

DNA ANTIGO: OBTENÇÃO E ANÁLISE DE DADOS GENÉTICOS A PARTIR DE MATERIAL ARQUEOLÓGICO

MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES*

JOSÉ ALEXANDRE FELIZOLA DINIZ-FILHO**

RESUMO

In this review, theoretical and methodological issues on recovering and analyzing DNA in archaeological and paleontological material (ancient DNA) are discussed. The discovery that DNA survives in ancient material, at least for less than 100,000 years, helped to solve many problems in evolutionary biology, ecology, epidemiology and archaeology. There have been an exponential growth in the number of papers dealing with this subject since the middle 1980's, and an analysis of recent peer-review literature (1999-2003) revealed that around 38% of papers deal with animal and plant systematics and evolution, 25% refers to human evolution and 13% to paleopathology (mainly in human diseases). The remaining papers are review (7%) and methodological (18%) papers.

Palavras-chave: DNA, DNA antigo.

* Laboratório de Genética & Melhoramento, Departamento de Zootecnia, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil (tellesmpc@uol.com.br)

**Departamento de Biologia, MCAS/PROPE, Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brasil. Departamento de Biologia Geral, ICB, Universidade Federal de Goiás.

INTRODUÇÃO

O século XX foi marcado por descobertas na área da genética que possibilitaram o desenvolvimento de tecnologias com aplicações em diferentes áreas da ciência. A descoberta da estrutura do DNA em 1953, seguida da elucidação dos modelos de replicação desta molécula, possibilitou o surgimento de diversas metodologias que permitem atualmente acessar a informação genética contida diretamente no DNA.

A molécula de DNA (ácido desoxiribonucleotídeo) é composta por duas fitas, sendo que cada fita é formada por uma seqüência linear de nucleotídeos que são formados, por sua vez, por três componentes básicos: um grupo fosfato, um açúcar (pentose) e uma base nitrogenada. Os nucleotídeos de uma fita se ligam na outra fita por ligações químicas chamadas pontes de hidrogênio. Este tipo de ligação química possui características que permitem que as duas fitas do DNA se separem e se juntem em determinadas condições de temperatura e pH, por exemplo. Considerando que o único componente que varia no nucleotídeo é a base nitrogenada (adenina, timina, citosina e guanina), é esta seqüência que contém a informação genética que pode variar de um indivíduo para outro. A ligação de uma fita com a outra se faz pelas pontes de hidrogênio formadas entre as bases nitrogenadas das duas fitas. Devido a certas propriedades bioquímicas das bases, a adenina só pode parear com timina, enquanto que a guanina só pode parear com citosina, com duas e três pontes de hidrogênio, respectivamente (ver Lewin 2000, para uma revisão geral). Em um organismo multicelular complexo, como o Homem, há milhões de pares de base ao longo da seqüência do DNA.

O genoma das espécies, ou seja, sua seqüência total de DNA, é formado por regiões que contêm informações genéticas que normalmente são transcritas e traduzidas (genes) e regiões que normalmente não são transcritas e traduzidas (hipervariáveis). Nas regiões que os genes estão presentes, existem determinadas seqüências de bases que permitem que determinadas enzimas as reconheçam e realizem a "leitura", ou transcrição, da informação para a formação da característica respectiva. Por outro lado, as regiões hipervariáveis são formadas por seqüências de bases repetidas milhares ou até mesmo milhões de vezes e parecem estar relacionadas com os processos de regulação da expressão gênica ou simplesmente à manutenção da estrutura da molécula.

Em espécies diplóides (que possuem duas cópias do genoma), nas quais os indivíduos se reproduzem sexuadamente, a informação genética total de um indivíduo somente pode ser passada para a próxima geração através de células chamadas gametas. Para que isso ocorra, é necessário que o material genético seja duplicado e, em seguida, ocorra a divisão do material genético para a formação de uma nova célula (gameta), que é haplóide (ou seja, possui apenas uma cópia do genoma). Este processo é conhecido como meiose.

Durante o processo de evolução dos organismos vivos, diversos mecanismos de recombinação e mutação nessa molécula de DNA, aliados aos fatores evolutivos, originaram e “organizaram” a variabilidade genética, que é copiada durante a meiose e transmitida entre as gerações, permitindo que as populações e espécies se diferenciassem ao longo do tempo. Normalmente, devido às propriedades bioquímicas e estruturais do DNA, essa evolução ocorre de forma gradual, com velocidade aproximadamente constante (pelo menos para certas regiões específicas do DNA) e seguindo um processo aleatório no qual a divergência entre os pares de base de duas seqüências de DNA é diretamente proporcional ao tempo de separação entre linhagens, seguindo o chamado ‘relógio molecular’ (Kimura 1983). Isso permite que a história evolutiva dos organismos seja conhecida com uma precisão antes inimaginável, de modo que a utilização de dados genéticos em estudos evolutivos de diferentes espécies se expandiu muito rapidamente nos últimos 20 anos (Pagel 1999). Há, entretanto, uma grande limitação: a história deve ser reconstruída por extrapolação dos padrões genéticos atuais ao invés de observações diretas do registro fóssil ou arqueológico (Autin *et al.* 1997, Wayne *et al.* 1999).

Recentemente, os conhecimentos e técnicas dos biólogos moleculares permitiram acessar a informação genética de moléculas de DNA em restos de organismos conservados no registro arqueológico ou fóssil, o chamado ‘DNA antigo’ (aDNA) ou ‘paleo-DNA’. No início, estes procedimentos foram muito criticados por se tratar de uma técnica muito sensível, impulsionando diversos pesquisadores a trabalharem na padronização dessas técnicas e procedimentos, aumentando gradualmente a confiabilidade neste tipo de dado. Isso abriu um leque de possibilidades para estudos em arqueologia e paleontologia (ver Austin *et al.* 1997, Wayne *et al.* 1999, O’Rourke *et al.* 2000 e Hofreiter *et al.* 2001) (ver também “aplicações”). O objetivo deste artigo é discutir os principais as-

pectos metodológicos relacionados à extração, amplificação e análise do DNA antigo, bem como suas aplicações recentes em problemas arqueológicos, antropológicos, epidemiológicos, ecológicos e evolutivos.

PRESERVAÇÃO, EXTRAÇÃO E AMPLIFICAÇÃO DE DNA ANTIGO

DNA antigo (aDNA) diz respeito exclusivamente a ácidos desoxiribonucleotídeos isolados de plantas, animais ou microorganismos mortos há algum tempo, normalmente obtidos em estudos arqueológicos ou mesmo paleontológicos. Há, para casos mais recentes, uma sobreposição inevitável entre arqueologia e ciência forense, principalmente em termos de metodologias e objetivos. A análise do aDNA é também um dos objetos de estudo da chamada 'paleontologia molecular' que, de um modo geral, estuda as biomoléculas que podem ser extraídas de tecidos antigos, tais como pigmentos e polissacarídeos nas plantas (Hillman *et al.* 1993) e colágenos e hemoglobinas em animais (Cattaneo *et al.* 1995). As moléculas de aDNA normalmente são obtidas por processos não-invasivos a partir de cabelos, ossos, fezes ou sementes.

O DNA é uma molécula quimicamente instável que degrada espontaneamente, principalmente através de reações de hidrólise, oxidação e alquilação, que de uma maneira geral limitam a meia vida das biomoléculas (Willerslev *et al.* 2004). A hidrólise causa a retirada do grupo amina da base nitrogenada, levando à quebra da ligação que une o açúcar (desoxiribose) à base nitrogenada. Isso torna o DNA mais frágil por criar locais sem a base, tendo como consequência a fragmentação do DNA em pequenos pedaços. A oxidação leva a modificações químicas nas bases nitrogenadas e uma eventual destruição de partes das moléculas de açúcar e da base nitrogenada. O DNA também pode ser degradado por ação enzimática e por metilação não-enzimática (Austin *et al.* 1997). Esses processos espontâneos são, entre outros fatores, dependentes da disponibilidade de água, oxigênio, pH íons metais pesados e de agentes que promovem a alquilação (Hofreiter *et al.* 2001).

Nos organismos vivos, existem enzimas que constantemente realizam a função de reparo do DNA, evitando desta forma sua degradação. Mas, depois da morte, ocorre uma degradação espontânea da molécula de DNA, mesmo que ela esteja protegida da ação de enzimas biológicas e em condições ambientais propícias. As chances de um DNA

desprotegido sobreviver sobre longos períodos de tempo são baixas. Tem sido demonstrado que um fragmento de DNA com 800 pares de base, em solução fisiológica a 15°C, leva de 5.000 a 10.000 anos para se degradar. Como conseqüência, cálculos teóricos sugerem que o DNA só deve sobreviver por cerca de 100.000 anos, o que de fato limita a resolução de problemas envolvendo aDNA a qualquer material biológico mais recente do que essa idade (Wayne *et al.* 1999; mas ver Geigl 2002).

Sob condições tafonômicas normais, os organismos são rapidamente e eficientemente reciclados depois de sua morte. Certos desvios destas condições normais, particularmente eventos que ocorrem logo após a morte do organismo, podem eventualmente levar à preservação ou fossilização, principalmente dos tecidos mais rígidos (Geigl 2002). Ainda há discussão sobre os modelos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na conservação do DNA em tecido ósseo, mas sabe-se que, em certas condições, o DNA tende a ser absorvido pela hidroxiapatita do osso e que o colágeno é um dos componentes fundamentais para essa preservação. A combinação desses dois elementos em ossos antigos é um bom preditor da qualidade do aDNA (Gotherstrom *et al.* 2002). Os ambientes frios são os melhores para o armazenamento e preservação de tecidos de uma maneira geral e, conseqüentemente, de ácidos nucléicos, pois fornecem as condições para que as taxas das reações de degradação do DNA permaneçam com magnitudes mínimas. A cada 10 graus de declínio na temperatura média, as taxas de degradação se reduzem em uma ordem de magnitude (Willerslev *et al.* 2004). De fato, Haynes *et al.* (2002) encontraram uma correlação significativa entre características macroscópicas e histológicas de ossos animais da Idade Média e a presença de DNA em boas condições de preservação. Outras condições tafonômicas, tais como a deposição de tecidos em ambientes secos e anaeróbios (e.g. preservação em âmbar – ver Rogers *et al.* 2000 - ou em certas cavernas profundas em climas frios e secos), também podem favorecer a preservação de ácidos nucléicos.

Os estudos com aDNA são fortemente dependentes de uma técnica desenvolvida em 1983, conhecida como Reação em Cadeia da Polimerase, ou PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Essa técnica consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma enzima conhecida como DNA polimerase. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (aATP, dCTP, dTTP e dGTP) e de oligonucleotídeos

sintéticos, complementares à região do DNA que se deseja amplificar. Esses oligonucleotídeos, denominados “iniciadores” ou “*primers*”, funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde. Cada ciclo de PCR envolve: a desnaturação do DNA alvo, obtida pela elevação da temperatura para 92°C a 95°C; o anelamento dos *primers* por redução da temperatura até o ponto ideal; e extensão da síntese da nova fita de DNA; as fitas recém sintetizadas passam a funcionar como molde para o próximo ciclo. Ao final de vários ciclos, obtém-se acúmulo exponencial de cópias da região delimitada pelo *primer* (Ferreira & Grattapaglia 1998). Portanto, esse processo de amplificação permitiu recuperar informações genéticas a partir de material que contém quantidades mínimas de DNA, tais como material arqueológico ou fóssil, já que, a partir dessa pequena quantidade inicial, milhões de cópias da região de interesse são obtidas.

Entretanto, por se tratar de uma técnica muito sensível, existem grandes problemas na recuperação de seqüências de aDNA autênticas, confiáveis e não-ambíguas. O primeiro problema é a qualidade do aDNA extraído com relação à fragmentação do mesmo, pois isso tende a gerar artefatos da amplificação, no qual uma mesma região de interesse do aDNA pode aparecer nas análises como múltiplos fragmentos, dando a impressão de que há mais variabilidade, ou diferenças genéticas, do que de fato há (Eshleman & Smith 2001, Culjkovic *et al.* 2003). O outro problema ocorre porque a presença de qualquer material genético exógeno (contaminante) compete, durante a amplificação, com o DNA endógeno que exista no material antigo, de modo que grande parte dos fragmentos amplificados será oriundo do DNA contaminante e não do fragmento do aDNA de interesse. Essa situação se agrava se o DNA exógeno for originário de organismos recentes e que provavelmente estará menos degradado e em melhores condições para sua amplificação. Isso gera maiores problemas quando são analisados restos humanos, já que a maior parte da contaminação ocorreria durante a obtenção do material em campo ou nos museus e sua subsequente manipulação em laboratório. Nesses casos, o DNA contaminante seria em geral DNA humano, tornando mais difícil distinguir o DNA endógeno do exógeno. Assim, grande parte da literatura metodológica sobre aDNA discute os problemas de contaminação e diferentes estratégias de controle têm sido propostas (ver Montiel *et al.* 2001, Nicholson *et al.* 2002, Yang *et al.* 2003, Pusch & Bachman 2004).

APLICAÇÕES

Após os primeiros trabalhos publicados em meados da década de 1980 (Wayne *et al.* 1999), houve um crescimento exponencial no número de artigos sobre aDNA na literatura internacional (Fig. 1). Uma busca pelo “*Web of Science*” do ISI (*Institute for Scientific Information*), realizada em maio de 2004, utilizando as palavras-chave “ancient DNA” ou “fossil DNA” revelou um total de 252 artigos publicados nos últimos cinco anos (1999-2003), já excluindo artigos que apenas citavam a possibilidade de aplicação das técnicas. Uma análise dessa amostra da literatura permite uma síntese geral dos problemas elucidados pelas técnicas de aDNA, bem como seus problemas teórico-metodológicos e as tendências de aplicação futura (ver também Austin *et al.* 1997, Wayne *et al.* 1999, O’Rourke *et al.* 2000 e Hofreiter *et al.* 2001, para revisões gerais).

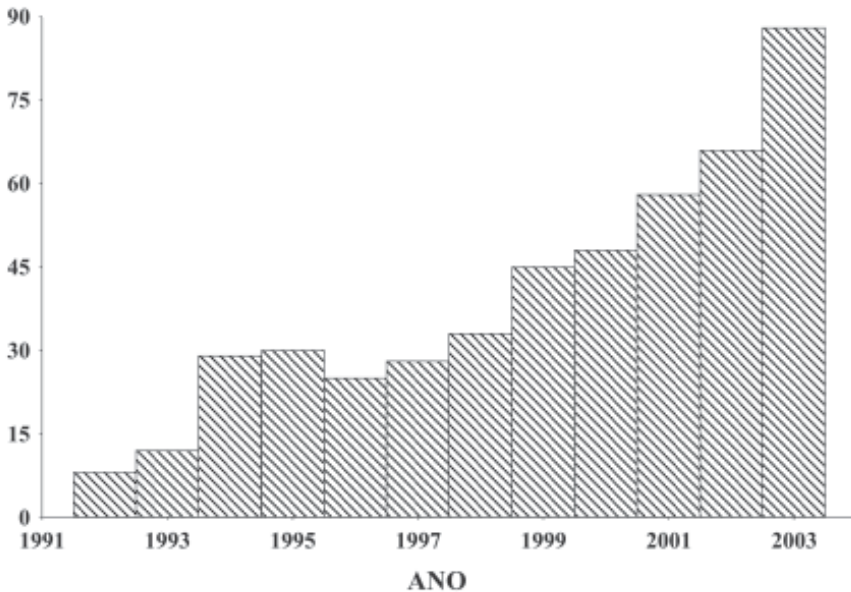


Figura 1. Número de artigos publicados entre 1991 e 2003 indexados no “*Institute for Scientific Information*” (ISI), contendo as palavras “ancient DNA” ou “fossil DNA”.

Inicialmente, a grande maioria dos estudos avaliou DNA extraído de material com menos de 5.000 anos de idade, embora alguns estudos tenham lidado com material bem mais antigo, com até 100.000 anos (Fig. 2). Poucos estudos recentes têm tentado demonstrar a existência de aDNA em material com mais que 100.000 anos, após diversas tentativas iniciais que se mostraram, posteriormente, artefatos devidos à contaminação com DNA exógeno ao material examinado (Wayne *et al.* 1999).

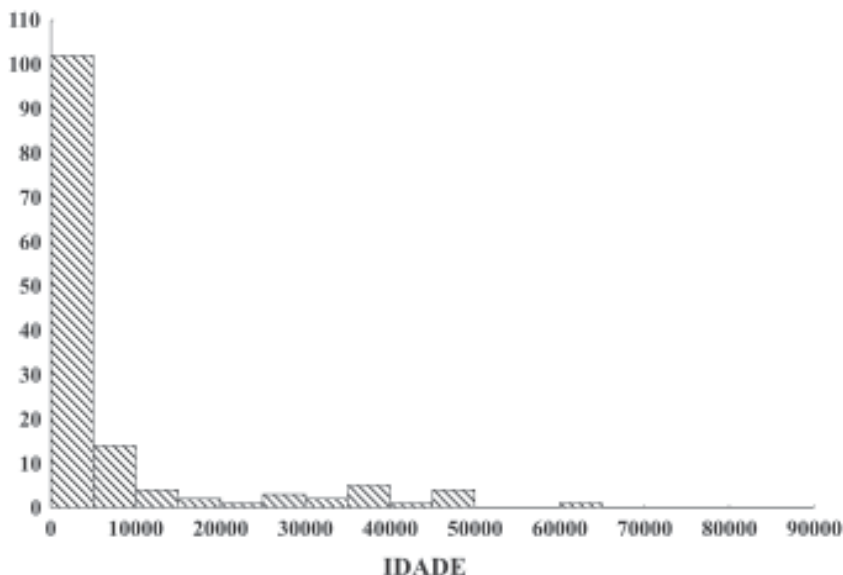


Figura 2. Distribuição das idades (em anos) dos 'DNA antigos' obtidos a partir dos artigos publicados entre 1999 e 2003, indexados no "Institute for Scientific Information" (ISI), contendo as palavras "ancient DNA" ou "fóssil DNA". Os poucos casos com mais de 100.000 anos foram excluídos (ver Wayne *et al.* 1999).

Os 252 resumos obtidos no "Web of Science" entre 1999 e 2003 (além de uns poucos de 2004) foram classificados em cinco grupos, para fins de uma discussão geral dos diferentes usos do aDNA em sistemática, ecologia, evolução, epidemiologia e arqueologia (Fig. 3).

A maior parte dos estudos (37,6%) concentra-se na análise de relações evolutivas em animais e plantas, especialmente no que se refere ao parentesco entre espécies extintas recentemente e seus congêneres atuais, bem como a própria definição de espécies extintas (que muitas

vezes é difícil com base apenas em material ósseo, em geral fragmentado). Alguns estudos procuram testar hipóteses mais específicas, tais como sexagem em moas (*Dinornis*), aves gigantes não-voadoras extintas da Nova Zelândia (Huynen *et al.* 2003). Outros estudos têm focado questões sobre conservação da biodiversidade, incluindo análises da perda de diversidade genética recente em populações de espécies ameaçadas de extinção, principalmente pela comparação de material preservado em museus com material atual (Weber *et al.* 2000, Hofreiter *et al.* 2003, Grativol, 2003).

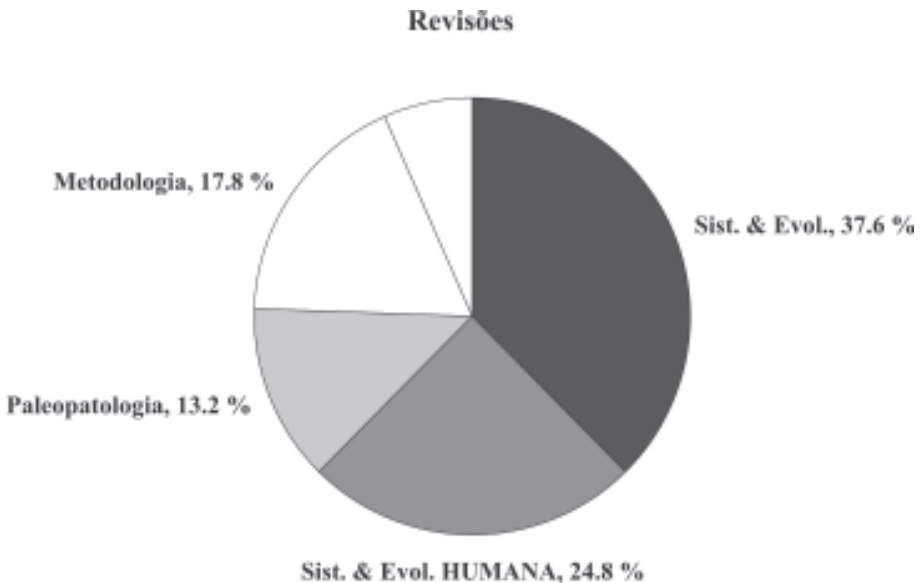


Figura 3. Distribuição percentual dos artigos publicados entre 1999 e 2003, indexados no “*Institute for Scientific Information*” (ISI), contendo as palavras “*ancient DNA*” ou “*fossil DNA*”, classificados nas seguintes categorias: 1) sistemática e evolução de animais e plantas (Sist & Evol); 2) sistemática e evolução humana (Sist & Evol. Humana); 3) paleopatologia; 4) artigos metodológicos e; 5) artigos de revisão.

Alguns estudos, além disso, merecem destaque pelos seus objetivos mais específicos ligados a questões arqueológicas e utilização de animais e plantas pelo Homem. Por exemplo, Bernardo *et al.* (2004) analisaram os restos de eqüinos encontrados nas ruínas de Herculano e Pompéia, mostrando sua relação com as formas modernas. Vários estu-

dos estão relacionados com a origem da agricultura e dos agricultores (Jones & Brown 2000, Benedetto *et al.* 2000), bem como de espécies domesticadas, incluindo análises do gado usado pelos Vikings no século XIX (Edwards *et al.* 2003), os efeitos iniciais da seleção artificial sobre o milho no México há 4.400 anos atrás (Jaenicke-Despres *et al.* 2003), os primeiros processos de fermentação alcoólica e a utilização de papiros no Egito antigo (Marota *et al.* 2002, Cavaleiri *et al.* 2003), bem como a domesticação da uva, há 2.600 anos (Manen *et al.* 2003). Outros estudos em animais podem também revelar ou corroborar aspectos sócio-culturais importantes como, por exemplo, uma análise do comércio entre romanos e bizantinos no século II pela análise de aDNA de certas espécies de peixes encontradas no registro arqueológico (Arndt *et al.* 2003), bem como a utilização de restos de ursos em cerimônias de tribos japonesas antigas (Masuda *et al.* 2001).

Estudos das relações evolutivas entre populações humanas são também muito freqüentes. Merecem destaque os diversos estudos em restos de *Homo neanderthalensis* (Hoss 2000), tanto pela antiguidade do material quanto pelos testes de hipóteses importantes para a compreensão da evolução do Homem moderno. Esses estudos, de um modo geral, mostram que não houve contribuição significativa das populações de Neanderthal para o *pool* gênico do Homem moderno e, de certo modo, não apóiam a hipótese multi-regional para a origem das populações humanas modernas (Serre *et al.* 2004, Caramelli *et al.* 2003, Schmitz *et al.* 2002, Gutierrez *et al.* 2002, Relethford 2001, Scholz *et al.* 2000).

Outros estudos em populações humanas mais recentes passam a estar claramente sobrepostos aos estudos em ciência forense, e procuram resolver questões específicas em personagens históricas, tais como por exemplo a identificação da família Romanov, morta após a revolução russa em 1917 (Knight *et al.* 2004), o destino de Luis XVII (Jehaes *et al.* 2001) e até mesmo a possível identificação do corpo do evangelista Lucas (Vernesi *et al.* 2001). Discutem-se também as questões éticas envolvidas na análise de aDNA em personalidades históricas, especificamente no caso do faraó Tutancamon (Holm 2001). Há também estudos que procuram testar hipóteses comportamentais mais específicas, tais como práticas de infanticídio na Bretanha ocupada pelo império Romano (Mays & Faerman 2001) e, indiretamente, os hábitos sexuais em conventos medievais através da análise de esqueletos de crianças encontradas nos cemitérios (Cunha *et al.* 2000). Análises confirmatórias

de sexagem são também importantes, e podem ser úteis na associação de vestimentas e outros acessórios mortuários ao sexo dos restos humanos (Effros, 2000). Bem mais discutíveis, sem dúvida, são estudos que levantam a possibilidade de extrair DNA humano a partir de restos de objetos de artes ou material lítico (a fim de tentar determinar os tipos de animais caçados), e mesmo a partir de pinturas rupestres (Burger *et al.* 2000, Kimura *et al.* 2001, Mawke *et al.* 2002).

Os estudos em paleopatologia, principalmente os associados com doenças humanas, ocupam um lugar de destaque na literatura (13,2%). Alguns trabalhos em paleopatologia, entretanto, analisam patologias em outros organismos associados ao Homem como, por exemplo, a dispersão do patógeno responsável pela “fome das Batatas” na Irlanda (Ristaino 2002). Os estudos em paleopatologia permitiram identificar, por exemplo, o primeiro caso de tuberculose na Inglaterra, há mais de 4.000 anos atrás (Mays & Taylor 2003), bem como a presença de doença de chagas em múmias chilenas da mesma época (Madden *et al.* 2001). Há também muita discussão sobre o agente etiológico da peste negra na Europa, em função da análise do DNA proveniente de esqueletos humanos de diversos cemitérios dos séculos XIII a XVII (Raoult *et al.* 2000, Wood *et al.* 2003, Gilbert *et al.* 2004).

Esses diversos exemplos mostram o potencial de utilização do aDNA em estudos de arqueologia, ecologia, evolução e epidemiologia. Um ponto importante é que muitas dessas aplicações ainda estão sujeitas a controvérsias, especialmente pela falta de metodologias específicas e confiáveis capazes de eliminar efeitos de contaminação do material antigo por DNA exógeno atual, especialmente quando esse material é humano. Apesar disso, as técnicas têm se tornado cada vez mais confiáveis e, sem dúvida, a análise do aDNA permitirá cada vez mais testar hipóteses e levantar novas questões nessas diferentes áreas do conhecimento.

REFERÊNCIAS

ARNDT, A. *et al.* 2003. Roman trade relationships at Sagalassos (Turkey) elucidated by ancient DNA of fish remains. *Journal of Archaeological Science* 30: 1095-1105.

AUSTIN, J. J., Smith, A. B. & Thomas, R. H. 1997. Paleontology in a molecular world: the search for authentic ancient DNA. *Trends in Ecology & Evolution* 12: 303-306.

BENEDETTO, G. *et al.* 2000. Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from Alps. *European Journal of Human Genetics* 8: 669-677.

BERNADO, G. *et al.* 2003. Genetic characterization of Pompeii and Herculaneum equid buried by Vesuvius in 79 AD. *Journal of Cellular Physiology* 199: 200-205.

BURGER, J. *et al.* 2000. Paleogenetics and cultural heritage: species determination and STR-genotyping from ancient DNA in art and artifacts. *Thermochimica Acta* 365: 141-146.

CARAMELLI, D. *et al.* 2003. Evidence for a genetic discontinuity between Neandertals and 24,000-year old anatomically modern Europeans. *PNAS* 100: 6593-6597.

CATTANEO, C. *et al.* 1995. Differential survival of albumin in ancient bone. *Journal of Archaeological Science* 22: 271-276.

CAVALIERI, D. *et al.* 2003. Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of Molecular Evolution* 57: S226-S232.

CULJKOVIC, B. *et al.* 2003. Poly(A) tailing of ancient DNA: a method for reproducible microsatellite genotyping. *Analytical Biochemistry* 318: 124-131.

CUNHA, E. *et al.* 2000. Children at the convent: comparing historical data, morphology and DNA extracted from ancient tissues for a sex

diagnosis at Santa Clara-a-Velha (Coimbra, Portugal). *Journal of Archaeological Science* 27: 949-952.

Edwards, C. J. *et al.* 2003. Feasibility and utility of microsatellite markers in archaeological cattle remains from a Viking age settlement in Dublin. *Animal Genetics* 34: 410-416.

Effros, B. 2000. Skeletal sex and gender in Merovingian mortuary archaeology. *Antiquity* 74: 632-639.

Eshleman, J. & Smith, D. G. 2001. Use of Dnase to eliminate contamination in ancient DNA analysis. *Electrophoresis* 22: 4316-4319.
Ferreira, M. & Grattapaglia, D. 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares. 2^a. ed. Brasília, Embrapa.

Geigl, E. M. 2002. On the circumstances surrounding the preservation and analysis of very old DNA. *Archaeometry* 44: 337-342.

Gilbert, M. T. P. *et al.* 2004. Absence of *Yersinia pestis*-specific DNA in human teeth from five European excavations of putative plague victims. *Microbiology – SGM* 150: 341-354.

Gotherstrom, A. *et al.* 2002. Bone preservation and DNA amplification. *Archaeometrics* 44: 395-404.

Grativol, A. D. 2003. *DNA antigo e genética da conservação do mico leão dourado (Leontopithecus rosalia): estrutura genética em duas escalas de tempo e sua relação com a fragmentação da Mata Atlântica*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense (UNF), Campos de Goytacases, RJ, 61 p.

Gutierrez, G., Sanchez, D. & Marin, A. 2002. A reanalysis of the ancient mitochondrial DNA sequences recovered from Neandertal bones. *Molecular Biology and Evolution* 19: 1359-1366.

Haynes, S. *et al.* 2002. Bone preservation and ancient DNA: the application of screening methods for predicting DNA survival. *Journal of Archaeological Science* 29: 585-592.

Hillman, G. *et al.* 1993. Identifying problematic remains of ancient plant foods: a comparison of the role of chemical, histological and morphological criteria. *World Archaeology* 25: 94-121.

Hofreiter, M. *et al.* 2001. Ancient DNA. *Nature Review of Genetics* 2: 253-360.

Hofreiter, M. *et al.* 2003. Mitochondrial DNA sequence from an enigmatic gorilla population. *American Journal of Physical Anthropology* 121: 361-368.

Holm, S. 2001. The privacy of Tutankhamen – utilizing the genetic information in stored tissue samples. *Theoretical Medicine and Bioethics* 22: 437-449.

Hoss, M. 2000. Neanderthal population genetics. *Nature* 404: 453-454.

Huyen, L. *et al.* 2003. Nuclear DNA sequences detect species limit in ancient moa. *Nature* 425: 175-178.

Jaenicke-Despres, V. *et al.* 2003. Early allelic selection in maize as revealed by ancient DNA. *Science* 302: 1206-1208.

Jehaes, E. *et al.* 2001. Mitochondrial DNA analysis of the putative heart of Louis XVII, son of Louis XVI and Marie-Antoinette. *European Journal of Human Genetics* 9: 185-190.

Jones, M. & Brown, T. 2000. Agricultural origins: the evidence of modern and ancient DNA. *Holocene* 10: 769-776.

Kimura, M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge, Cambridge University press.

Kimura, B. *et al.* 2001. Analysis of DNA from ethnoarchaeological stone scrapers. *Journal of Archaeological Science* 28: 45-53.

Knight, A. *et al.* 2004. Molecular, forensic and haplotypic inconsistencies regarding the identity of Ekaterinburg remains. *Annals of Human Biology* 31: 129-138.

Lewin, B. 2000. *Genes VII*. Oxford, Oxford University press.

Madden, M. *et al.* 2001. Hybridization screening of very short PCR product for paleoepidemiological studies of Chaga's disease. *Biotechniques* 30: 102+.

Manens, J. F. *et al.* 2003. Microsatellites from archaeological *Vitis vinifera* sedes allow a tentative assignment of the geographical origin of ancient cultivars. *Journal of Archaeological Science* 30: 721-729.

Marota, I. *et al.* 2002. DNA decay rate in papyri and human remains from Egyptian archaeological sites. *American Journal of Physical Anthropology* 117: 310-318.

Masuda, R., Amano, T. & Ono, H. 2001. Ancient DNA analysis of brown bear (*Ursus arctus*) remains from archaeological site of Rebun island, Hokkaido, Japan. *Zoological Science* 18: 741-751.

Mays, S. & Faerman, M. 2001. Sex identification of some putative infanticide victims from Roman Britain using ancient DNA. *Journal of Archaeological Science* 28: 555-559

Mays, S. & Taylor, G. M. 2003. First prehistoric case of tuberculosis from Britain. *International Journal of Osteoarchaeology* 13: 189-196.

Mawke, E. J., Hyman, M. & Rowe, M. W. 2002. Re-examination of ancient DNA in Texas rock paintings. *Journal of Archaeological Science* 29: 301-306.

Montiel, R., Malgosa, A. & Francalacci, P. 2001. Authenticating ancient human mitochondrial DNA. *Human Biology* 73: 689-713.

Nicholson, G. J. *et al.* 2002. Detection of bone glue treatment as a major source of contamination in ancient DNA analysis. *American Journal of Physical Anthropology* 118: 117-120.

O'Rourke, D. H., Hayes, M. G. & Carlyle, S. W. 2000. Ancient DNA studies in physical anthropology. *Annual Review of Anthropology* 29: 217-242.

Pagel, M. D. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401: 877-884.

Pusch, C. M. & Bachman, L. 2004. Spiking of contemporary human template DNA with ancient DNA extracts induces mutations under PCR and generates nonauthentic mitochondrial sequences. *Molecular Biology & Evolution* 21: 957-964.

Raoult, D. *et al.* 2000. Molecular identification by 'suicide PCR' of *Yersinia pestis* as the agent of Medieval Black Death. *PNAS* 97: 12800-12803.

Relethford, J. H. 2001. Absence of regional affinities of neandertal DNA with living humans does not reject multiregional evolution. *American Journal of Physical Anthropology* 115: 95-98.

Ristaino, J. B. 2002. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Microbes and Infections* 4: 1369-1377.

Rogers, S. O. *et al.* 2000. DNA changes in tissues entrapped in plant resins (the precursors of amber). *Naturwissenschaft* 87: 70-75.

Scholz, M. *et al.* 2000. Genomic differentiation of Neanderthals and anatomically modern man allows a fossil-DNA-based classification of morphologically indistinguishable hominid bones. *American Journal of Human Genetics* 66: 1927-1932.

Schmitz, R. W. *et al.* 2002. The Neanderthal type revisited: interdisciplinary investigations of skeletal remains from the Neander Valley, Germany. *PNAS* 99: 13342-13347.

Serre, D. *et al.* 2004. No evidence of neandertal mtDNA contribution to early humans. *PLOS Biology* 2: 313-317.

Vernesi, C. *et al.* 2001. Genetic characterization of the body attributed to evangelist Luke. *PNAS* 98: 13460-13463.

Yang, D. Y., Eng, B. & Saunders, S. R. 2003. Hypersensitive PCR, ancient human mtDNA and contamination. *Human Biology* 75: 355-364.

Wayne, R. K., Leonard, J. A. & Cooper, A. 1999. Full of sound and fury: the recent history of ancient DNA. *Annual Review of Ecology & Systematics* 30: 457-477.

Weber, D. S. *et al.* 2000. An empirical genetic assessment of the severity of the northern elephant seal population bottleneck. *Current Biology* 10: 1287-1290.

Willerslev, E., Hansen, A. J. & Poinar, H. N. 2004. Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends in Ecology & Evolution* 19: 141-147.

Wood, J. W., Ferrel, R. D. & Dewitte-Avina, S. N. 2003. The temporal dynamics of the fourteenth-century Black Death: new evidence from English ecclesiastical records. *Human Biology* 75: 427-448.