta área foi o estudo de 18 esqueletos humanos, de diferentes sítios arqueológicos do Brasil, principalmente no estado do Pará, e que se encontravam no Museu Paraense Emílio Goeldi (Ribeiro dos Santos et al., 1996).

Estes esqueletos possuem uma idade que varia de 500 anos até alguns com 4.000 anos. Neste trabalho, as autoras sequenciaram um fragmento mitocondrial de 354 pb, encontrando 13 grupos ou tipos genéticos distintos, conhecidos como haplótipos, definidos pela variação nas posições de 26 nucleotídeos.

Estas seqüências foram comparadas com outras encontradas na literatura para diversas amostras de populações nativas americanas e asiáticas/ mongólicas. Os resultados mostraram que 39% dos haplótipos não haviam sido descritos ainda, indicando uma grande diversidade existente para aquelas populações que aqui habitavam e sugerindo que houve uma grande perda desta variabilidade, provavelmente devido às conseqüências da colonização européia.

Trabalhos de resgate de DNA em amostras arqueológicas de plantas cultivadas

O estudo de plantas cultivadas pelas populações antigas também tem sido alvo de diversos trabalhos, visando identificar, por exemplo, a que raça pertence determinada amostra encontrada; deste modo saber as possíveis rotas migratórias das populações ao longo do tempo, quando e onde uma planta foi domesticada e por onde ela foi espalhada, disseminada, e quais as transformações por ela sofridas em sua evolução.

O estudo de sementes arqueológicas pode trazer muitas informações a respeito de como era a cultura de um determinado povo em uma dada época, sua relação com outras populações e como ela evoluiu.

Um destes trabalhos é o de Rollo et al. (1991), que estudaram ácidos nucleicos de sementes de milho pré-colombiano, fossilizadas, datadas de 900 anos, encontradas em um túmulo na costa do Peru.

Nesta análise, os autores usaram primers para amplificar seqüências Mu, que são elementos transponíveis encontrados em diversas formas (seqüências) e quantidades dentro da espécie do milho – *Zea mays mays*, variando de raça para raça o tipo de elemento Mu e quantas vezes ele aparece no genoma.

Eles amplificaram fragmentos de 90 a 200 pb e compararam com diversas raças de milho atuais, encontrando elementos do tipo Mu1, Mu4, Mu8 e possivelmente Mu5, permitindo um avanço no estudo da evolução da domesticação do milho.

Outro trabalho que utilizou a técnica do DNA ancião em amostras de milho foi o de Goloubinoff et al (1993), no qual os autores trabalharam com amostras modernas de milho, teosinte e *Tripisacum*, além de 3 amostras arqueológicas encontradas nos Andes, sendo duas no Peru, uma na costa norte, de 4.700 ± 500 anos de idade e a segunda da região de Junín, a 3.700 metros de altitude com idade de 440 ± 30 anos, além de um sítio na costa norte do Chile, com idade de 1500 ± 50 anos.

Os autores utilizaram, como alvo de suas análises, o gene *Adh2* ou desidrogenase alcoólica, que está localizado no cromossomo número 4 no milho.

O estudo restringiu-se a uma pequena porção deste gene, com tamanho de 315 ± 15 nucleotídeos de comprimento.

Segundo os autores, os dados obtidos mostraram que a diversidade genética encontrada nas amostras arqueológicas era praticamente a mesma da encontrada nas modernas, indicando que não ocorreu alteração no nível de diversidade genética do milho ao longo dos últimos 4.500 anos. Estes resultados são contrários aos obtidos em trabalhos como o de Doebley et al. (1986), que, através da análise de isoenzimas em amostras modernas de milho e de parentes selvagens afirmaram que para o milho poder ter a diversidade atual seria necessário que ele tivesse tido uma rápida taxa evolutiva desde a sua domesticação. Para Goloubinoff et al. (1993), este fato poderia ser explicado pela ocorrência de alguns possíveis cenários no passado. Primeiro, que a diversidade do milho moderno seria reflexo de “input” de genomas de teosinte, via repetidas introgressões. Outra possibilidade seria a domesticação do milho, a partir de uma única, mas muito diversa população de teosinte ou, uma terceira, que as raças atuais de milho teriam sido originadas a partir de mais de um evento independente de domesticação, envolvendo populações de teosinte geograficamente e geneticamente distintas.

Freitas (2001) e Freitas et al. (aceito – em edição), usando amostras arqueológicas (Fig. 3), indígenas e tradicionais de milho do Brasil e do Paraguai e utilizando o mesmo alvo genético do trabalho de Goloubinoff et al (1993), apresentam conclusões sobre a difusão do milho para a América do Sul em tempos passados.

Foto: Nome Completo



Fig.3. Duas espigas de milho arqueológicas encontradas durante as escavações na Lapa do Boquete, Januária – MG, com idade de 1010 ± 40 anos, representantes de variedades que as populações daquela época manejavam, ao mesmo tempo.

Os dados dos estudos de Freitas (2001) e Freitas et al. (aceito – em edição) indicam que a entrada do milho na América do Sul ocorreu em dois momentos e seguindo rotas distintas. A primeira, por volta de 5.000 – 6.000 anos atrás, ocorreu a partir da América Central, descendo pelo lado oeste da América do Sul, nos Andes, até o Peru e Chile e, aparentemente, ficou restrita a estas regiões. Uma segunda expansão de tipos distintos de milho para a América do Sul, ocorrida provavelmente há 2.000 anos, se deu ao longo da costa leste, aparentemente através dos cursos principais de rios que deságuam no Oceano Atlântico.

Neste mesmo trabalho, os autores afirmam que as populações indígenas que habitavam a região de Januária, no norte de Minas Gerais e que manejaram as amostras de milho arqueológicas utilizadas no estudo, com idades entre 500 e 1010 anos, tinham, culturalmente, uma relação muito maior com as populações humanas da América Central e México, do que com as populações que habitavam a região Andina, na América do Sul. Esta conclusão se baseia no fato de que, até o momento, terem sido descritos três grupos de alelos para o gene *Adh2*, estando todos presentes em populações localizadas no centro de origem desta espécie, na América Central e México. Na América do Sul os três grupos de alelos também estão presentes, mas um dos grupos (mais primitivo) se encontra restrito a região andina, enquanto os outros dois grupos de alelos estão presentes principalmente na região das terras baixas, sendo um deles, até o momento, encontrado exclusivamente nesta última região, sugerindo um certo nível de isolamento cultural entre as populações das terras altas com as das terras baixas da América do Sul, pelo menos em termos do milho.

Segundo os autores, este isolamento cultural do passado foi ainda mais reforçado quando nosso continente foi colonizado pelos Europeus. Com isso, as terras baixas ficaram sob influência portuguesa e as terras altas com os espanhóis, aumentando o isolamento cultural antes existente entre as duas áreas da América do Sul.

Estes trabalhos indicam a possibilidade de uso de dados genéticos de amostras arqueológicas em estudos evolutivos de plantas e, em paralelo, sobre migrações humanas pré-históricas.

Considerações Finais

Para todos os estudos relatados anteriormente, os fragmentos de material genético arqueológico não são maiores que 800 pares de bases, sendo a maioria ao redor de 200 pares de bases. Este é um tamanho relativamente pequeno, quando comparamos que em organismos vivos o material genético está na ordem de milhões de pares de bases. Entretanto, mesmo estes pequenos pedacinhos podem trazer importantes informações para a identificação da espécie e sua comparação com as atuais.

Todos estes trabalhos, além de outros que surgem a cada dia, têm uma grande importância para a pesquisa científica. Através deles, podemos elucidar melhor a história evolutiva das diversas espécies e o grau de parentesco entre elas, montando a árvore genealógica de um grupo de organismos, raças, espécies, famílias,...

Entretanto, faltam ainda, muitos dados para ilustrar toda esta história, mas esperamos que este trabalho possa contribuir para que, junto com outros pesquisadores de áreas afins, usando materiais, técnicas e ferramentas complementares, possamos estar contribuindo para que esta história fique cada vez mais rica e precisa.

Por último, junto com estas técnicas e possibilidades de estudo, surgem também muitas discussões e controvérsias, como é o caso da questão ética. Muitos cientistas argumentam que se deve tomar cuidado com a divulgação de determinados dados resgatados do passado. Por exemplo, ao se investigar se o ex-presidente dos EUA, Abrahan Lincoln sofria de disfunções genéticas, a divulgação destes dados pode ser embaraçosa para seus descendentes atuais.

Com a técnica de recombinação e clonagem de espécies ganhando cada vez mais força, hoje em dia, outro aspecto em pauta envolvendo ética surge quando grupos de trabalho discutem a possibilidade de utilizar as informações do passado em espécies atuais, como por exemplo a reconstituição e o uso de alelos de raças do passado e que hoje não são mais encontrados.

Isto fica ainda mais complicado quando se aventa a possibilidade de se trazer à vida espécies extintas inteiras, como é o caso de projetos reais de grupos de

cientistas trabalhando em reviver o “quagga” africano e o conhecido “monstro da Tasmânia”, ambos os projetos em andamento. Mesmo sendo duas espécies que foram recentemente extintas devido à ação direta do homem, fica a dúvida se o equilíbrio evolutivo não sofreria novo abalo com este retorno de espécies. Quando se introduz na discussão a possibilidade de resgate de personagens humanos importantes de nossa história, isto adquire debates ainda mais calorosos.

Em suma, estas técnicas são mais uma ferramenta importante de estudo evolutivo e, como qualquer ferramenta, pode ser usada de uma forma correta ou não. Cabe ao pesquisador explorar as potencialidades de cada técnica e à sociedade, fiscalizar e sugerir os rumos que devem ser seguidos.

Tabela apresentando alguns dos principais marcos de resgate de DNA de amostras arqueológicas, mostrando as idades dos materiais e quando foram publicados e, para fins comparativos, é mostrado cronologicamente alguns dos principais eventos da história do homem e do planeta.

Resgate de DNA de Amostras Arqueológicas			Fatos históricos comparativos
Ano publicação	Material Resgatado e idade	Época (anos atrás)	Acontecimento
1984	DNA de peles de “quagga” de 100 anos de idade	4.000	Invenção do arado
1988	DNA de cérebro humano de 7.000 anos	8.000	Fundação de Jericó – Primeira cidade murada do mundo
		9.000 – 8.000	Domesticação dos primeiros animais e plantas – Revolução do Neolítico
1989	Bicho Preguiça de 13.000 anos	12.000	Primeiros homens nas Américas
1990	Músculo de mamute de 40.000 anos	300.000	Homem de Neanderthal adquire capacidade de falar
		4 Mi*	Homem começa a andar
1990	Folhas de Magnólia de 17 Milhões de anos	10 Mi	Ancestral do homem, que se separou dos gorilas e chimpanzés
1992	Abelha e formiga de 25 Milhões de anos	50–60 Mi	Radiação dos mamíferos, pássaro angiospermas, insetos polinizadores
1993	Gorgulho de 120 milhões de anos	65 Mi	Extinção dos dinossauros
		115 Mi	Origem das angiospermas
		135 Mi	Separação dos continentes
		144 Mi	Extinção em massa de espécies
		248 Mi	Origem dos mamíferos
		286 Mi	Maior extinção em massa já ocorrida (96% das espécies)
		450 Mi	Primeiros seres terrestres
		800 Mi	Origem dos eucariotos
		3,4 Bi **	Origem da vida

(*) Milhões de anos; ** Bilhões de anos.

Referências Bibliográficas

- ALLABY, R.G; JONES, M.K; BROWN, T.A. DNA in charred wheat grains from the Iron Age hillfort at Danebury, England. **Antiquity**, v. 68, p. 126-132, 1994.
- AUSTIN, J.J; ROSS, A.J; SMITH, A.B; FORTEY, R.A; THOMAS, R.H. Problems of reproducibility – does geologically ancient DNA survive in amber-preserved insects? **Proceeds of Royal Society of London**, v. 264, p. 467-474. 1997.
- CANO, R.J; POINAR, H.N; PIENIAZEK, J; ACRA, A; POINAR, G.O. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135- million-year-old weevil. **Nature**, v. 363, p. 536-538. 1993.
- DESALLE, R; GATESY, J; WHEELER, W; GRIMALD, D. 1992. DNA sequences from a fossil termite in oligo-miocene amber and their phylogenetic implications. **Science**, v. 257, p. 1933-1936.
- DOEBLEY, J. Molecular evidence and the evolution of maize. **Economic Botany**, v. 44 (3 supplement), p. 6-27, 1990.
- FREITAS, F.O. **Estudo genético evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays mays*, L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. Piracicaba. 125 f. 2001. 125 p. (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo, Piracicaba.
- FREITAS, F.O; ALLABY, R; BANDEL, G; BROWN, T. Genetics from pre-columbian maize from South America. **Journal of archaeological science**. Aceito – em edição.
- GOLENBERG, E.M; GIANNASI, D.E; CLEGG, M.T; SMILEY, C.J; DURBIN, M; HENDERSON, D; ZURAWSKI, G. Chloroplast DNA sequences from a Miocene Magnolia species. **Nature**, v. 344, p. 656-658, 1990.
- GOLOUBINOFF, P.; PÄÄBO, S.; WILSON, A.C. Evolution of maize inferred from sequence diversity of an *Adh2* gene segment from archaeological specimens. **Proceedings of Natural Academy of Science (USA)**, v. 90, p. 1997-2001. 1993.

HERRMANN, B; HUMMEL, S; **Ancient DNA: recovery and analysis of genetic materials from paleontological, archeological, museum, medical, and forensic specimens**. Springer Verlag, New York – USA, 1994, 262p.

HIGUCHI, R.G, WILSON, A. Recovery of DNA from extinct species. **Fed. Proceeds**, v. 43, p. 1557. 1984.

HIGUCHI, R.G; WRISCHNIK, L.A; Oakes, E; George, M; Tong, B; Wilson, A.C. Mitochondrial DNA of the extinct quagga: relatedness and extent of postmortem change. **Journal of Molecular Evolution**, v. 25, p. 283-287, 1987.

HOSS, M; PÄÄBO, S. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-bases purification method. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 16, p. 3913-3914, 1993.

KATO, Y.T.A. Cytological studies of maize (*Zea mays* L.) and teosint (*Zea mexicana* Schrader Kuntze) in relation to their origin and evolution. **University of Mass. Agriculture Station Bulletin**, v. 635, 1976.

LAWLOR, D.A; DICKET, C.D; HAUSWIRTH, W.W; PARHAM, P. Ancient HLA genes from 7500 year-old archeological remains. **Nature**, v. 349, p. 38-41, 1991.

LINDAHL, T; NYBERG, B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. **Biochemistry**, v.11, p. 3610-3618, 1972.

LEWIN, R. Fact fiction and fossil DNA. **New Scientist**, p. 38-41, jan. 1994.

MCCLINTOCK, B. Genetic and cytological studies of maize. **Washington Yearbook**, v. 58, p. 452-456, 1959.

MCCLINTOCK, B.; KATO, T.A.Y.; BLUMENSCHN, A. **Chromosome constitution of races of maize**. Colégio de Postgraduados, Chapingo, México, 1981. 519p.

MULLIS, K; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**, v. 55, p. 335-350, 1987.

PÄÄBO, S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. **Proceedings of Natural Academy of Science (USA)**, v. 86, p. 1939-1943, 1989.

PÄÄBO, S; GIFFORD, J; WILSON, A. Mitochondrial DNA sequences from a 7.000-year old brain. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 9775-9787, 1988.

PÄÄBO, S; HIGUCHI, R.G, WILSON, A.C. Ancient DNA and polymerase chain reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 9709-0712, 1989.

PRAGER, E.L; LOWENSTEIN, J.M; SARICH, V.M. Mammoth albumin. **Science**, July, p. 287-289, 1980

RIBEIRO DOS SANTOS, A; SANTOS, S; MACHADO, A.L; GUAPINDAIA, V; ZACO, M. Heterogeneity of mitochondrial DNA haplotypes in Pre-Columbian natives of the Amazon region. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 101, p. 29-37, 1996.

ROLLO, F. Characterisation by molecular hybridization of RNA fragments isolated from ancient (1400 B.C.) seeds. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 71, p. 330-333, 1985.

ROLLO, F; VENANZI, F.M; AMICI, A. Nucleic acids in mummified plant seeds: biochemistry and molecular genetics of pre-Columbian maize. **Genetical Researches**, v. 58, p. 193-201, 1991.

SAIKI, R.K; SCHARF, S.J; FALOONA, F; MULLIS, K.B; HORN, G.T; ERLICH, H.A; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SCOVSTED, A. Cytological studies in cotton. IV. Chromosome conjugation in interspecific hybrids. **Journal of Genetics**, v. 34, p. 97-134, 1937.