



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

ODNAN GUIMARÃES LIMA

**EXTRAÇÃO DE DNA ANTIGO DE POPULAÇÕES NATIVO-AMERICANAS: UM
ESTUDO PIONEIRO BASEADO EM PROTOCOLOS INTERNACIONAIS**

FORTALEZA
2025

ODNAN GUIMARÃES LIMA

**EXTRAÇÃO DE DNA ANTIGO DE POPULAÇÕES NATIVO-AMERICANAS: UM
ESTUDO PIONEIRO BASEADO EM PROTOCOLOS INTERNACIONAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Allysson Allan de Farias.

FORTALEZA

2025

L699e Lima, Odnan Guimarães.

Extração de DNA antigo de populações nativo-americanas: um estudo pioneiro baseado em protocolos internacionais / Odnan Guimarães Lima. – 2025.

75 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Allysson Allan de Farias.

1. Extração de DNA antigo. 2. Extracta 32™. 3. extração de DNA por beads.
4. sequenciamento Sanger. 5. haplogrupos mitocondriais. I. Título.

CDD 615

ODNAN GUIMARÃES LIMA

EXTRAÇÃO DE DNA ANTIGO DE POPULAÇÕES NATIVO-AMERICANAS: UM
ESTUDO PIONEIRO BASEADO EM PROTOCOLOS INTERNACIONAIS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Farmácia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Allysson Allan de
Farias.

Aprovada em: 22/07/2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Allysson Allan de Farias (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Pedro Filho Noronha de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Felipe Pantoja Mesquita
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À minha mãe, Rose, por sempre me
apoiar em momentos de dúvidas

RESUMO:

O DNA ancestral (DNAa) é o material genético extraído de remanescentes arqueológicos, que tem sido frequentemente estudado em evolução humana e diversos outros estudos genéticos ao longo dos últimos 40 anos. Para isso, o fragmento ósseo ou dente é pulverizado e descalcificado, seguido pelo isolamento e pela purificação do DNAa, podendo ser acompanhada por métodos de suporte como reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de Sanger para aumentar o rendimento do DNAa extraído. Apesar do avanço internacional, esse campo teve pouco desenvolvimento no Brasil, sem registros de extrações realizadas exclusivamente em território nacional. Portanto, o presente trabalho objetivou descrever o primeiro protocolo adaptado para extração de DNAa exclusivamente no Brasil por método experimental em um laboratório NB-2. Diante disso, foi necessário preparar um ambiente esterilizado para a pulverização de dezesseis amostras de dentes do período pré-colonial. Após isso, a extração e purificação desse material foi realizada de forma automatizada com uso do Extracta 32™, que utiliza o método de *beads* magnéticas. A quantificação e qualificação do DNA extraído foram avaliadas com o uso do NanoDrop™. Posteriormente, a amplificação das regiões hipervariáveis 1 (HVR-1) e 2 (HVR-2) foi realizada por meio da técnica de PCR. Por fim, o sequenciamento de Sanger foi empregado para a triagem inicial dos haplogrupos mitocondriais presentes nas amostras amplificadas, com o objetivo de auxiliar a futura preparação da biblioteca para sequenciamento de nova geração (NGS). Todas as amostras apresentaram concentrações detectáveis de DNAa, variando de 8,3 ng/μL a 32,9 ng/μL, uma variação similar com os padrões observados em estudos anteriores da área. Além disso, a média da razão de absorbância A260/280 foi de 1,64, inferior a faixa ideal de 1.8, o que pode estar relacionado à natureza fragmentada e degradada do DNAa extraído. Ademais, a maior parte das amostras amplificou para pelo menos uma das HVRs e, quando sequenciadas por Sanger, houve a identificação de haplogrupos nativo-americanos (A, B, C ou D) em oito amostras. Portanto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que o fluxo de trabalho utilizado foi eficiente para obtenção de DNAa, o qual terá continuidade futura em um outro trabalho com uma análise mais robusta por NGS.

Palavras-Chaves: Extração de DNA antigo, Extracta 32™, extração de DNA por *beads*, sequenciamento Sanger, haplogrupos mitocondriais.

ABSTRACT:

Ancestral DNA (aDNA) refers to the genetic material extracted from archaeological remains, which has been extensively studied in human evolution and various other genetic investigations over the past 40 years. To obtain aDNA, a bone fragment or tooth is pulverized and decalcified, followed by isolation and purification of the DNA, often supported by methods such as polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing to increase the yield of extracted aDNA. Despite international advances, this field has seen little development in Brazil, with no records of extractions performed exclusively within the national territory. Therefore, the present study aimed to describe the first protocol adapted for aDNA extraction conducted entirely in Brazil using an experimental method in a BSL-2 laboratory. To that end, a sterile environment was prepared for the pulverization of sixteen tooth samples from the pre-colonial period. Subsequently, the extraction and purification of this material were carried out using the automated Extracta 32™ system, which employs a magnetic bead-based method. The quantification and qualification of the extracted DNA were evaluated using a NanoDrop™ spectrophotometer. The hypervariable regions 1 (HVR-1) and 2 (HVR-2) were then amplified using PCR. Finally, Sanger sequencing was employed for initial screening of mitochondrial haplogroups present in the amplified samples, aiming to support future library preparation for next-generation sequencing (NGS). All samples showed detectable concentrations of aDNA, ranging from 8.3 ng/μL to 32.9 ng/μL, a variation consistent with previously published data. Moreover, the mean A260/280 absorbance ratio was 1.64, slightly below the ideal range of 1.8, which may reflect the fragmented and degraded nature of the extracted aDNA. Additionally, most samples were successfully amplified for at least one of the HVRs, and Sanger sequencing identified Native American haplogroups (A, B, C, or D) in eight samples. Therefore, the results obtained in this study suggest that the workflow used was effective for retrieving aDNA, which will be further explored in a subsequent study involving more robust analysis through NGS.

Keywords: Ancient DNA extraction, Extracta 32™, DNA extraction by *beads*, Sanger sequencing, mitochondrial haplogroups.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Haplogrupos de DNA mitocondrial mais frequentes em populações continentais com suas respectivas estimativas temporais de origem em anos..	20
Figura 2: Esquema das etapas de ampliação do material genético que ocorre na PCR em cada ciclo de replicação.....	26
Figura 3: Esquema do sequenciamento de Sanger. Destacando as principais etapas do processo, começando com a replicação do material genético até a leitura dos dados.	27
Figura 4: Laboratório NB-2 utilizado durante a pulverização dos dentes e a extração do DNAa.....	34
Figura 5: Equipamentos e insumos utilizados para pulverização das amostras dentárias. Na primeira foto se tem as amostras, a broca e a microretífica utilizada para pulverização dos dentes, papel alumínio, álcool, além da lâmpada UV-C utilizada para irradiação da sala no interior da capela. Na segunda foto se tem a lampada UV-C portátil.	36
Figura 6: Foto dos dentes devidamente separados e classificados quanto ao local de escavação sobre a bancada do fluxo laminar recoberta com papel alumínio.	38
Figura 7: Extrator e purificador de DNA e RNA – Extracta® 32	40
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% das amostras na análise de amplificação das regiões mitocondriais (HSV1, HSV2) com e sem contraste. Nela, as amostras foram colocadas em sequência crescente (1 a 16), sendo os primeiros dezesseis poços para investigar a amplificação para HVR-1 e os dezesseis poços seguintes para amplificação da HVR-2.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Comparação entre os desempenhos dos métodos baseado em adsorção em sílica, em beads magnéticas e em extração orgânica por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico em relação ao rendimento do processo, tamanho do fragmento recuperado, grau de pureza, concentração de inibidores da PCR, eficiência da PCR e do sequenciamento na extração de DNAa.	24
Quadro 2: Requisitos para os diversos níveis de segurança biológica (I a IV). Sendo N: Abstenção de necessidade; S: Uso obrigatório; D: Uso desejável.	34
Quadro 3: EPIs utilizados ao longo da extração com relação a sua quantidade e ao seu valor (unitário e total).....	35
Quadro 4: Amostras dentárias coletadas com respectivo município de origem e o ano da campanha de escavação.	36
Quadro 5: Esquematização da localização das amostras na placa de 96 poços que foi utilizada para PCR. A coluna A e B analisou a amplificação da HVR-1 e a coluna C e D analisou a amplificação da HVR-2.....	43
Quadro 6: Valores das concentrações de DNAa em triplicata e a média dessas concentrações por amostra.	Error! Bookmark not defined.
Quadro 7: Valores da média da Concentração de DNA e da Razão de absorbância 260/280 pelo Nanodrop por amostra e seu respectivo sítio arqueológico.....	50
Quadro 8: Relação das amostras, as respectivas regiões mitocondriais amplificadas e sua razão de absorbância 260/280.	56
Quadro 9: Compilação dos resultados obtidos pelo sequenciamento de Sanger em relação a número da amostra, haplogrupo do DNAm, sítio arqueológico e sobre sua inclusão no NGS. O quadro foi colorido em verde para indicar inclusão e em vermelho para indicar exclusão do processo.	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	17
2.1. GERAL	17
2.2. ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1. DNA ancestral.....	18
3.1.1 DNA Mitocondrial	19
3.2 Amostras arqueológicas para extração de DNAa	20
3.3 Técnicas de extração de DNAa	22
3.4 Reação de Cadeia Polimerase	25
3.4 Sequenciamento de Sanger	26
3.5 História da investigação do DNA antigo	28
3.5.1 Processo de sequenciamento de DNA antigo no Brasil	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Obtenção de portaria do IPHAN para movimentação de vestígios arqueológicos e pesquisa	31
4.2 Estrutura do NPDM e o NB-2	31
4.3 Pré-tratamento do laboratório para extração de DNA antigo	33
4.4 Amostras utilizadas	35
4.5 Pulverização das amostras arqueológicas	36
4.6 Extração do DNA ancestral	39
4.7 Quantificação e verificação da pureza do DNA por espectrofotometria UV pelo NanoDrop™	41
4.8 Amplificação da região HVR-1 e HVR-2 por PCR:	42
4.9 Purificação do DNA:	44
4.10 Sequenciamento do DNAm pelo método de Sanger:	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1 Avaliação da qualidade e da quantidade de DNA extraído através da análise por Espectrofotometria UV pelo NanoDrop™	46
5.2 Caracterização e avaliação do DNA extraído através do gel agarose 2% ampliado por PCR	51
5.3 Identificação e análise da qualidade dos haplogrupos do DNA mitocondrial obtidos do Sequenciamento de Sanger	57
6 CONCLUSÃO:	61
REFERÊNCIAS:	62

1 INTRODUÇÃO

O DNA ancestral (DNAa) é compreendido como um material genético extraído de amostras arqueológicas, como ossos, dentes, cabelos e fragmentos de pele, o qual é capaz de preservar moléculas de DNA ao longo de milhares de anos (Chen; Nedoluzhko, 2023). A sua extração é um processo realizado há 40 anos no campo multidisciplinar arqueológico que visa, através da extração do material genético de remanescentes arqueológicos, compreender a multiplicidade dos processos evolutivos das espécies, inferências sobre a saúde e nutrição, e relações de parentesco (Dalal *et al.*, 2023). Atualmente, essa técnica possibilitou uma nova compreensão da história evolutiva humana, como, por exemplo, ao realizar a decodificação genética dos neandertais e compará-la com as informações do genoma humano, o trabalho de Green *et al.* (2010) avançou no entendimento acerca da ancestralidade humana ao descobrir que somos híbridos com trechos genômicos originários de uma outra espécie, *Homo neanderthalensis*. O impacto do DNAa foi tanto que o pesquisador sueco Svante Pääbo ganhou o prêmio Nobel em medicina em 2022.

O médico sueco Svante Pääbo foi pioneiro ao realizar a primeira extração de DNA de amostras humanas mumificadas, impulsionando esse novo campo científico ao redor do mundo (Pääbo, 1985). Após 25 anos, Svante Pääbo surpreendeu o entendimento sobre a ancestralidade da espécie humana moderna ao sequenciar o genoma do *Homo neanderthalensis* (Green *et al.*, 2010), e, em pesquisa paralela, sugerir a existência de uma espécie humana arcaica desconhecida, os Denisovanos, os quais existiram juntamente com os seres humanos e os neandertais (Reich *et al.*, 2010); os Denisovanos não apresentam consenso sobre a designação taxonômica (ex. *Homo denisova* ou *Homo alta*). Os três grupos de hominínios teriam cruzado entre si, resultando na hipótese de hibridização depois da saída da África há cerca de 250 mil anos com posterior extinção dos Neandertais e Denisovanos (Posth *et al.*, 2017). O entendimento dessa hibridização é bastante significativo para as ciências médicas, uma vez que esses o material genético hibridizado e segregado está associado com diversos processos fisiologicamente relevantes, como, por exemplo, o modo que nosso sistema imunológico reage contra infecções (Vespasiani *et al.*, 2022).

O processo de fundamentação das técnicas de DNA ancestral em humanos começou como um processo difícil e pouco otimizado. Na realidade, pelos primeiros 30 anos após a realização da primeira extração de DNA ancestral no mundo (Pääbo, 1985), os pesquisadores acreditavam que seria impossível codificar eficientemente de restos arqueológicos humanos, devido a incapacidade de diferenciar o material genético humano antigo da contaminação pelo material genético atual, o que tornaria esse processo, por muitos anos, quase exclusivamente realizado com amostras vegetais congeladas no permafrost (Hagelberg; Hofreiter; Keyser, 2015). O permafrost é um sedimento que permanece congelado por mais de dois anos e geralmente é encontrado em regiões bem frias como a Sibéria, ambiente perfeito para conservação de colágeno (Hagelberg; Hofreiter; Keyser, 2015).

O processo de extração de DNA ancestral humano que conhecemos atualmente se deu em 2000, quando foi publicado o manifesto: *“Ancient DNA: Do It Right or Not at All”*, o qual ao analisar os diversos estudos realizados nesse campo, compilou quais seriam os processos mínimos de pré-tratamento para diminuir a contaminação e legitimar os resultados de uma pesquisa, assim, padronizando o processo de extração de DNA ancestral pelos anos vigentes e permitindo a evolução desse campo científico (Cooper; Poinar, 2000). Os protocolos de extração de DNA antigo são bem parecidos com os protocolos de extração de DNA moderno de tecidos diversos (Rohland *et al.*, 2018; Rohland e Hofreiter, 2007). No entanto, a extração de DNA antigo resulta em ínfima quantidade de DNA endógeno, ou seja, DNA do humano arcaico da amostra estudada e não do ambiente, sendo um processo mais complicado e delicado do que a extração de DNA moderno, devido à instabilidade que esse DNA danificado ao longo do tempo se encontra.

Um dos grandes desafios no estudo do DNAa é manter a extração do DNA e a preparação da biblioteca ausente de contaminação (Llamas *et. al.*, 2016). O laboratório precisa ter uma cuidadosa preparação de descontaminação e, de preferência, apresentar um nível de biossegurança maior que 2 (BSL-2, do inglês *biosafety level 2*). No Brasil, até junho de 2025, não temos registros de extração de DNAa em laboratórios nacionais utilizando padrões internacionais. A extração de DNA de amostras brasileiras tem sido feita no Instituto Max Planck de Biologia Evolutiva em Leipzig (Alemanha) e na Universidade de Copenhagen (Dinamarca) sob liderança do Prof. André Strauss da Universidade de São Paulo (Moreno-Mayar *et al.*, 2018;

Posth *et al.*, 2018); e na Universidade de Emory sob a liderança do Prof. André Campelo da Universidade Atlântica da Flórida (Campelo dos Santos *et al.*, 2022).

As técnicas de extração variam, geralmente, de acordo com a natureza do tecido da amostra, as mais comuns são ossos petrosos e dentes (Clavel *et al.*, 2021). Ainda assim, a técnica de extração de DNAa mais amplamente utilizada pelos pesquisadores é baseada na separação do DNA por adsorção em partículas de dióxido de silício. Nesse processo, após utilizar uma solução tampão de lise numa amostra previamente transformada em pó para isolar o DNAa das outras moléculas orgânicas, é adicionado um tampão de ligação para separar o material genético do meio, possibilitando sua adsorção com a coluna de sílica, seguido pela sua extração (Rohland *et al.*, 2018). Para além dessa metodologia, similar a extração pelas partículas de dióxido de silício, o método de *beads* magnéticas utiliza-se de micropartículas paramagnéticas, as quais são, geralmente, compostas por sílica, para extrair o DNA por meio de sua adsorção com a sílica. Assim, devido às características magnéticas da partícula, utiliza-se um campo magnético para separar as micropartículas da solução dos contaminantes presentes no meio (Hawkins *et al.*, 2022).

Um ponto importante na análise de DNAa após a extração é o processo de amplificação por Reação de Cadeia Polimerase (PCR) e sequenciamento de Sanger do DNA mitocondrial (DNAMt) antes de partir para uma análise mais aprofundada por sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*). O processo de amplificação por Reação de Cadeia Polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*) submete o material genético à sucessivas reações dependentes de calor até que ele se encontre em uma quantidade suficiente para ser sequenciado (Wages, 2005). Contudo, esse material apresenta dificuldades quanto a sua amplificação, devido, principalmente, à contaminação dos vestígios arqueológicos com o ambiente, além do efeito degradante resultante da passagem de tempo (Chen; Nedoluzhko, 2023).

O sequenciamento de Sanger é realizado após a PCR, e é conhecido como método de terminação de cadeia de Sanger. Consagrou-se como um dos mais importantes métodos, atualmente, utilizados no sequenciamento de DNA (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977). Ele permite a decodificação dos nucleotídeos que compõem o material genético extraído, para, a partir disso, permitir aos pesquisadores alinharem

a sequência do DNAm t ancestral com a sequência de DNAm t de um humano moderno. Para este fim, o método de terminação de cadeia de Sanger utiliza-se de nucleotídeos terminais radioativamente marcados (didesoxinucleotídeos), o qual é seguido por uma eletroforese, permitindo a identificação dos nucleotídeos que compõem a cadeia de DNA (Al-shuhaib; Hashim, 2023).

A escolha do DNAm t se dá pela maior abundância de mitocôndrias no citoplasma, sendo, por isso, mais fácil de ser amplificado por PCR (Merheb *et al.*, 2019). O processo inicia-se pela escolha dos primers para sequenciar as regiões hipervariáveis do DNAm t, geralmente se sequencia por Sanger a região hipervariável I (HVR-1, do inglês *hypervariable region 1*) e região hipervariável 2 (HVR-2, do inglês *hypervariable region 2*) que apresentam variantes de importância evolutiva, cujo conjunto de variantes permite separar uma população de outra a partir de haplogrupos (Melchior *et al.*, 2008). Haplogrupos são conjuntos de variantes com importância filogenética que permitem separar uma população da outra e são representados por letras.

A partir deste método, é possível verificar variantes que causam distúrbios genéticos, marcadores importantes para investigação forense na identificação de pessoas desaparecidas e, o mais importante, para análise de DNAa, possibilitando no caso do Brasil, estimar e priorizar os haplogrupos nativo-americanos antes de seguir para o oneroso procedimento de NGS. Por exemplo, se for inferido um haplogrupo europeu para uma amostra arqueológica que foi datada para antes do contato com os portugueses (mais antiga que ~525 anos), é sinal de que houve contaminação na etapa de extração de DNA. A priorização, portanto, filtra só as amostras que apresentam haplogrupos mais frequentes em nativo-americanos (A, B, C ou D) antes de seguir para o estudo dos cromossomos sexuais e dos 22 pares de cromossomos autossomos. Essa priorização de haplogrupos nativo-americanos é inovadora e tem sido testada por nosso grupo do LABBAT (NPDM/UFC), mas não faz parte do escopo deste Trabalho de Conclusão de Curso.

Ainda assim, apesar de, a primeira extração de DNA ancestral ter acontecido há 40 anos e as técnicas envoltas desse processo terem evoluídos ao redor do mundo, essa área se desenvolveu de maneira desigual, o Brasil, por exemplo, apresenta um ritmo próprio no estudo de DNA ancestral, ainda que demonstre um grande potencial científico nessa área, não houve grande desenvolvimento científico. Apesar dessa

realidade, parte do acervo arqueológico nacional foi extraído e estudados em trabalhos de cientistas brasileiros, utilizando-se de instalações estrangeiras, o que enriqueceu o campo ancestralidade brasileiro (Ferraz et al., 2023; Silva et al., 2017). Ainda assim, nenhum desses trabalhos realizou, simultaneamente, a extração e análise em território nacional, o que evidencia um entrave a ser superado para impulsionar o campo de DNAa no Brasil (Bocchini, 2023).

Nesse sentido, entre as instituições interessadas em impulsionar essa área do conhecimento evolutivo, o Laboratório de Bioarqueologia Translacional (LABBAT) iniciou, em 2024, uma investigação experimental para a realização da extração e da análise do DNA ancestral obtido de amostras da arcada dentária de amostras de diferentes sítios arqueológicos do nordeste brasileiro, a qual seria realizada nas instalações do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamento (NPDM), em Fortaleza, sem a dependência de equipamentos e de laboratórios estrangeiros, os quais sempre foram utilizados nas recentes pesquisas brasileiras que efetuaram a extração de DNA ancestral, como o de Ferraz et al. (2023) e de Posth *et al.* (2018) e de Moreno-Mayar *et al.* (2018)

Esse desejo se originou pela vontade dos pesquisadores cearenses de aumentar a autonomia científica nacional ao propor uma padronização do método de extração de DNAa adaptado à realidade brasileira. Esta padronização, e posterior sequenciamento por NGS, permitirá obter conhecimento sobre populações do Nordeste a partir da identificação de variantes causadoras de doenças genéticas raras e multifatoriais, a partir da identificação de padrões de endogamia, padrões de seleção e pulsos de miscigenação com outras populações da América do Sul; permitirá também obter informações sobre rotas migratórias, e cruzar essas informações genômicas com fontes históricas (etnomapas e crônicas), registros linguísticos por análise filogenética, registros arqueológicos de cerâmica, líticos, pinturas e gravuras rupestres; dentre outras diversas aplicações para conhecimento de populações que habitaram nossa região por, no mínimo, 10 mil anos e sofreram com a invasão europeia ao longo de 525 anos, dentre outros trabalhos desenvolvidos por membros e colaboradores do LABBAT. Uma das potencialidades deste trabalho é iniciar um processo de padronização que, ao longo dos anos, avançará no barateamento dos custos por amostras nas etapas de extração e de sequenciamento por NGS, e na

disponibilização de dados genômicos de amostras de populações nativas já extintas para ajudar na melhoria da saúde da população brasileira miscigenada atual.

Portanto, urge a necessidade de avançar os estudos das técnicas de extração de DNA ancestral no Brasil para acompanhar o desenvolvimento desse procedimento já padronizado nas últimas décadas ao redor do mundo, popularizando este, relativamente novo, campo científico pelo território nacional. Para isso, é essencial propor formas para baratear e adaptar tais técnicas, e tais processos de pré-tratamento e de extração, de forma automatizada. Por isso, este trabalho se propõe a realizar a primeira extração de DNA ancestral inteiramente em solo brasileiro e sem o apoio de equipamentos ou laboratórios estrangeiros, tomando a documentação científica dos últimos 40 anos como ponto de partida para a investigação experimental desse procedimento pioneiro no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1. GERAL

Descrever a primeira extração de DNA ancestral de remanescentes humanos no Brasil por método experimental em NB-2.

2.2. ESPECÍFICOS

- Obter o protocolo e os reagentes necessários se adequando à realidade brasileira no Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM) da UFC;
- Padronizar a limpeza da sala limpa para obtenção de um DNAa sem contaminação;
- Propor a padronização de um método extrativo automatizado para obtenção de DNAa;
- Analisar os dados de extração à luz dos protocolos atuais para verificação da qualidade e quantidade de DNA obtidos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. DNA ancestral

A extração de DNA ancestral é um campo, relativamente novo, e de enfoque multidisciplinar que ainda não é totalmente difundido no Brasil. Para o melhor entendimento de suas propriedades e técnicas de extração, é necessário compreender, além de sua importância histórica e científica do entendimento evolutivo, as consequências de modificação do registro arqueológico que o material pode sofrer ao longo dos anos, as técnicas que são realizadas para sua recuperação em amostras arqueológicas e qual o principal tipo de amostra arqueológica utilizada, atualmente, nas pesquisas.

Sendo assim, o DNA ancestral (DNAa) é um material genético de diferentes organismos que pode possuir milhares de anos. Contudo, apesar de diferentes DNAa poderem apresentar diferentes idades biológicas, todas essas amostras partilham de degradação molecular em sua estrutura, onde, devido aos efeitos da interação do material genético com o ambiente nessa passagem de tempo, essas amostras tornam-se vulneráveis a processos de mutação de suas bases nitrogenadas, de contaminação ao interagir com as substâncias químicas existentes no ambiente, e de fragmentação por estarem expostas a temperaturas diversas. Portanto, o DNAa é, fundamentalmente, encontrado de forma degradada em milhares de partes, sendo, geralmente, recuperado em fragmentos entre 50 e 100 pares de base (pb) (Chen; Nedoluzhko, 2023)

Antigamente, o entendimento da evolução dos seres vivos, como o ser humano, era restrito ao campo da observação direta e da análise de material arqueológico, como antropometria de esqueletos (Neves; Hubbe, 2005), e de certos padrões biogeográficos (Hubbe; Neves; Harvati, 2010). Entretanto, atualmente, hipóteses evolutivas sobre o desenvolvimento humano podem ser inferidas de forma mais precisa ao analisar o DNA de amostras arqueológicas humanas ancestrais pelo DNAa. Essas análises vêm possibilitando aos cientistas a reconstrução de fundamentos filogenéticos previamente estabelecidos acerca da evolução humana ao contrastar a herança genética de populações antigas de diversas regiões geográficas do mundo com o padrão genético atual das populações vigentes (Dalal *et al.*, 2023).

Mas, quais são os marcadores que permitem interpretar de forma precisa a evolução humana?

3.1.1 DNA Mitocondrial

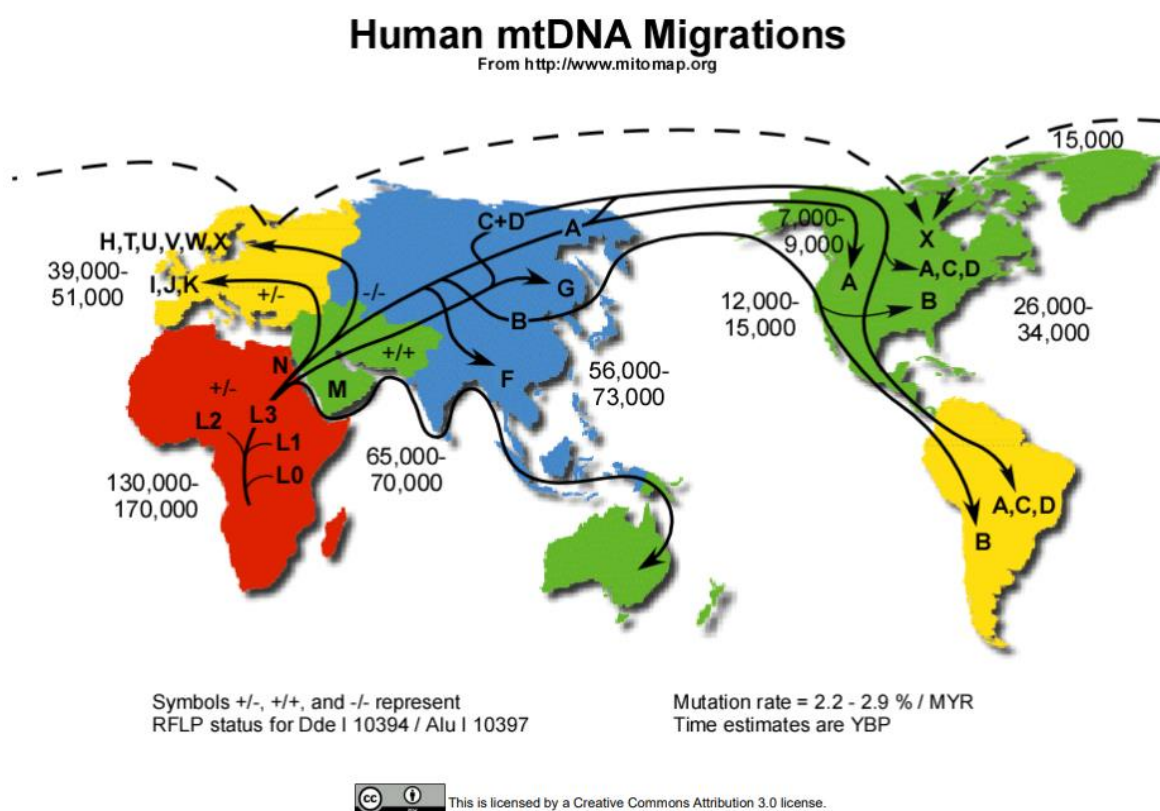
O DNAa pode ser amplificado e recuperado de dois principais tipo de material genéticos: o DNA nuclear, obtido do núcleo celular, e o DNA mitocondrial, o qual é obtido de uma organela celular, a mitocôndria, sendo que este, nas últimas décadas, tem se mostrada um importante alvo de interesse dentro do campo de DNA ancestral humano. Estudos como os de Cann; Stoneking; Wilson, (1987) e os de Briggs *et al.* (2009) utilizam-se especificamente do material genético de DNA mitocondrial para buscar explicações acerca da ancestralidade humana e de seu processo evolutivo.

Essa escolha não é por acaso, a mitocôndria é a única organela que possui material genético próprio, o DNA mitocondrial, herdado exclusivamente da progenitora da espécie. Isto atraiu bastante o interesse dos cientistas, devido sua extrema utilidade na recuperação do DNA ancestral humano, o qual apresentava grande especificidade, possibilitando, dessa forma, diferenciar o material de interesse em relação ao contaminantes de outras espécies. Nesse sentido, o DNA mitocondrial apresenta, ainda, outras características que o tornam mais vantajoso quando comparado ao DNA nuclear, como a alta quantidade de cópias no citoplasma da célula, o que aumenta sua chance de ser detectado durante a análise do material genético extraído de uma amostra arqueológica (Merheb *et al.*, 2019).

Além disso, o DNA mitocondrial é capaz de manter sua integridade por um tempo superior que o DNA nuclear e, devido a sua herança materna, possibilita estudar a relação evolutiva entre a mãe ancestral dos humanos arcaicos e dos humanos modernos atuais (Merheb *et al.*, 2019). Isso se deve a capacidade do DNA mitocondrial se manter inalterado por sucessivas gerações, embora que suas principais variantes com importância filogenética tenham surgido nos últimos dez ou oito mil anos, e outras tenham aparecido mais recentemente, especificando ainda mais os haplogrupos nativo-americanos A, B, C e D (Merriwether; Ferrell, 1996). Portanto, os geneticistas são capazes de estudar a história da linhagem materna de populações humanas por intermédio da leitura das mutações genéticas da sequência de DNA de suas mitocôndrias, como, por exemplo, o efeito de um haplogrupo específico na variabilidade genética de uma população (Gaeta, 2021). Este é um dos

principais marcadores utilizados no estudo de DNAa, mas quais são as amostras de populações pretéritas mais analisadas?

Figura 1: Haplogrupos de DNA mitocondrial mais frequentes em populações continentais com suas respectivas estimativas temporais de origem em anos.



Fonte: adaptada de MITOMAP.

3.2 Amostras arqueológicas para extração de DNAa

No campo da análise do DNAa, há um maior interesse entre os pesquisadores pelas amostras que apresentam uma maior riqueza de DNA endógeno intacto (espécie alvo) em relação ao DNA contaminante (outras espécies). Contudo, para muitas amostras, o conteúdo genético de interesse nesses materiais se mostra inferior a 1%, o que torna imprescindível a escolha de métodos de extração mais eficientes, a preparação adequada das bibliotecas genômicas para sequenciamento e a utilização de amostras arqueológicas com melhores taxas de preservação de DNA ancestral (Pinhasi *et al.*, 2015). Entre as amostras arqueológicas utilizadas na análise do DNA ancestral, a cóclea, uma pequena estrutura presente no ouvido interno na

porção petrosa do osso temporal é a amostra ideal de conservação do DNA antigo, devido a riqueza de DNA endógeno encontrado nessa estrutura (Clavel *et al.*, 2021; Sirak *et al.*, 2020). Todavia, nem sempre é possível ou é desejado a destruição dessa estrutura para a realização da análise molecular do DNA ancestral, uma vez que a análise envolve a destruição da peça arqueológica, colocando um impasse entre a pesquisa genética e a preservação óssea para futuras análises morfológicas das espécies (Parker *et al.*, 2020; Ponce de león *et al.*, 2018).

Nesse sentido, o dente vem se mostrando uma alternativa de amostra arqueológica popular e eficiente em relação a cóclea, uma vez que, mesmo não sendo tão ricamente preenchido com DNA endógeno como sua contraparte, apresenta vantagens que o tornam bastante interessante no contexto da análise do DNA ancestral. Por exemplo, os dentes apresentam uma menor objeção entre os pesquisadores quanto ao processo de perda do material arqueológico, dado que indivíduos possuem muito mais dentes do que ossos petrosos, tornado a perda desse material mais aceitável em uma visão de conservação histórica, além de uma maior resistência contra a decomposição, considerando que, em métodos tradicionais de extração de DNA ancestral, como o descrito no estudo de Rohland e Hofreiter (2007), o interesse dos pesquisadores é na dentina e na polpa, as quais permanecem intocadas no interior do esmalte dentário, onde o DNA endógeno encontra-se protegido da degradação *post-mortem* (Harney *et al.*, 2021). Além disso, outra importante qualidade relevante dos dentes refere-se a riqueza mineral e a alta celularidade presente no tecido dentário, sendo este constituído pelo esmalte, dentina, polpa e cemento, os quais produzem um ambiente favorável, tanto quimicamente quanto anatomicamente para investigação molecular do DNA (Higgins *et al.*, 2015).

Tradicionalmente, para a extração de material genético em amostras ósseas como dentes, a peça precisa ser pulverizada e descalcificada, visando, dessa forma, permitir a digestão das proteínas dos componentes celulares quando estas, posteriormente, entrarem em contato com os reagentes de isolamento do DNA. Para esse fim, existem duas principais técnicas para alcançar esse estado desejado, a primeira envolve perfuração direta da amostra com uma microrretífica ou com uma broca odontológica, onde o foco é atravessar sultimente a coroa do dente e alcançar a região rica de DNA endógeno da dentina e da polpa. Enquanto isso, a segunda técnica utiliza-se de um moedor de ossos para pulverizar completamente a amostra.

Nesse sentido, a perfuração é, atualmente, o método preferível quando há necessidade de análise genética, uma vez que, diferente do moinho que causa a total destruição da amostra, a broca é capaz de manter a integridade morfológica da peça, tornando-se, cada vez mais, um resultado desejado por museus e órgãos nacionais de preservação arqueológica ao ceder suas peças para pesquisas (Adler *et al.*, 2011).

A partir da pulverização dos dentes, lise das moléculas orgânicas, purificação e eluição do DNA que vamos aprofundar na parte metodológica deste trabalho. Temos o processo de amplificação deste material extraído e degradado.

3.3 Técnicas de extração de DNAa

A extração de DNA é uma etapa fundamental no estudo evolutivo e filogenético das populações antigas, por meio dela, pesquisadores são capazes de isolar o material genético de amostras arqueológicas para então sequenciar o seu genoma (Rizzi *et al.*, 2012) e, a partir disso, inferir a influência genética de determinados povos nas características atuais de uma população através do estudo de ancestralidade (Van Oven; Kayser, 2009). Portanto, como anteriormente mencionado, a escolha da técnica de extração mais efetiva é essencial nesse campo de estudo, uma vez que, além do baixo rendimento das amostras arqueológicas (Pinhasi *et al.*, 2015) a escolha do método pode afetar significativamente a qualidade e o comprimento dos fragmentos do DNAa extraído (Nieves-Colón *et al.*, 2018). Atualmente, existe uma grande variedade de metodologias consolidadas para a extração de DNAa, sendo, alguns exemplos de métodos, o baseado em adsorção em sílica (colunas de membrana ou partículas de sílica), o que utiliza beads magnéticas, e o que emprega extração orgânica por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Cada um desses métodos apresenta vantagens e desvantagens em relação ao resultado gerado, afetando a taxa de recuperação do DNAa, o grau de pureza da amostra, a concentração de inibidores da PCR no meio, a eficiência da amplificação por PCR e o resultado gerado a partir da análise com técnicas de sequenciamento (Haarkötter *et al.*, 2023).

O método de extração por adsorção em partículas sílica é a técnica de extração de DNA mais amplamente empregada por pesquisadores para extração de DNAa. Essa metodologia baseia-se na afinidade do material genético por superfícies (colunas ou partículas) compostas de dióxido de silício em condições específicas de salinidade e pH. Esse método consiste, primeiramente, na lise celular, realizada por meio da

adição de uma solução tampão de lise à amostra previamente pulverizada, com o objetivo de romper as membranas celulares e liberar o conteúdo intracelular, incluindo o DNA. Em seguida, é introduzido um tampão de ligação rico em sais caotrópicos, que promove a desnaturação de proteínas e facilita a interação entre as moléculas de DNA e a matriz de sílica presente em colunas de purificação. Nessa etapa, o DNA é adsorvido pela superfície da sílica, enquanto contaminantes e outras biomoléculas são eliminados por sucessivas lavagens. Finalmente, o DNA é recuperado, por meio da eluição da coluna de sílica com um tampão de baixa força iônica ou água, obtendo-se assim uma amostra purificada, adequada para processos subsequentes, como a PCR e o sequenciamento (Rohland et al., 2018).

Outra importante técnica empregada na extração de DNA é o método de extração por *beads* magnéticas. Nele é empregado micropartículas paramagnéticas, tipicamente composta por um núcleo de óxido de ferro e um revestimento por sílica ou por grupos funcionais como carboxila e amina, capazes de se ligar seletivamente ao DNA. O princípio desta metodologia de extração é similar ao princípio físico-químico discutido, anteriormente, da extração por adsorção de sílica. Após a lise celular, por intermédio de uma solução tampão, na solução, é adicionada os *beads* magnéticos em presença de tampões contendo sais caotrópicos, como guanidina ou cloreto de sódio, e solventes orgânicos, como álcool e PEG, criando condições que promovem a desnaturação de proteínas e a neutralização da carga negativa do DNA, o que favorece a adsorção do material genético na superfície das *beads*. Consecutivamente, ocorre a aplicação de um campo magnético, o qual concentra rapidamente os *beads*, facilitando a remoção eficiente do sobrenadante contendo contaminantes sem que ocorra a perda do material genético adsorvido. Para isso, realiza-se lavagem da amostra com soluções alcoólicas para eliminar as proteínas residuais, sais e detergentes e, assim, obter uma amostra de DNA purificada a partir dos *beads* magnéticos (Berensmeier, 2006).

Por fim, a extração com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico é um método clássico e amplamente utilizado por sua alta eficácia na purificação de DNA. Essa abordagem baseia-se na partição seletiva de biomoléculas entre fases aquosa e orgânica, mediada por solventes imiscíveis. Inicialmente, a amostra é submetida à digestão com Proteinase K em presença de detergentes, o que promove a lise celular e desnaturação proteica. Em seguida, adiciona-se uma mistura de

fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, a qual promove a separação das macromoléculas em duas fases distintas, a fase orgânica que é rica em proteínas desnaturadas e outros resíduos hidrofóbicos, e a fase aquosa, onde o DNA permanece dissolvido devido à sua natureza polar. Posteriormente, o DNA é precipitado da fase aquosa, lavado com etanol 70% para remover impurezas residuais e, por fim, ressuspenso em tampão TE ou água livre de nucleases (Hawkins *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2023). Apesar de ser um método de alto rendimento quando comparado aos métodos anteriores para extração de DNAa (Haarkötter *et al.*, 2023), seu uso encontra-se limitado, devido sua metodologia de difícil execução, além de apresentar maior risco ao expor seus realizadores a químicos tóxicos (Silva *et al.*, 2023).

Quadro 1: Comparação entre os desempenhos dos métodos baseado em adsorção em sílica, em beads magnéticas e em extração orgânica por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico em relação ao rendimento do processo, tamanho do fragmento recuperado, grau de pureza, concentração de inibidores da PCR, eficiência da PCR e do sequenciamento na extração de DNAa.

Método	Rendimento	Fragmentos	Pureza	Conc. de Inibidores	Eficiência da PCR e do sequenciamento
Sílica (Colunas / Partículas)	Bom rendimento	Recupera fragmentos em torno de 30 pb)	DNA geralmente puro (A260/280 ~1,7–1,9)	Remove bem proteínas e muitos inibidores comuns	Alta taxa de sucesso em PCR (poucos inibidores). DNA compatível com Sanger e ótimo para NGS
Beads magnética	Rendimento similar à sílica	Não retêm fragmentos com <100 pb, a menos que seja otimizada	Pureza geralmente alta (com protocolos adequados, A260/280 ~1,8).	Lavagens removem proteínas e contaminantes; eficácia varia com o kit utilizado	DNA normalmente amplificado sem problemas. Compatível com Sanger e NGS
Fenol-Clorofórmio-álcool isoamílico	Tipicamente o maior rendimento	Fragmentos de 50 pb até >20 kbp são recuperados	DNA de altíssima pureza se bem executado (A260/280	Remove quase todas proteínas e substâncias polares após várias	Excelente para PCR. É ótimo para Sanger, mas para NGS deve atentar a remoção total

			~1,8 ou mais)	lavagens.	dos solventes, para evitar problemas na preparação da biblioteca
--	--	--	---------------	-----------	--

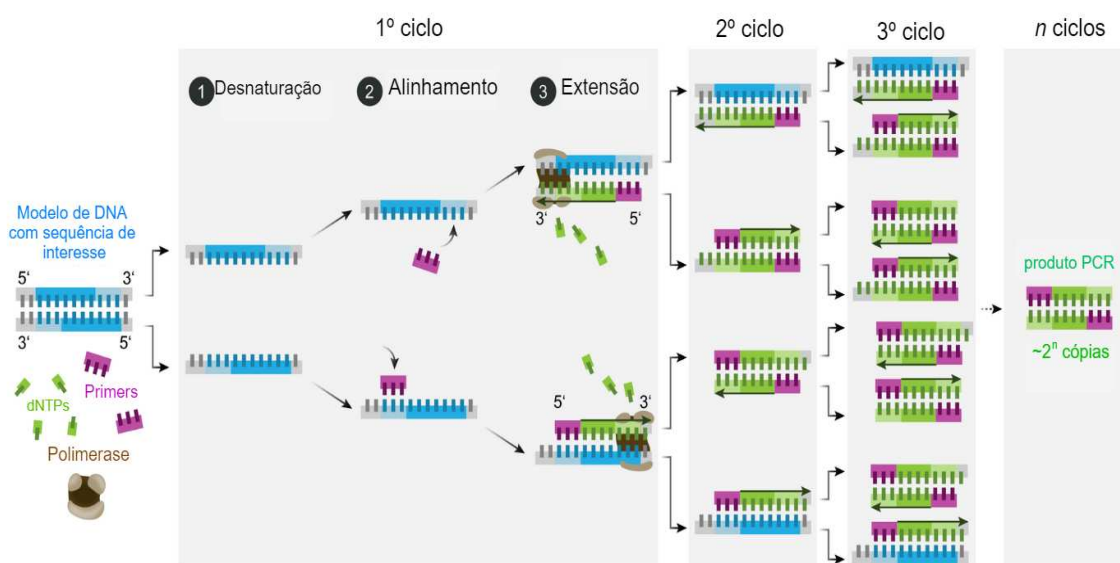
Fonte: baseado em Haarkötter *et al.* (2023), Hawkins *et al.* (2022), Silva *et al.* (2023) e Vilanova *et al.* (2020)

3.4 Reação de Cadeia Polimerase

Tendo em vista a importância e dificuldades relacionadas ao DNA ancestral, surgiu a necessidade de aumentar a recuperação de material genético extraído, mesmo com as menores quantidades de amostra disponível. Para isso, utiliza-se da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

PCR é um procedimento *in vitro* comum na atividade laboratorial para identificação de material genético. Isto é possível através de uma sequência de processos de desnaturação e re-enovelamento da cadeia proteica, na qual o material genético é submetido e, assim, produzindo milhões de cópias de um segmento específico de DNA. Para isso, na primeira etapa do PCR, o DNA molde é sujeito a alta temperatura (90-95 °C) para que haja quebra de sua estrutura proteica em duas novas fitas. Após esse processo, há um resfriamento da reação, possibilitando que duas sequências de oligonucleotídeos (*primers*), as quais são complementares as fitas recém-formadas, anelem-se a essas fitas, assim, delimitando o segmento que será amplificado. Depois, na terceira etapa, há um novo aquecimento (68-72 °C), tornando as condições propícias para a atividade da enzima Taq DNA polimerase, que tem como função sintetizar as cadeias complementares, finalizando o primeiro ciclo da reação. Após o primeiro ciclo, a molécula de molde amplifica-se em duas novas moléculas, que, então, são reintegradas no ciclo de reação. Os ciclos são repetidos por aproximadamente 25 a 40 vezes por análise, gerando um produto rico de material genético, o qual pode seguir para diferentes processos de análise, conforme necessário no experimento (Wages, 2005).

Figura 2: Esquema das etapas de ampliação do material genético que ocorre na PCR em cada ciclo de replicação.



Fonte: adaptada de Ramirez (2022).

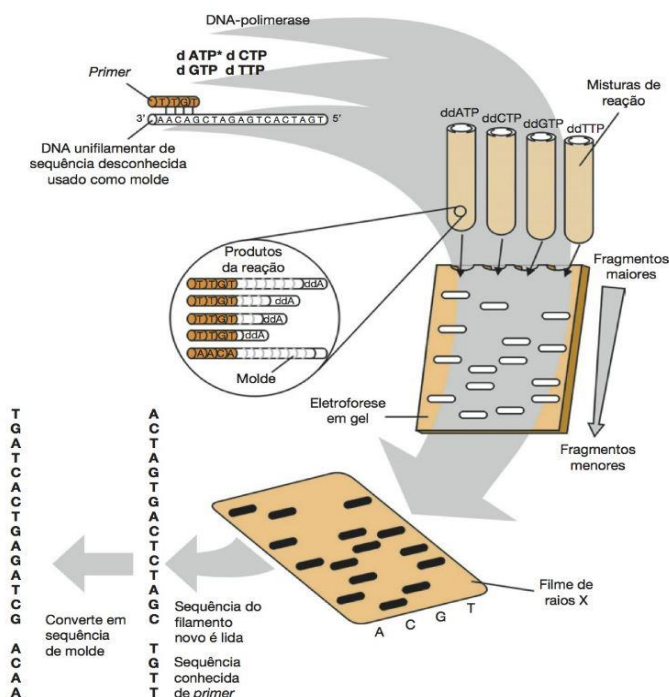
3.4 Sequenciamento de Sanger

Após o isolamento e a purificação do material genético, é necessário priorizar as amostras não contaminadas. Para esse fim, realiza-se o processo de sequenciamento, sendo o método de terminação de cadeia de Sanger o modelo aperfeiçoado do primeiro método de sequenciamento de DNA, o método Maxam–Gilbert, o qual se baseia na clivagem química da molécula de DNA.

O método de sequenciamento de Sanger foi desenvolvido na década de 70 pelo bioquímico inglês Frederick Sanger e seus colaboradores. Essa técnica tinha como objetivo possibilitar a determinação das sequências de nucleotídeos que compõem o DNA. Para isso, o método de Sequenciamento de Sanger começa com uma fita única do DNA, obtida após um processo de desnaturação proteica. De forma similar a um PCR, essa fita simples serve como um molde para produção de uma fita complementar através da ação da enzima Taq DNA polimerase. Para isso, é necessário que a fita molde anela-se a dois primers, os quais delimitam a região amplificada. A partir disso, o sequenciamento de Sanger realiza a decodificação do material genético através da adição de nucleotídeos marcados radioativamente, o trifosfato de 2',3'-didesoxiadenosina ou Didesoxinucleotídeo (ddNTP). Devido sua natureza análoga a de um nucleotídeo (dNTP), os ddNTP são capazes de se ligar aos demais nucleotídeos durante produção da cadeia de DNA complementar pela ação

enzimática da DNA polimerase. Contudo, os ddNTP também apresentam influência inibitória na atividade dessa enzima e, por isso, quando um dos ddNTP é adicionado à qualquer parte da cadeia, ela se mostra incapaz de continuar sendo construída. Portanto, os ddATP atuam como terminadores da replicação do DNA. A partir desse conhecimento, Sanger formulou uma metodologia que se baseia na ação replicadora da DNA polimerase em um meio contendo tanto dNTP quanto ddNTP. Assim, de forma aleatória, seriam produzidos diversos fragmentos de cadeias de DNA com diferentes tamanhos, mas sempre com um ddNTP no final de sua estrutura. Esses fragmentos, por sua vez, por meio da diferença de seu peso molecular, seriam separados em um gel de eletroforese incidido por radiação gama. Como esses análogos são marcados radioativamente, seria possível visualizá-los no final de cada fragmento. Assim, o resultado da eletroforese informaria a sequência das bases na cadeia de DNA da amostra, onde a banda mais inferior representaria a cadeia mais curta (mais leve) interrompida pelo ddNTP, portanto, o primeiro nucleotídeo da sequência de DNA original (Sanger; Nicklen; Coulson, 1977).

Figura 3: Esquema do sequenciamento de Sanger. Destacando as principais etapas do processo, começando com a replicação do material genético até a leitura dos dados.



Fonte: adaptada de Borges-Osório e Robinson (2013).

3.5 História da investigação do DNA antigo

O campo de investigação de DNAa é recente, tendo seu início há 40 anos quando foram divulgados os primeiros estudos dessa nova área científica. O primeiro estudo inovador, publicado por Higuchi *et al.* (1984), era um relato da extração e do sequenciamento do fragmento de material genético obtido do tecido muscular de uma quagga, um equídeo sul-africano (*Equus quagga quagga*) extinto durante o século XIX. Paralelamente, outro trabalho era publicado, Pääbo (1985), no qual descreveu-se a obtenção e a decodificação de DNA de amostras humanas mumificadas.

Todavia, apesar desses estudos pioneiros trazerem inovações quanto a amplificação de DNA em amostras arqueológicas, utilizando-se de clonagem bacteriana para esse fim, a maioria do DNA recuperado foi bacteriano ou fúngico, sendo as sequências de DNA de interesse extraídas constituídas de concentrações baixíssimas de materiais genéticos fragmentados e com múltiplos danos em sua estrutura, dentre esses fragmentos, o DNA mitocondrial (Rizzi *et al.*, 2012).

A partir desses resultados, novas pesquisas foram sendo realizadas no início da década de 1990. Entretanto, os cientistas da época encontraram-se em um impasse dentro do campo de pesquisa de DNAa que se utilizava de DNA humano, uma vez que essa área se tornou controversa e dificultosa, devido à concepção de que tais amostras não seriam capazes de serem analisadas. Isso se deve a dificuldade, naquele período, de discernir a sequência de DNA ancestral humano com o DNA humano contaminante. Assim, durante o meio daquela década, os cientistas concentraram seus esforços na decodificação de um DNA que não apresentasse os empecilhos enfrentados no sequenciamento do DNA ancestral humano, como o DNA mitocondrial e nuclear da fauna extinta que fora preservada no interior do permafrost (Hagelberg; Hofreiter; Keyser, 2015).

Esse panorama foi só a começar a mudar no final da década de 1990, quando Krings *et al.* (1997) publicou um estudo inédito sobre a realização do sequenciamento de DNA de uma espécie de *Homo neanderthalensis*. Esse trabalho foi pioneiro na utilização de técnicas de pré-tratamento ao controlar as condições do ambiente da extração de DNAa, visando diminuir o máximo com DNA humano contaminante. Tais estratégias, juntos com outras técnicas experimentadas pelos cientistas daquele período, seriam sintetizadas, o que possibilitou a autenticação dos resultados obtidos, (Cooper; Poinar, 2000, p. 1139) e, posteriormente, replicadas, em trabalhos científicos

posteriores, como os de Vernesi *et al.* (2001), de Endicott *et al.* (2002), de Larson *et al.* (2007), e, futuramente, seriam expandidas para incluir várias novas medidas que hoje são essenciais para a validação do processo de extração de DNAa, além de impulsionar o estudo de DNA ancestral humano e de seus ancestrais.

Hoje, o campo da ciência de DNA ancestral encontra-se em rápido desenvolvimento, como se pode observar em estudos recentes como o de Skourtanioti *et al.* (2023) e de Haber *et al.* (2020), os quais, utilizando-se do processo de extração de DNAa vêm comprovando o que os cientistas acreditavam há 40 anos atrás, que essa técnica é capaz de aprimorar os conhecimentos acerca da evolução da espécie humana e de fornecer uma ferramenta para a maior compreensão sobre o desenvolvimento e da ancestralidade de antigas civilizações. Esse campo tem se apresentado tão promissor que, em 2022, o cientista Svante Pääbo, o geneticista sueco a realizar a primeira extração de DNAa humano, Pääbo (1985), recebeu a honraria do Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina pela sua contribuição na exploração do estudo da evolução humana e no pioneirismo da extração de DNA ancestral.

3.5.1 Processo de sequenciamento de DNA antigo no Brasil

Em contrapartida com o desenvolvimento acelerado desse novo campo da ciência, o Brasil progrediu a passos lentos no estudo do DNAa de populações nativo-americanas. Ainda assim, pesquisas notórias nessa temática foram realizadas na última década, como a de Ferraz *et al.* (2023), o qual se utilizou do processo de análise de DNAa para responder dúvidas quanto à descendência genética dos indivíduos sul-americanos que viviam na costa. Todavia, mesmo esse estudo, o qual se apropriou de amostras arqueológicas nacionais, não realizou o processo de extração de DNA ancestral sob as condições laboratoriais brasileiras, sendo feita no instituto alemão Max Planck. Além desse, outro interessante estudo que se utilizou da técnica de decodificação de DNA ancestral foi o de Silva *et al.* (2017), o qual apropriou-se de tais técnicas para elucidar questões taxonômicas de uma espécie endêmica de peixe brasileira, o *Deuterodon pedri*. Contudo, novamente, esse estudo não foi feito exclusivamente em território nacional, sendo executado o processamento das amostras arqueológicas brasileiras no laboratório de biologia molecular do Museu Nacional de História Natural em Washington D.C., Estados Unidos.

A partir desse cenário, instituições científicas, como da USP, já demonstraram interesse de revisar e de aplicar técnicas de sequenciamento de DNA ancestral já padronizadas internacionalmente, pela primeira vez, de forma exclusivamente nacional (Bocchini, 2023). Apesar disso, nenhum estudo nessa área foi efetivado completamente sobre essas condições desejadas até a data de produção deste Trabalho de Conclusão de Curso.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de portaria do IPHAN para movimentação de vestígios arqueológicos e pesquisa

Para a pesquisa envolvendo patrimônio arqueológico durante esse estudo pioneiro de extração de DNAa baseado em protocolos internacionais foi solicitada para o Instituto Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) do estado da Paraíba, a autorização para a movimentação e destruição das amostras arqueológicas do Laboratório de Arqueologia e Paleontologia (LABAP) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) para o Laboratório de Bioarqueologia Translacional (LABBAT) do NPDM da UFC. Além disso, foi assegurado um local adequado para guarda dos materiais. Para que houvesse a movimentação dessas peças, necessitou-se, juntamente com o formulário de solicitação, do envio de dois documentos contendo imagens e dados, como peso, dimensões, sítio de escavação, tipo e estado de conservação, acerca das amostras. O código de autorização do IPHAN foi N° 01408.000358/2023-17.

4.2 Estrutura do NPDM e o NB-2

O experimento ocorreu dentro da instalação do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), uma estrutura multidisciplinar e capacitada para executar estudos científicos, sendo o primeiro estabelecimento científico no Brasil a atuar em todas as etapas da cadeia de desenvolvimento de medicamentos (UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2015). Estudos inovadores como o da utilização da tilápia para o tratamento de queimadura ocorreram no NPDM (Moraes-Filho *et al.*, 2017). Para esse trabalho, teve-se a participação do LABBAT, do Laboratório de Farmacogenética (FARMAGEN) e do Laboratório de Neuropsicofarmacologia (LNF).

O local de trabalho utilizado foi um laboratório de nível de biossegurança 2 (NB-2). Os níveis de biossegurança numa instituição de pesquisa são divididos do nível 1 até o nível 4, sendo necessário obedecer determinados pré-requisitos em sua infraestrutura para receber essa classificação. Os requisitos para cada nível de biossegurança podem ser visualizados no quadro 2. O laboratório NB-2 utilizado, além das estruturas obrigatórias, também continha exaustor com filtro HEPA, sistema de

ventilação controlada e adução do ar, visando o controle de fontes de contaminação externa.

Quadro 2: Requisitos para os diversos níveis de segurança biológica (I a IV). Sendo N: Abstenção de necessidade; S: Uso obrigatório; D: Uso desejável.

Atributo		Níveis de segurança biológica			
		1	2	3	4
Isolamento do laboratório		N	N	S	S
Sala selada para descontaminação		N	N	S	S
Ventilação:					
	- Adução do ar	N	D	S	S
	- Sistema de ventilação controlada	N	D	S	S
	- Exaustor com filtro HEPA	N	N	S	S
Entrada com porta dupla		N	N	S	S
Sistema de portas com tranca		N	S	S	S
Câmara de vácuo		N	N	S	S
Câmara de vácuo com ducha		N	N	N	S
Antecâmara		N	N	S	—
Antecâmara com ducha		N	N	S	N
Tratamento dos efluentes		N	N	S	S
Autoclave:					
	- <i>in loco</i>	N	D	S	S
	- numa sala do laboratório	N	N	D	S

	- de duas portas	N	N	D	S
Câmaras de segurança biológica					
	- classe I	D	D	N	N
	- classe II	N	D	S	S
	- classe III	N	N	D	S
Circuito interno de imagem		N	N	D	S
Registro em autoridades sanitárias nacionais		N	N	S	S
Roupas de proteção com pressão positiva e ventilação		N	N	N	S
Uso EPI's		S	S	S	S
Realização das BPL's		S	S	S	S
Incineração dos resíduos após esterilização		N	N	N	S

Fonte: adaptada de Penna *et al.* (2010).

4.3 Pré-tratamento do laboratório para extração de DNA antigo

Para a realização do experimento, foi necessário realizar o tratamento do laboratório de biossegurança 2 de forma a validar os resultados a serem obtidos, como descrito em Cooper; Poinar, (2000). Baseando-se em estudos recentes como os de Pinhasi *et al.* (2019) e de Gondek; Boessenkool; Star. (2018), realizou-se uma descontaminação geral do laboratório. Para isso, foi necessária uma limpeza completa do laboratório (piso e paredes) utilizando-se de soluções desinfetantes apropriadas, como o hipoclorito de sódio a 10% e o peróxido de hidrogênio (1:1 com água). Ademais, as superfícies de trabalho (bancadas e cabine de fluxo), equipamentos e insumos foram limpos com álcool 70%. Nesse sentido, após a limpeza química da sala, ainda foi realizado um controle de contaminação, por meio da irradiação de luz UV-C germicida para esterilização do ambiente. Isso foi feito com uma única lâmpada (Marca G-light), a qual foi fixada no teto no centro do laboratório antes do início da extração, sendo necessário deixá-la acesa por, pelo menos, 30 minutos antes de

iniciar qualquer procedimento. Essa descontaminação sempre era realizada antes de qualquer experimento, sendo, portanto, necessário repeti-la todo início de dia quando a equipe saísse do ambiente.

Figura 4: Laboratório NB-2 utilizado durante a pulverização dos dentes e a extração do DNAa.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Por fim, todos os insumos necessários para extração (Quadro 3) foram organizados previamente para evitar deslocamentos desnecessários durante o procedimento. Assim, EPIs como luvas e máscaras N95 permaneceram dentro do laboratório em ambiente controlado, enquanto os macacões impermeáveis, máscaras N95, toucas e propés descartáveis mantiveram-se em sua embalagem fora do laboratório, sendo aberto apenas quando necessário (Quadro 3). O macacão, luva, touca e propé eram descartados sempre que a equipe saía do laboratório, sendo necessário utilizar novos EPIs sempre que alguém fosse entrar no ambiente

controlado. No máximo, era permitida a entrada de 2 pessoas simultaneamente na sala visando reduzir o risco de contaminação externa.

Quadro 3: EPIs utilizados ao longo da extração com relação a sua quantidade e ao seu valor (unitário e total).

Material utilizado	Quantidade
Extração kit (1 Deep well + PK + LS3 + Elu + 12 Tiras) - 16 ext - MPTAP016MDx	1
Extração kit (1 Deep well + PK + LS3 + Elu + 12 Tiras) - 16 ext - MCFDP016	1
Kit Macacão Impermeável Proteção Química Pintura C/ Capuz EEG - 10 unidades	2
Luva Procedimento Nitrílica Descartável Caixa 100 Unds	15
Propé Sapatilha Descartável 100 Unidades Anvisa C/ Elástico	6
Touca Branca Descartável Tnt Sanfonada 100 Unidades C/anvisa	6
Kit 10 Máscara 3m Aura 9320 Pff2 N95 Respirador Sem Válvula	2
Óculos De Proteção Ampla Visão De Sobrepor Super Safety	2

Fonte: elaborado pelo autor.

4.4 Amostras utilizadas

A extração de DNA ancestral foi feita a partir de 16 dentes, incluindo um exemplar de Arqueologia Histórica: o 16º dente, proveniente do Cemitério de Bexiguentos, em Frei Martinho - PB. Os demais 15 dentes restantes provêm dos

seguintes sítios arqueológicos: Toca dos Astros, no Congo, PB; Serrote dos Ossos, Caraúbas, PB; Furnas dos Ossos, São João do Cariri, PB e Apa das Onças, São João do Tigre, PB (Tabela 1). Esses dentes pertencem a indivíduos do período pré-colonial (Cavalcante *et al*, 2023; Lima *et al.*, 2018; Santos, 2009), Cariri, com predominância de molares, que são mais adequados ao manuseio.

Quadro 4: Amostras dentárias coletadas com respectivo município de origem e o ano da campanha de escavação.

Código	Município de origem	Campanha
1	Apa das onças	2008
2	Furna dos ossos	2008
3	Serrote dos ossos	2022
4	Toca dos astros	2023
5	Serrote dos ossos	2022
6	Serrote dos ossos	2022
7	Serrote dos ossos	2022
8	Furna dos ossos	2008
9	Toca dos astros	2023
10	Toca dos astros	2023
11	Furna dos ossos	2008
12	Toca dos astros	2023
13	Apa das onças	2008
14	Apa das onças	2008
15	Apa das onças	2023
16	Cemitério dos bexiguentos	2024

Fonte: elaborado pelo autor.

4.5 Pulverização das amostras arqueológicas

A extração das amostras foi realizada nas instalações do NPDM, num laboratório já previamente pré-tratado, seguindo a metodologia anteriormente descrita. O laboratório continha um fluxo laminar da marca Trox Technik, o qual era acoplado com uma lâmpada de desinfecção UV-C em seu interior. Essa lâmpada foi ligada por 30 minutos antes da realização de qualquer experimento para esterilizar o interior do fluxo e a microretífica da marca Dremel (Figura 5), preferencialmente, essa descontaminação é feita juntamente com a irradiação da sala.

Figura 5: Equipamentos e insumos utilizados para pulverização das amostras dentárias. Na primeira foto se tem as amostras, a broca e a microretífica utilizada

para pulverização dos dentes, papel alumínio, álcool, além da lâmpada UV-C utilizada para irradiação da sala no interior da capela. Na segunda foto se tem a lâmpada UV-C portátil.



Fonte: elaboradas pelo autor.

Primeiramente, antes mesmo da pulverização, realizou-se, fora do ambiente controlado, a identificação e catalogação de todos os dentes que foram utilizados para o experimento, a fim de garantir a integridade e autenticidade das amostras extraídas. O procedimento dura cerca de 10 minutos por dente, podendo tanto ser realizada tanto fisicamente quanto digitalmente. Por fim, antes da entrada na sala, realizou-se uma limpeza na superfície externa dos dentes ao submetê-los a 10 minutos de irradiação UV-C com uma lâmpada UV-C portátil da BIOSEPT.

Para entrar no laboratório, foi necessário vestir o macacão impermeável por cima do jaleco. Além disso, retirou-se o sapato e vestiu-se o propé descartável sobre a meia, como também se vestiu a touca e a máscara N95. Dentro do laboratório, antes de encostar em qualquer equipamento, vestiu-se duas luvas em cada mão, sendo a luva mais superficial constantemente substituída para evitar contaminação.

Ademais, também foi necessário recobrir de alumínio esterilizado na bancada do fluxo laminar. A esterilização do papel alumínio foi realizada por irradiação UV-C por 30 minutos. Isso foi planejado visando recolher o pó de dente produzido quando a amostra fosse pulverizada pela microretífica. O tamanho do papel alumínio deve ser o bastante para recobrir a área de trabalho, como mostrado na Figura 6.

Figura 6: Foto dos dentes devidamente separados e classificados quanto ao local de escavação sobre a bancada do fluxo laminar recoberta com papel alumínio.



Fonte: elaborado pelo autor.

Com todos esses cuidados garantidos, efetuou-se a pulverização das amostras dentárias por meio da microrretífica acoplada com uma broca esterilizada em baixa velocidade para evitar degradação térmica do DNA. Essa esterilização foi possível ao mergulhar a broca de titânio de 2,4 mm em hipoclorito de sódio a 10% por 5 minutos. A pulverização foi realizada dentro do fluxo laminar que estava recoberto por papel alumínio para recolher o pó de dente produzido. Durante a pulverização, foi importante realizar a substituição constante das luvas, sempre trocando-as quando fosse manipular uma nova amostra para evitar contaminação cruzada. Além disso, a cada troca de amostra, realizou-se uma nova descontaminação da broca ao mergulhá-la em hipoclorito de sódio a 10% por 1 minuto. Juntamente a isso, também foi feita a substituição do papel alumínio, sendo, um papel por amostra. Como havia 16 amostras, foram utilizadas 16 folhas de papel alumínio, as quais eram perfeitamente recortadas para recobrir a bancada do fluxo. Assim, foi realizada a pulverização das 16 amostras, sendo que, para cada amostra, o pó dental produzido era acumulado na superfície do papel alumínio após cada pulverização e, então, coletado e transferido para eppendorfs estéreis devidamente identificados. Essa identificação foi feita com etiquetas, a qual se enumerou os eppendorfs.

4.6 Extração do DNA ancestral

Um dia após a pulverização das amostras dentárias utilizando o mesmo laboratório NB-2, ocorreu a extração de DNAa com o auxílio do equipamento Extracta® 32 da empresa Locus (Figura 7). O extrator e purificador de DNA e RNA Extracta® 32 é um sistema capaz de realizar, de forma automatizada, tanto o processo de extração, quanto o processo de purificação do material genético, por meio de *beads* magnéticas. Esse equipamento tem por objetivo otimizar o processo extrativo ao reduzir falhas manuais comuns, como erros durante a pipetagem (Pushparaj, 2020) ao realizá-las automatizadamente para obter amostras mais puras e concentradas.

Figura 7: Extrator e purificador de DNA e RNA – Extracta® 32



Fonte: Loccus

O pó da polpa dental extraído na etapa anterior foi inserido nos poços de 2 placas pré-fabricadas pela empresa Loccus: A placa do kit MPTA-MDx e a placa do kit MCFD. Ambas as placas contêm, no total, 32 poços fundos com o formato de profundidade em forma de “V”. No kit MPTA-MDX, na primeira coluna da placa, os poços contêm todos os reagentes de purificação para que a única necessidade do pesquisador seja adicionar a amostra. Enquanto no kit MCFD, a primeira e segunda coluna contêm os reagentes, assim, cada amostra terá duas réplicas por linha da placa.

A diferença entre os kits está em sua utilização, sendo o kit MPTA-MDx ideal para o isolamento de DNA e RNA de diversos tipos de microrganismos, como vírus (DNA e RNA), protozoários, helmintos, fungos e bactérias (Gram positivas e Gram negativas). Já a placa do kit MCFD é planejada para extração de DNA circulante, ou

seja, DNA encontrado em fluidos corporais humanos. Devido a natureza fragmentada e imprecisa do material genético, optou pela utilização das duas placas

Para iniciar o processo de extração, primeiro, era necessário colocar as amostras nos poços contendo os reagentes. Para isso, na placa do kit MPTA-MDx, adicionou-se 300 µl de uma amostra num único poço da placa de extração até um total de 8 poços para as 8 primeiras amostras (1-8), completando a coluna. A segunda placa, do kit MCFD, adicionou-se 300 µl de uma amostra nos poços das colunas número 1 e 2 da placa de extração, até um total de 16 poços para segunda metade amostras (9-16), sendo adicionado, em seguida, também 20 µl de proteinase K e 6 µl do reagente CR em cada poço utilizado na placa. Esse processo durou 30 minutos. Após essa etapa, para dar início a pipetagem e a mistura automatizada, posicionou-se as placas de extração no extrator automatizado do Extracta® 32 e executou-se o protocolo de extração correspondente ao kit utilizado (MPTAP016MDx para o kit MPTA-MDx e MCFDP016 para o kit MCFD na interface do equipamento).

A partir disso, de forma automatizada, o Extracta® 32 iniciou o processo de extração e purificação do DNAa por *beads* magnéticas. Cada kit apresenta parâmetros de etapas bem definidos, como velocidade de agitação, tempo de agitação, tempo de magnetização, tempo de incubação e temperatura de aquecimento. Esse processo durou 50 minutos por placa. Por fim, após a finalização do programa, o Extracta® 32 extraiu o DNAa do pó dentário que ficou suspenso na solução de eluição do kit na última coluna da placa. Daqui, retirou-se a suspensão contendo o DNAa de cada poço das placas de extração com uma pipeta, transferindo esse líquido para 16 novos tubos eppendorfs devidamente identificados, os quais foram armazenados em um freezer a -20°C para evitar a degradação do material genético. Essa identificação foi feita com etiquetas, a qual se enumerou os eppendorfs. Os eppendorfs continham, individualmente, 80 µl de DNAa suspenso de cada amostra.

4.7 Quantificação e verificação da pureza do DNA por espectrofotometria UV pelo NanoDrop™

Ademais, no dia seguinte à extração do DNAa, como não era mais necessário o cuidado para prevenir a contaminação durante a extração de DNA da amostra, uma vez que o processo já foi realizado, pode-se proceder a quantificação do material genético em outro ambiente. Sendo assim, a quantificação do DNA ocorreu no

laboratório de farmacogenética, uma instalação NB-1. A partir dessa etapa, todos os procedimentos ocorreram nesse ambiente e sempre utilizaram os seguintes EPIs: jaleco, touca e luva nitrílica.

A quantificação e a análise da pureza do material genético foram realizadas utilizando-se de espectrofotometria UV pelo NanoDrop™, visando averiguar a efetividade da extração automatizada pelo Extracta® 32 de um DNA tão fragmentado quanto o DNAa. Com esse intuito, retirou-se do freezer as 16 amostras e esperou-se 15 minutos pelo seu descongelamento. Durante esse tempo, foi necessário ligar o aparelho e realizar sua calibração. Para isso, adicionou-se 1µl de água ultrapurificada ao pedestal do NanoDrop™ e executou o comando “Blank”. Depois, limpou-se a ponta do braço e o pedestal do aparelho com uma das folhas de alta absorvência. A partir disso, depois dos 15 minutos, retirou-se 1 µL da primeira amostra com uma pipeta e a adicionou no pedestal, a quantificação foi mensurada clicando no botão “*Measure*”, o que gerou um gráfico contendo os valores de concentração e razão de absorbância do DNA extraído. Esse processo foi repetido para as 16 amostras, o que levou cerca de 30 minutos (1-2 minutos por amostra). Repetiu-se essa análise 3 vezes

4.8 Amplificação da região HVR-1 e HVR-2 por PCR:

Para facilitar a realização do sequenciamento por Sanger do material extraído realizou-se uma PCR em todas as amostras, visando produzir uma biblioteca. Essa biblioteca foi montada a partir do material genético amplificado de *primers* da sequência da região hipervariável do DNAm.

Para esse experimento, foram escolhidos utilizar os dois segmentos da região controle: HVR-1 e HVR-2, devido a sua utilização em estudos para o rastreo de haplogrupos dentro da população brasileira (Alves-Silva *et al.*, 2000). Portanto, baseado no estudo de Alves-Silva *et al.* (2000) foram utilizados os seguintes primers: F5'- TCAAAGCTTACACCAGTCTTGTAACC; e R5'- CCTGAAGTAGGAACCAGATG (HVR1) e para a região HVR2: F5'- GGTCTATCACCTATTAACCAC; R5'- TTGAGGAGGTAAGCTACATA. Além disso, para essa etapa, utilizou-se o kit Platinum II Taq Hot-Start DNA Polymerase como o master mix da reação.

Essa etapa foi ambientada no mesmo dia e no mesmo local que a quantificação de DNA ocorreu. A amplificação por PCR da região controle do DNAm foi realizada

numa placa de 96 poços (Quadro 5), cada poço utilizado continha 2 µL do primer *forward* do HVR-1 (1A-8B) ou 2 µL do primer *forward* do HVR-2 (1C-8D), 2 µL do Primer reverse do HVR-1 (1A-8B) ou 2 µL do Primer reverse do HVR-2 (1C-8D), 3 µL de água ultra purificada, 3 µL do DNA e 10 µL do master mix, sendo que, cada amostra foi analisada para as 2 regiões de controle. O procedimento (temperatura, quantidade de ciclos e tempo de reação) foi feito seguindo os parâmetros definidos pelo Kit Platinum II Taq Hot-Start DNA Polymerase.

Ademais, a leitura dos resultados da PCR foi possível por intermédio de uma eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídio. Para isso, primeiro preparou-se o gel de agarose a 2% ao misturar 2 g de agarose com 100 mL de solução tampão TBE em aquecimento até se obter uma solução translúcida, então, foi-se adicionado 5 µL de brometo de etídio no gel. Por fim, despejou-se o gel no suporte contendo os pentes (molde) e esperou a polimerização do gel (20-30 minutos). Em seguida, retirou-se os pentes do molde para recuperar a matriz de agarose sólida, colocando-a no interior da cuba de eletroforese, como cada gel apresentava 20 poços, foi-se necessário produzir 2 géis de agarose 2%. Para preparar as amostras para esse processo, misturou-se 5 µL de cada amostra de DNA com 5 µL de corante de carregamento, para que, dessa forma, pode-se visualizar a movimentação do DNA pelo gel. Por fim, adicionou-se as 36 amostras nos poços dos 2 géis (20 no primeiro e 16 no segundo), juntamente com um marcador de peso molecular (controle positivo). O marcador de DNA utilizado nessa etapa foi o 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher 10787018), o qual possui um alcance de 100 pb até 15000 pb. A corrida foi realizada a 100V por 50 minutos e a leitura das bandas de DNA do gel foi feita sob luz UV.

Quadro 5: Esquematização da localização das amostras na placa de 96 poços que foi utilizada para PCR. A coluna A e B analisou a amplificação da HVR-1 e a coluna C e D analisou a amplificação da HVR-2.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1 (HVR1)	9	1 (HVR2)	9								
2	10	2	10								
3	11	3	11								

4	12	4	12								
5	13	5	13								
6	14	6	14								
7	15	7	15								
8	16	8	16								

Fonte: elaborado pelo autor.

4.9 Purificação do DNA:

Antes da realização do Sequenciamento de Sanger, necessitou-se purificar o material genético amplificado, visando remover os primers, dNTPs, enzimas e sais produzidos na reação de PCR. Essa etapa foi realizada no mesmo dia da PCR. Para isso, foi empregado o kit PureLink™ PCR Purification Catalog (K310002). Seguindo o protocolo de utilização de kit para esse experimento, primeiro, adicionou-se 80 µL do buffer de ligação (B2) com 20 µL da amostra após o PCR e misturou-se a solução. O buffer de ligação, na reação, tem a função de criar um ambiente ideal para ligação entre moléculas. Depois, pipetou a solução dentro da Coluna de PCR Spin PureLink™ fornecida pelo kit. Essa coluna foi inserida dentro de um tubo de coleta também fornecido pelo kit. Isto foi seguido pela centrifugação do conjunto coluna-tubo a >10.000g por 1 minuto. Após, descartou-se o líquido que atravessou a coluna e acumulou-se no tubo de coleta.

Seguiu-se para a lavagem da reação. Nessa etapa, reinseriu-se a coluna utilizada anteriormente em um novo tubo de coleta e adicionou-se 650 µL de Tampão de Lavagem (W1) na coluna para realizar sua lavagem. A partir disso, seguiu-se para uma nova centrifugação a >10.000g por 1 minuto, descartando-se o líquido que atravessou a coluna para o tubo de coleta. A etapa de lavagem foi repetida mais uma vez com o objetivo de obter uma solução mais purificada.

Por fim, transferiu-se a coluna lavada para o interior do PureLink™ Elution Tube e adicionou-se 30 uL de *Elution Buffer* diretamente no centro da membrana da coluna. Daqui, seguiu-se para uma Incubação de 1 minuto em temperatura ambiente sobre uma bancada. Por fim, realizou uma última centrifugação a >10.000g por 2 minutos e coletou o conteúdo que atravessou a coluna, uma vez que o tubo de eluição continha o produto da PCR purificada. As amostras foram armazenadas em um freezer a -20°C.

4.10 Sequenciamento do DNAm pelo método de Sanger:

Após a obtenção do material purificado, o último procedimento desse trabalho, o sequenciamento de Sanger, ocorreu no dia seguinte à realização da purificação do DNA. Para isso, utilizou-se do kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing, o qual continha reagentes pré misturados para preparar as amostras para as reações sequenciamento de Sanger. Para cada uma das amostras anteriormente amplificadas, foi produzido uma mistura da seguinte proporção: 1 µL do reagente BigDye fornecido pelo kit, 1,5 µL da solução tampão fornecida pelo kit, 1 µL do primer da respectiva região hipervariável amplificada (HVR-1 ou HVR-2) e 6,5 µL da amostra purificada, os quais foram colocados em placa de 96 poços. Seguiu-se para a realização reação de sequenciamento com protocolo sugerido pelo fabricante (Thermo Fisher), o qual indicava para colocar a placa contendo as amostras no termociclador e selecionar o volume de reação para 96 poços. Os parâmetros utilizados para reação foram iguais aos definidos pelo fabricante. Em seguida, repetiu-se o processo uma nova purificação do material amplificado. Por fim, os resultados obtidos foram analisados pelo software Geneious e então foi-se estimado os haplogrupos do DNA mitocondrial utilizando o serviço online do Haplogrep 3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da qualidade e da quantidade de DNA extraído através da análise por Espectrofotometria UV pelo NanoDrop™

Nos primórdios do campo da análise de DNAa, durante a década 1990 e 2000, a quantificação desse material arqueológico era restrito a poucas técnicas, sendo, a principal a PCR competitiva, a qual já foi considerada a forma mais efetiva a ser utilizada para quantificar o DNAa, sendo amplamente divulgada como a metodologia padrão de quantificação (Cooper; Poinar, 2000). Contudo, revisões mais modernas como o de Brzobohatá *et al.* (2017) apontam que, atualmente, há uma maior variedade das técnicas de quantificação de DNAa, entre as principais estão: a espectrofotometria UV por Nanodrop™, o PCR em tempo real com detecção por SYBR® Green, PCR com kit forense, quantificação por via corantes fluorescentes ligados ao DNA (Qubit) e análise de fragmento por TapeStation. Dentre estes, as técnica que baseiam-se em replicação por PCR costumam apresentar resultados inferiores e, até mesmo de falsos negativos, em relação aos valores reais, devido ao baixo número de replicação associado ao alto nível de fragmentação estrutural e a presença de substâncias inibidores de PCR no DNAa, portanto, apesar de ser uma opção mais barata e tradicional para quantificação de DNAa, não foi a primeira escolha para esse experimento, preferindo utilizar-se da espectrofotometria UV por NanoDrop™. Entretanto, mesmo a técnica de quantificação escolhida não é, também, a melhor opção em relação aos demais processos, uma vez que ela é altamente sensível, mas pouco específica, sendo incapaz de diferenciar DNAa de DNA contaminante, apresentando, geralmente, valores erroneamente superiores. Nesse sentido, a técnica com a maior eficiência seria a análise de fragmento por TapeStation. Contudo, esse procedimento, apesar de sua agilidade, flexibilidade e efetividade, é uma técnica custosa na pesquisa, devido ao preço de seus reagentes (Hale *et al.*, 2020), o que não se adequa a realidade de muitos laboratórios pelo país (Souza *et al.*, 2020).

Desse modo, levando em consideração as análises de estudos como o de Hale *et al.* (2020), a escolha pela espectrofotometria UV foi pautada levando em consideração a seu baixo custo e simplicidade de execução, visando torná-la mais facilmente replicável para outros laboratórios, o que é um dos objetivos deste trabalho. Além disso, outro fator decisivo para a escolha da utilização do NanoDrop™ foi a sua

alta sensibilidade em relação às outras técnicas, como as que se utilizam de PCR, uma vez que, visando acelerar a análise da efetividade do processo de extração utilizado, era mais adequado a seleção de um método de quantificação mais sensível, rápido e simples em relação a métodos mais específicos e que possuam execução mais trabalhosa. Ademais, outra vantagem de interesse no NanoDrop™ estar em sua capacidade de, além de estimar a concentração de DNA, medir o grau de pureza das amostras através da relação de razão de absorbância (A_{260}/A_{280}) de uma amostra, onde uma razão de $A_{260}/280$ igual ou superior a 1.8 indicaria uma amostra com alto grau de pureza (Schiebelhut *et al.*, 2017).

Em suma, foi realizada uma análise da quantidade e da qualidade do DNA após a realização da extração pela técnica anteriormente descrita, a fim de averiguar a efetividade e a qualidade desse processo de extração para que pudesse dar continuidade a validação da técnica. Sendo assim, como visualizado no quadro 6, o resultado obtido da concentração de DNA presente em cada uma das amostras foi diferente de 0 ng/μL, indicando, portanto, a presença de material genético e, conseqüentemente, que o processo de extração utilizado foi capaz de extrair alguma molécula de DNA. O sucesso dessa etapa inicial é um importante resultado para esse trabalho, pois apenas com a confirmação da presença de algum material genético na amostra extraída poderia-se dar prosseguimento para as próximas análises sem que houvesse necessidade de modificar o processo de extração. Contudo, como anteriormente citado, não é possível determinar a partir dessa única análise se o DNA presente é humano ou se ele é oriundo de contaminação ambiental (bactérias ou outros mamíferos), como também não é possível estimar se o DNA é ancestral ou se é contaminação com o material genético do próprio manipulador durante o manuseio das amostras, uma vez que o equipamento é apenas capaz de fornecer dados relacionado a concentração e ao grau de pureza.

Sobre os resultados (Quadro 6), as amostras com as maiores médias de concentrações de DNA entre as 16 amostras foi a de nº 11, com a maior média de DNA (32,4 ng/μL), a de nº 2 (24,2 ng/μL) e a de nº 6 (16,7 ng/μ), enquanto a amostra nº 1 apresentou a menor média concentração de material genético entre todas as outras (7,8 ng/μL). Desse modo, é possível notar uma grande variabilidade entre os resultados das maiores amostras (32,4 ng/μL e 24,2 ng/μL) em comparação ao menor dos resultados (7,8 ng/μL). Contudo, quando comparado a outros ensaios de extração

de DNA ancestral, como o de Straube *et al.* (2021) e o de Khafaei *et al.* (2021), os quais também realizaram o controle de qualidade de suas amostras com o NanoDrop™, mas se utilizaram de diferentes métodos de extração, seus valores de concentração de DNAa também apresentaram uma grande variação por amostra, algumas dessas apresentando, até mesmo, valores abaixo do valor mensurável ($<0,05$ ng/μl). Portanto, é possível evidenciar que a grande variedade dos valores de concentração não está associada, majoritariamente, com a natureza do método de extração, uma vez que diferentes processos extrativos geraram a mesma tendência a variação no resultado, mas sim, ao estado característico de degradação desuniforme do material genético ancestral, sendo evidenciado no trabalho de Straube *et al.* (2021), onde suas amostras de mesma origem e com a mesma quantidade de tecidos, geraram resultado diferentes entre si, tanto quanto sua concentração, como seu grau de pureza.

Sobre a pureza do DNAa, é de extrema importância que essas amostras possuam um material genético ancestral purificada para realização de estudos arqueológicos e evolutivos, uma vez que as impurezas presentes na amostra são capazes de resultar em variações aleatórias e imprevisíveis nos resultados, juntamente com erros que levam a interpretações errôneas nas análises genéticas e filogenéticas da população (Skoglund *et al.*, 2014) e até mesmo inibindo o PCR ou outros processos de manipulação do DNA (Rohland *et al.*, 2018). Nesse sentido, é comum a utilização de técnicas de purificação e concentração de DNA como uma etapa subsequente ao processo de extração de material genético, visando superar os problemas característicos de trabalhar com esse tipo de material (Skoglund *et al.*, 2014). Entre as diversas técnicas utilizadas, a mais amplamente difundida é a adsorção de DNA por partículas de dióxido de silício (sílica). Esse processo se baseia na adição de uma suspensão de sílica para adsorver o DNA para então realizar a retirada de impurezas com adição de uma solução tampão de limpeza, resultando em um produto com menos inibidores enzimáticos (Rohland *et al.*, 2018). Portanto, para esse trabalho, a extração automatizada pelo Extracta 32, realizou uma purificação automatizada das amostras pela metodologia de beads magnéticos. Essa técnica de purificação já foi empregada em outros trabalhos de análise de DNAa (Hawkins *et al.*, 2022), mostrando que, apesar da sua menor eficiência quando comparado a outros protocolos de purificação, beads magnéticos conseguem ser um método menos tóxico

para purificação de ácido nucleicos e melhor escalonável para amostras de tecido maiores (Hawkins *et al.*, 2022).

Sendo assim, através da relação de absorbância, foi-se analisada a pureza do material genético das amostras (Quadro 7). É possível observar que a média das razões de absorbância 260/280 das 16 amostras foi em torno de a 1,64, o qual é um valor inferior ao intervalo ideal de 1.8 - 2.0, indicando que uma parcela considerável das amostras não atingiu o intervalo ideal. Sendo que, desses valores, foram as amostras nº 10 / Toca dos astros (1,89), nº 11 / Furna dos ossos (1,82), nº 12 / Toca dos astros (2), nº 15 / Apa das onças (1,86) e nº 16 / Cemitério dos bexiguentos (1,88), as quais apresentaram uma razão de absorbância dentro desse intervalo, sugerindo uma melhor qualidade do DNA nessas amostras em relação às demais. Já as amostras nº 1 e nº 2 apresentaram uma média de razão bem abaixo do intervalo adequado, 1,25 e 1,26, respectivamente, sugerindo uma menor pureza no material genético obtido. Existem múltiplas causas que podem resultar nesse menor valor de pureza das amostras extraídas. Entre as principais está a natureza do material, uma vez que, como anteriormente dito, o DNAa é altamente degradado e danificado, além de, em muitos casos, estar contaminado com produtos biologicamente degradados, com DNA endógenos de outras espécies ou até mesmo com DNA humano moderno (Chen; Nedoluzhko, 2023; Pinhasi *et al.*, 2015). Portanto, novamente, não se pode relacionar diretamente os valores obtidos do resultado com a técnica executada, uma vez que as características normais do DNAa é possuir um alto grau de impureza devido às condições adversas do ambiente que se encontrava. Contudo, é possível observar que as amostras com os melhores graus de pureza foram as extraídas utilizando o kit MCFD (nº9 - nº16), indicando uma melhor compatibilidade desse kit para extração de DNAa quando comparada ao kit MPTA-MDx, o qual, nas 8 amostras extraídas por ele (nº1 - nº8), nenhum material genético apresentou um valor igual ou superior ao ideal (1.8). Possivelmente, isso está relacionado à natureza dos kits, uma vez que o kit MPTA-MDx é formulado para ser mais bem utilizado no isolamento de DNA e RNA de diversos tipos de microrganismos enquanto o MCFD para DNA humano circulante. Portanto, mesmo fragmentado, o DNAa apresentou melhor compatibilidade ao ser extraído utilizando o kit para extrair material genético humano circulante.

Quadro 6: Valores das concentrações de DNAa em triplicata e a média dessas concentrações por amostra.

Amostra	Concentração 1 (ng/μL)	Concentração 2 (ng/μL)	Concentração 3 (ng/μL)	Média das concentrações
1	8,3	7	8,1	7,8
2	23,3	24,9	24,5	24,2
3	11,8	10,1	10,9	10,9
4	15,6	15,2	16,2	15,6
5	12,8	12,3	11,3	12,1
6	17,4	16,1	16,7	16,7
7	13,6	14,8	14,0	14,4
8	12,1	13,2	12,0	12,4
9	14,4	13,2	14,0	13,8
10	9	10,2	9,8	9,6
11	31,6	32,9	32,0	32,4
12	9,1	8,6	8,5	8,7
13	14,1	15,0	14,2	14,4
14	12,1	12,5	12,4	12,3
15	8,9	8,6	8,5	8,6
16	9,8	9,2	9,8	9,6

Fonte: elaborado pelo autor.

Quadro 7: Valores da média da Concentração de DNA e da Razão de absorbância 260/280 pelo Nanodrop por amostra e seu respectivo sítio arqueológico.

Amostra	Média das Concentração (ng/μL)	260/280	Sítio Arqueológico
1	7,8	1,25	Apa das onças
2	24,2	1,26	Furna dos ossos
3	10,9	1,6	Serrote dos ossos
4	15,6	1,53	Toca dos astros
5	12,1	1,58	Serrote dos ossos
6	16,7	1,62	Serrote dos ossos
7	14,4	1,47	Serrote dos ossos

8	12,4	1,54	Furna dos ossos
9	13,8	1,62	Toca dos astros
10	9,6	1,89	Toca dos astros
11	32,4	1,82	Furna dos ossos
12	8,7	2	Toca dos astros
13	14,4	1,62	Apa das onças
14	12,3	1,73	Apa das onças
15	8,6	1,86	Apa das onças
16	9,6	1,88	Cemitério dos bexiguentos

Fonte: elaborado pelo autor.

5.2 Caracterização e avaliação do DNA extraído através do gel agarose 2% ampliado por PCR

Como anteriormente comentado, o PCR é um processo que apresenta uma grande importância histórica na pesquisa do DNAa, compondo, por muitos anos, a metodologia tradicional utilizada para a identificação e a análise dessas amostras, a qual consistia em utilizar o PCR para amplificar os fragmentos alvos, recuperando as regiões degradadas, para então realizar o sequenciamento dos pares de base desses clones com Sanger (Rizzi *et al.*, 2012). Contudo, ao longo das décadas, com a evolução desse campo científico, foi se percebendo que a utilização dessa técnica de clonagem do material genético como uma das principais ferramenta de investigação, mesmo com os melhores esforços, apresenta muitas dificuldades relacionada ao conflito da natureza fragmentada DNAa com o método de amplificação, as quais não podem ser facilmente corrigidas (Brzobohatá *et al.*, 2017). Atualmente, o PCR seguido pelo sequenciamento de Sanger perdeu seu lugar de destaque para a tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), a qual revolucionou o estudo de evolução e de ancestralidade, por possibilitar a análise de moléculas menores que o limite possível de atuação para o PCR e a caracterização dos pares de bases que compõem o DNAa, uma vez que a maioria do material arqueológico fornece amostras curtas demais para serem amplificadas, além da uma alta geração de dados que era impossível de serem obtidas a uma década atrás (Key *et al.*, 2017). Ainda assim, o

PCR não se encontra obsoleto e totalmente descartado no campo de estudo do DNA ancestral. De fato, hoje, trabalhos como o de Hong *et al.* (2025) e o de Rizzi *et al.* (2012) detalham como o PCR recuperou seu espaço na extração de DNAa moderna, agora, não mais como uma das metodologias de análise, mas como uma técnica auxiliar do processo de avaliação.

Como detalhado no trabalho de Hong *et al.* (2025), os custos e a complexidade associados à técnica de sequenciamento de nova geração resultam em atrasos ou, até mesmo, a não realização da avaliação genética do material arqueológico. Isto aliado a tendência desse material de continuar a se decompor ao longo do tempo, levam a perda de dados que poderiam alavancar, ainda mais, o entendimento filogenético das populações. Sendo assim, devido a facilidade, a rapidez e, mais importante, o baixo custo do PCR, essa técnica pode ser integrada na metodologia de análise do DNAa, a qual, após a realização da extração do material genético, seria utilizada para produzir um relatório preliminar. Esse relatório serviria para auxiliar o fluxo do trabalho, gerando amostras mais promissoras para a realização da análise por NGS, assim, acelerando e reduzindo os custos da análise através da otimização do trabalho. Isso se deve à capacidade da sonda e do primer, utilizados na técnica, de se ligar, seletivamente, a uma região alvo de interesse no DNA e, a partir disso, amplificá-lo numa grande quantidade, o qual é convertido em uma biblioteca e, posteriormente, sequenciado. Dessa maneira, o sequenciamento se torna muito mais fácil e mais direcionado do que em comparação a realização do sequenciamento da mesma biblioteca sem a amplificação prévia do DNA da amostra. É importante salientar que, mesmo com essa importante vantagem, a utilização do PCR possui desvantagens, como a alta seletividade do processo de amplificação e o aumento da taxa de incorporações errôneas nas extremidades dos fragmentos amplificados. Esses problemas resultam em confusão na interpretação dos dados, uma vez que, durante a reação, é necessário a utilização de primers para se ligar ao material genético e, então, duplicá-lo, contudo, quando se trabalha com DNAa, dificilmente consegue-se trabalhar com fitas intactas, podendo resultar em amostras que não serão amplificadas ou amostras amplificadas com erros da sua sequência de pares de base nas extremidades (Rizzi *et al.*, 2012). Portanto, é necessário considerar todos esses aspectos ao utilizar PCR durante a análise de DNAa. Sendo assim, como esse trabalho tem como objetivo ser simples e acessível a diferentes laboratórios

brasileiros, foi decidido pela utilização do PCR como ferramenta de auxílio na análise de extração do DNAa, visando a otimização dos resultados.

Dessa forma, o PCR foi empregado nesta pesquisa para identificar e para ampliar a região hipervariável (HVR) do DNAm do material genético ancestral extraído, com a finalidade de construir uma biblioteca para o sequenciamento de Sanger. Essa escolha foi fundamentada em estudos de ancestralidades, tais como Alves-Silva *et al.* (2000) e Valverde *et al.* (2009) que utilizaram amplificação de HVR para investigar os haplogrupos mais proeminentes dentro da população brasileira para o rastreio fitogeográfico de suas linhagens maternas. Isso é possível devido à herança matrilinear do DNAm (Merheb *et al.*, 2019). Assim, diferentes pesquisas estimaram a existência de um ancestral matrilinear comum para toda a população humana que viveu há aproximadamente 200.000 anos no continente africano, pelo qual todo DNAm da espécie humana teria sido herdado (Macaulay *et al.*, 2005; Mishmar *et al.*, 2003). A partir desse conhecimento, tornou-se possível acompanhar a dispersão e a evolução das diferentes populações humanas, por meio da análise do acúmulo de mutações herdadas na sequência hipervariável desse DNAm. Sendo assim, essas variações são transmitidas ao longo da linhagem materna de uma população, interligando esse grupo a partir de um ancestral em comum (Van Oven; Kayser, 2009). Desse modo, ao analisar o HVR de amostras ancestrais é possível produzir inferência de sua ancestralidade e expandido o conhecimento da histórica genética de populações passadas e atuais (Melchior *et al.*, 2008).

Como resultado complementar, a ampliação do material genético pelo PCR a partir do HVR também serviria para comprovar que o DNA obtido nas amostras extraídas foi humano, uma vez que, como dito anteriormente, havia o risco de contaminação microbiológica durante o processo - sendo a avaliação qualiquantitativa do Nanodrop™ incapaz de diferenciá-los, havendo, portanto, a possibilidade de todo material genético quantificado não ser humano (Brzobohatá *et al.*, 2017). Assim, se não houvesse a amplificação de nenhum DNA humano nas 16 amostras dentárias, a metodologia de extração empregada seria considerada inadequada para extração de DNAa. Além do viés eliminatório, a utilização do PCR também foi desejada para facilitar o sequenciamento da biblioteca pela tecnologia de Sanger e, futuramente, pelo Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

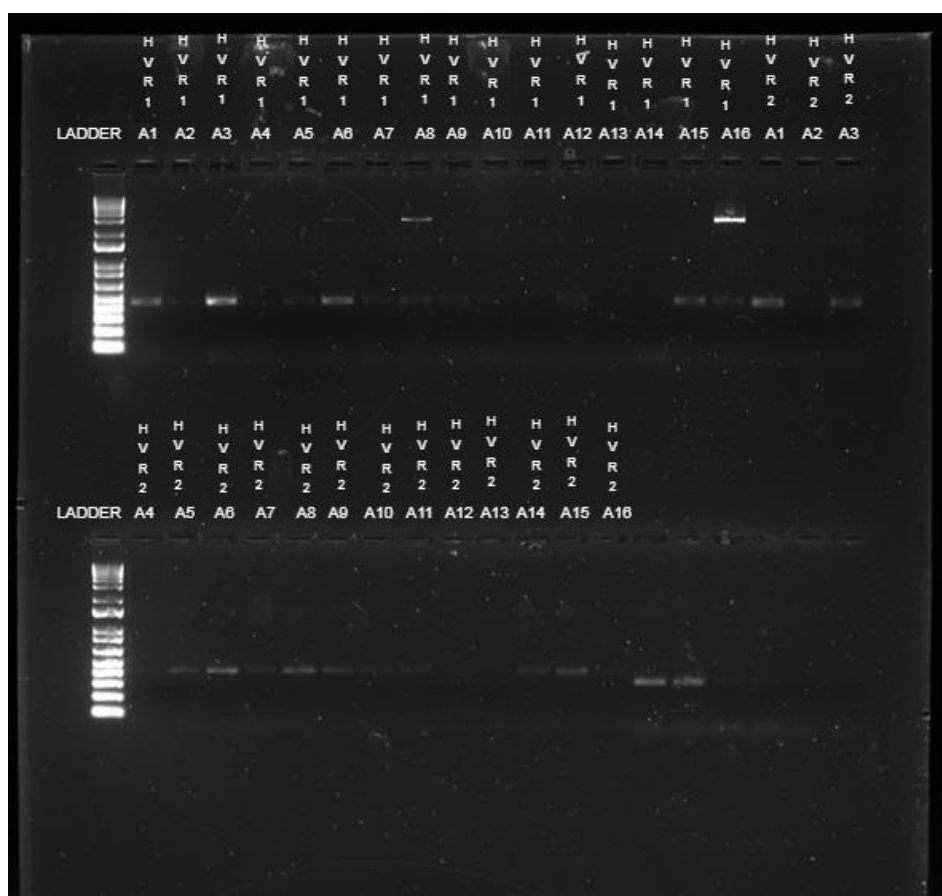
Como é possível ser visualizado na figura 8, o resultado da eletroforese em gel de agarose mostrou alguns dados relevantes. Primeiro, a maioria das amostras amplificou para alguma região hipervariável do DNAm (HVR-1 e HVR-2). Esse resultado, junto com o da concentração proteica, é bastante significativo para validação da extração automatizada do Extracta® 32 por *beads* magnéticas como uma técnica para extração de DNAa. Isso é possível de ser inferido a partir da relação de ambos os resultados, uma vez que é possível observar que esse método automatizado foi capaz de extrair em quantidade significativas material genético humano ancestral, sendo que os primers utilizados são capazes de unicamente amplificar DNAm humano (Alves-Silva *et al.*, 2000) e que as condições de esterilidade do local de extração foram planejados para evitar a contaminação com DNA moderno (Gondek; Boessenkool; Star., 2018; Pinhasi *et al.*, 2019). Entretanto, apenas como realização do sequenciamento das amostras é possível recuperar as informações do DNA para identificá-las como DNAa, de modo que a verdadeira natureza das amostras deste estudo só poderá ser revelada após a realização do sequenciamento por NGS, devido às limitações referentes ao processo anterior, o sequenciamento de Sanger (Rizzi *et al.*, 2012). Em contraste, a única amostra que não amplificou foi a de nº 13 (Apa das onças) para nenhuma das regiões, sendo retirada do processo de sequenciamento por Sanger. Novamente, a natureza fragmentada do DNAa pode ser a causa dessa ocorrência, uma vez que, se, na estrutura do DNAm, a cadeia de nucleotídeos complementar ao primer estiver danificada, o primer não é capaz de se ligar ao material genético e a DNA polimerase não consegue iniciar a replicação (Wages, 2005). Assim, mesmo que haja DNAa extraído, ele é incapaz de ser ampliado, sendo este um dos principais problemas associados à análise de DNAa pela metodologia tradicional (Rizzi *et al.*, 2012). O restante das amostras amplificou minimamente para uma das regiões, permanecendo, portanto, viável para o sequenciamento pelo método de Sanger e para validação do DNA ancestral.

Ainda sobre a figura 8, nota-se a presença de algumas amostras com mais de uma banda de amplificação (HVR-1 A8 e HVR-1 A16). Essas bandas adicionais são produtos de amplificação não especificados, os quais não contêm a sequência de DNAa relevante, sendo falhas possíveis de serem observadas após a amplificação por PCR do DNAa (Pääbo, 1989). É importante acrescentar que trabalhos, como o de Ruiz-villalba *et al.* (2017), relacionaram as baixas concentrações do DNA molde ao

aumento no aparecimento desses artefatos após o PCR, o que pode explicar a frequência desses achados em amostras de DNAa, que geralmente são obtidas em baixíssimas concentrações (Pinhasi *et al.*, 2015).

Ademais, é possível observar na compilação de dados (Quadro 8) que as amostras 1 (Apa das onças), 3 (Serrote dos ossos), 5 (Serrote dos ossos), 7 (Serrote dos ossos), 9 (Toca dos astros) e 15 (Apa das onças) amplificaram para as duas regiões mitocondriais analisadas, sendo, portanto, as amostras com a estrutura hipervariável do seu DNAm mais intacto. Esperava-se uma amplificação de ambos os HVR nas amostras com os valores na faixa de razão de absorbância de ideal (nº 10, nº 11, nº 12, nº 15 e nº 16), uma vez que estudos como o de Ning *et al.* (2009) relacionam a razão de absorbância A260/280 com os resultados da PCR, sendo que, quanto mais próximo de índice ideal (1.8), melhor o resultado da reação. Isso, mais uma vez, pode estar associado a natureza errática e fragmentada do DNAa (Rizzi *et al.*, 2012). Ainda assim, o motivo para que amostras com baixo valor da razão de absorbância 260/280, como a amostra nº 1, consigam amplificar de forma mais efetiva que amostras como a n12 já foi revisada em trabalhos no campo de DNAa (King *et al.*, 2009). Nessa pesquisa, é explicado que é possível ocorrer a amplificação do material genético ancestral sem um controle rígido em sua pureza. Portanto, mesmo que a purificação do DNAa seja imprescindível para uma análise eficiente do material (Skoglund *et al.*, 2014), um valor baixo de pureza não significa que haverá falha ou impedimento da PCR para esse tipo de amostra.

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose 2% das amostras na análise de amplificação das regiões mitocondriais (HSV1, HSV2) com e sem contraste. Nela, as amostras foram colocadas em sequência crescente (1 a 16), sendo os primeiros dezesseis poços para investigar a amplificação para HVR-1 e os dezesseis poços seguintes para amplificação da HVR-2.



Fonte: elaborada pelo autor.

Quadro 8: Relação das amostras, as respectivas regiões mitocondriais amplificadas e sua razão de absorvância 260/280.

Amostra	HVR 1	HVR 2	260/280
1	x	x	1,25
2	x		1,26
3	x	x	1,6
4		x	1,53
5	x	x	1,58
6		x	1,62
7	x	x	1,47
8		x	1,54
9	x	x	1,62
10	x	x	1,89

11		x	1,82
12	x		2
13			1,62
14		x	1,73
15	x	x	1,86
16		x	1,88

Fonte: elaborado pelo autor.

5.3 Identificação e análise da qualidade dos haplogrupos do DNA mitocondrial obtidos do Sequenciamento de Sanger

Antes da revolução que o NGS trouxe ao campo dos estudos evolutivos e filogenéticos ao aumentar exponencialmente o conhecimento sobre as migrações, interações, expansões e desaparecimentos de populações passadas (Key *et al.*, 2017), a metodologia tradicional (PCR + Sequenciamento de Sanger) , por muitos anos, foi a única tecnologia capaz de decodificar o material genético ancestral, o que possibilitou um salto gigantesco no entendimento genético humano (Rizzi *et al.*, 2012), como quando ocorreu a decodificação do DNA humano (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004) e o sequenciamento do *Homo neanderthalensis* (Krings *et al.*, 1997).

Nesse sentido, apesar do sequenciamento de Sanger está perdendo sua importância no campo de estudo da ancestralidade para o NGS, de forma análoga ao que ocorreu com o PCR (Hong *et al.*, 2025), essa técnica ainda encontra utilização para otimização da análise de DNAa. Esse procedimento é descrito por Šenovská *et al.* (2021), que destaca a utilização prévia do sequenciamento Sanger em regiões-alvo específicas do DNA ancestral, como as HVR-1 e HVR-2, como uma estratégia eficaz para validar a integridade do material genético antes da construção das bibliotecas para NGS. Essa abordagem permite realizar uma triagem inicial dos haplogrupos presentes, o que contribui para a seleção criteriosa das amostras mais adequadas ao sequenciamento de alto rendimento. Com isso, reduz-se a produção de bibliotecas mal-sucedidas, otimizando o uso de recursos e aumentando a eficiência geral do processo. Portanto, seguindo a mesma lógica que fundamentou o uso da PCR nesta pesquisa, optou-se por incorporar o sequenciamento Sanger ao fluxo de

trabalho. Essa etapa foi empregada com o objetivo de identificar os haplogrupos das amostras previamente amplificadas, permitindo uma triagem genética inicial. Trata-se de uma fase crucial nessa pesquisa, uma vez que os resultados dessa metodologia ditaram quais são as amostras contaminadas — muitas vezes indicadas pela presença de haplogrupos típicos de populações europeias — e aquelas que apresentam haplogrupos predominantes em populações nativo-americanas: A, B, C e D (Gaeta, 2021). Essa diferenciação é estratégica para garantir a autenticidade do material genético analisado e, consequentemente, selecionar com maior rigor as amostras que seguirão para a etapa de construção de bibliotecas de DNA e posterior sequenciamento por NGS (Šenovská *et al.*, 2021). Ao restringir essa técnica de alto custo às amostras mais relevantes e confiáveis, a abordagem adotada contribui significativamente para a otimização de recursos, a melhoria da eficiência do processo e a obtenção de resultados mais robustos e representativos do contexto populacional investigado.

Por fim, os resultados obtidos pela análise de sequenciamento por Sanger podem ser observados no quadro abaixo (Quadro 9). Como é possível ser observado, as amostras foram classificadas quanto ao seu haplogrupo se ela deve ou não ser incluída na análise posterior por NGS. Para isso, foram utilizados estudos de referência como o de Alves-Silva *et al.* (2000) e o de Valverde *et al.* (2009). Portanto, por se tratar de amostras do período pré-colonial (Cavalcante *et al.*, 2023; Lima *et al.*, 2018; Santos, 2009), espera-se que a ancestralidade matrilinear dessas amostras tenha se originada dos haplogrupos nativo-americanos (Gaeta, 2021), uma vez que não houve o contato dessa população pretéritas com o DNAm europeu ou africano. Entre as 15 amostras sequenciadas, ao basear-se em estudos como o de De souza *et al.* (2025), as amostras nº 1 (C1b11*), 3 (C1a*), 6 (A2), 7 (A2), 8 (C1), 10 (B2*2), 12 (A+152+16362), 14 (B2a2*1) e 16 (B4a1c3a) apresentam haplogrupos característicos dos povos indígenas do Brasil em sua região hipervariável, sendo, portanto, as amostras selecionadas para a construção da biblioteca para o NGS. É possível observar que pelo menos uma amostra de cada sítio apresentou um haplogrupo nativo-americano, sendo o sítio com mais amostra incluídas o serrote dos ossos (3), seguido pela Toca dos Astros (2) e pela Apa das Onças (2), finalizando com Furna dos ossos (1) e Cemitério dos bexiguentos (1).

Enquanto isso, as amostras nº 2 (L0a2a1*), 4 (H8+(114)+152), 5 (K1a4c1*1a), 9 (G2a3), 11 (K1a4c1*1a), 15 (K1a4c1*1a) foram descartadas por não apresentarem o haplogrupo nativo-americano. Existem diversas razões para isso, a principal sendo a contaminação com o DNA moderno, a qual, mesmo com a adoção de rigorosas medidas de prevenção à contaminação durante a preparação das amostras em laboratório, ainda representa um desafio persistente na área, difícil de ser completamente superado (Skoglund *et al.*, 2014). Como evidenciado no trabalho de Drancourt (2016) e no de Hagelberg, Hofreiter e Keyser (2015), a contaminação de um material arqueológico pode acontecer em diferentes etapas do fluxo de trabalho, desde a contaminação por outros seres vivos que morreram próximos ao material, como pela contaminação pelo manuseio durante a escavação, o armazenamento e a extração do DNAa. Por isso, não se pode afirmar, com certeza, em quais dessas etapas o material foi contaminado. Dessas amostras, a amostra nº 2 apresentou um haplogrupo associado a linhagem africana (Rito *et al.*, 2013), enquanto o haplogrupo da amostra nº 9 está relacionado com a população do norte da Ásia (Derenko *et al.*, 2007). Já as amostras nº 4, 5, 11 e 15 apresentaram haplogrupos tipicamente europeus (Alves-Silva *et al.*, 2000; Isern; Fort; De Rioja, 2017).

Por fim, os resultados do sequenciamento de Sanger foram extremamente positivos para o objetivo desse trabalho de validar a primeira extração de DNAa de remanescentes humanos no Brasil. Apesar de ainda ser necessário a realização de um sequenciamento por NGS para autenticar o conteúdo genético das amostras arqueológicas de forma definitiva (Key *et al.*, 2017), a detecção de haplogrupos nativo-americanos em 9 das 15 amostras é um forte indicativo da extração automatizada de DNAa pelo Extracta® 32, uma vez que os resultados obtidos estão em congruência com os haplogrupos identificados em material arqueológico brasileiro (Alves-Silva *et al.*, 2000; Valverde *et al.*, 2009).

Quadro 9: Compilação dos resultados obtidos pelo sequenciamento de Sanger em relação a número da amostra, haplogrupo do DNAm, sítio arqueológico e sobre sua inclusão no NGS. O quadro foi colorido em verde para indicar inclusão e em vermelho para indicar exclusão do processo.

Amostra:	Haplogrupo	Sítio Arqueológico	Incluir:
1	C1b11*	Apa das onças	Sim

2	L0a2a1*	Furna dos ossos	Não
3	C1a*	Serrote dos ossos	Sim
4	H8+(114)+152	Toca dos astros	Não
5	K1a4c1*1a	Serrote dos ossos	Não
6	A2	Serrote dos ossos	Sim
7	A2	Serrote dos ossos	Sim
8	C1	Furna dos ossos	Sim
9	G2a3	Toca dos astros	Não
10	B2*2	Toca dos astros	Sim
11	K1a4c1*1a	Furna dos ossos	Não
12	A+152+16362	Toca dos astros	Sim
14	B2a2*1	Apa das onças	Sim
15	K1a4c1*1a	Apa das onças	Não
16	B4a1c3a	Cemitério dos bexiguentos	Sim

Fonte: elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÃO:

Conclui-se, portanto, que esta pesquisa atingiu seu objetivo principal: descrever a primeira extração de DNA ancestral de remanescentes humanos no Brasil por meio de metodologia experimental em NB-2. Para tanto, esse trabalho empregou a extração e purificação automatizada pelo Extracta® 32, realizada com 16 amostras provenientes de sítios arqueológicos da Toca dos Astros (Congo, PB), do Serrote dos Ossos (Caraúbas, PB), da Furnas dos Ossos (São João do Cariri, PB), da Apa das Onças (São João do Tigre, PB) e do Cemitério de Bexiguentos (Frei Martinho, PB), com o uso de *beads* magnéticas. A quantificação e análise da pureza das amostras foram feitos por espectrofotometria UV utilizando o NanoDrop™, enquanto a amplificação das regiões hipervariáveis HVR-1 e HVR-2 foi conduzida por PCR, seguida de sequenciamento Sanger para a triagem preliminar dos haplogrupos nativo-americanos, visando orientar e otimizar análises futuras por meio de sequenciamento de nova geração (NGS). Espera-se que este trabalho possa impulsionar o campo da pesquisa em DNAa no Brasil, servindo como modelo metodológico para estudos futuros nessa área. Essa perspectiva de contribuição pioneira foi uma das principais motivações que orientaram a realização deste estudo.

Os resultados obtidos neste trabalho trouxeram robustez para o futuro processo de autenticação da extração do método de extração de DNAa pelo Extracta® 32, uma vez que eles apresentarem semelhança quando comparados com os resultados gerados por metodologias já autenticadas que são utilizadas em outros países para a extração de DNAa. Apesar disso, é necessário a realização de análises mais aprofundadas para a autenticação do processo extrativo. Nesse sentido, futuras investigações deverão incorporar NGS como ferramenta para confirmar a identidade e a integridade do material genético recuperado. Assim, as nove amostras que apresentaram amplificação para haplogrupos nativo-americanos serão analisadas em etapas posteriores, dando continuidade ao desenvolvimento deste estudo.

REFERÊNCIAS:

ADLER, C. J. *et al.* Survival and recovery of DNA from ancient teeth and bones.

Journal of archaeological science, v. 38, n. 5, p. 956–964, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0305440310004097?via%3Dihub>. Acesso em: 8 jun. 2025.

AL-SHUHAIB, M. B. S. HASHIM, H. O. Mastering DNA chromatogram analysis in Sanger sequencing for reliable clinical analysis. **Journal, genetic engineering & biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 115, 2023. Disponível em:

<https://jgeb.springeropen.com/articles/10.1186/s43141-023-00587-6>. Acesso em: 8 fev. 2025.

ALVES-SILVA, J. *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 2, p. 444–461, 2000. Disponível em: doi.org/10.1086/303004. Acesso em: 21 jun. 2025.

BERENSMEIER, S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 495–504, 2006. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7080036/>. Acesso em: 24 jun. 2025.

BOCCHINI, B. Ancient DNA study casts light on origin of ancestral Brazilians.

Agência Brasil, São Paulo, 2 set. 2023. Disponível em:

<https://agenciabrasil.ebc.com.br/en/geral/noticia/2023-08/ancient-dna-study-casts-light-origin-ancestral-brazilians>. Acesso em: 3 jan. 2025.

BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON W. M. Desvendando o Genoma Humano: Métodos de Estudo e Tratamento das Doenças Genéticas. In: BORGES-OSÓRIO, M. R.; ROBINSON W. M. **Genética Humana**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. cap 17.

BRIGGS, A. W. *et al.* Targeted retrieval and analysis of five Neandertal mtDNA genomes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 325, n. 5938, p. 318–321, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19608918/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

BRZOBOHATÁ, K. *et al.* Comparison of suitability of the most common ancient DNA quantification methods. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 21, n. 4, p. 265–271, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28384042/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

CAMPELO DOS SANTOS, A. L. *et al.* Genomic evidence for ancient human migration routes along South America's Atlantic coast. **Proceedings. Biological sciences**, v. 289, n. 1986, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1078>. Acesso em: 3 jan. 2025.

CANN, R. L.; STONEKING, M.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA and human evolution. **Nature**, v. 325, n. 6099, p. 31–36, 1987. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/325031a0>. Acesso em: 3 jan. 2025.

CAVALCANTE, T. S. *et al.* O sítio arqueológico Serrote dos Ossos, Caraúbas – PB e um breve estudo a partir do contexto fúnebre dos povos cariri. **Revista Tarairiú**, [S. l.], v. 1, n. 22, 2023. Disponível em: <https://revista.uepb.edu.br/REVELAP/article/view/1967>. Acesso em: 26 jun. 2025.

CHEN, N.; NEDOLUZHKO, A. Ancient DNA: the past for the future. **BMC Genomics**, v. 24, n. 1, p. 1–3, 2023. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-023-09396-0>. Acesso em: 2 jan. 2025.

CLAVEL, P. *et al.* Assessing the predictive taxonomic power of the bony labyrinth 3D shape in horses, donkeys and their F1-hybrids. **Journal of archaeological science**, v. 131, n. 105383, p. 105383, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305440321000534>. Acesso em: 7 jun. 2025.

COOPER, A.; POINAR, H. N. Ancient DNA: Do it right or not at all. **Science (New York, N.Y.)**, v. 289, n. 5482, p. 1139, 2000. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.289.5482.1139b>. Acesso em: 2 jan. 2025.

DALAL, V. *et al.* Advancements and challenges in ancient DNA research: Bridging the Global North–south divide. **Genes**, v. 14, n. 2, p. 479, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4425/14/2/479>. Acesso em: 2 jan. 2025.

DE SOUZA, F. G. *et al.* Mitochondrial ancestry from complete mitogenomes highlights a lack of characterization of indigenous haplogroups in Brazilian Amazon population. **Communications biology**, v. 8, n. 1, p. 835, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-025-08126-4>. Acesso em: 22 jul. 2025.

DERENKO, M. *et al.* Phylogeographic analysis of mitochondrial DNA in northern Asian populations. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 5, p. 1025–1041, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/522933>. Acesso em: 26 jun. 2025.

ENDICOTT, P. *et al.* The genetic origins of the Andaman Islanders. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 1, p. 178–184, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12478481/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

FERRAZ, T. *et al.* Genomic history of coastal societies from eastern South America. **Nature ecology & evolution**, v. 7, n. 8, p. 1315–1330, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41559-023-02114-9>. Acesso em: 3 jan. 2025.

GAETA, R. Ancient DNA and paleogenetics: risks and potentiality. **Pathologica**, v. 113, n. 2, p. 141–146, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8167392/>. Acesso em: 11 jun. 2025.

GONDEK, A. T.; BOESSENKOOL, S.; STAR, B. A stainless-steel mortar, pestle and sleeve design for the efficient fragmentation of ancient bone. **BioTechniques**, v. 64, n. 6, p. 266–269, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29939091/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

GREEN, R. E. *et al.* A draft sequence of the Neandertal genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 328, n. 5979, p. 710–722, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20448178/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

HAARKÖTTER, C. *et al.* A comparison of five DNA extraction methods from degraded human skeletal remains. **Forensic science international**, v. 348, n. 111730, p. 111730, 2023. Disponível em linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073823001809. Acesso em: 24 jun. 2025.

HABER, M. *et al.* A genetic history of the near east from an aDNA time course sampling eight points in the past 4,000 years. **The American Journal of Human Genetics**, v. 107, n. 1, p. 149–157, 2020. Disponível em: [https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297\(20\)30155-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0002929720301555%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/ajhg/fulltext/S0002-9297(20)30155-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0002929720301555%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 3 jan. 2025.

HAGELBERG, E.; HOFREITER, M.; KEYSER, C. Ancient DNA: the first three decades. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1660, p. 20130371, 2015. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2013.0371>. Acesso em: 2 jan. 2025.

HALE, H. *et al.* Strategies for reducing per-sample costs in target capture sequencing for phylogenomics and population genomics in plants: Low-cost Hyb-Seq. **Applications in plant sciences**, v. 8, n. 4, p. e11337, 2020. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7186906/?utm_source=chatgpt.com. Acesso em: 20 jun.2025.

HARNEY, É. *et al.* A minimally destructive protocol for DNA extraction from ancient teeth. **Genome research**, v. 31, n. 3, p. 472–483, 2021. Disponível em:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7919446/>. Acesso em: 7 jun. 2025.

HAWKINS, M. T. R. *et al.* A comparative analysis of extraction protocol performance on degraded mammalian museum specimens. **Frontiers in ecology and evolution**, v. 10, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/ecology-and-evolution/articles/10.3389/fevo.2022.984056/full>. Acesso em: 19 jun. 2025.

HIGGINS, D. *et al.* Differential nuclear and mitochondrial DNA preservation in post-mortem teeth with implications for forensic and ancient DNA studies. **PloS one**, v. 10, n. 5, p. e0126935, 2015. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0126935>. Acesso em: 8 jun. 2025.

HIGUCHI, R. *et al.* DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. **Nature**, v. 312, n. 5991, p. 282–284, 1984. Disponível em:

<https://www.nature.com/articles/312282a0>. Acesso em: 2 jan. 2025.

HONG, J. H. *et al.* Cost-effectiveness and other considerations for different research techniques applied in ancient DNA analysis. **Anatomy & cell biology**, v. 58, n. 1, p. 8–13, 2025. Disponível em:

https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11933814/?utm_source=chatgpt.com#T1. Acesso em: 18 jun. 2025.

HUBBE, M.; NEVES, W. A.; HARVATI, K. Testing evolutionary and dispersion scenarios for the settlement of the new world. **PloS one**, v. 5, n. 6, p. e11105, 2010. Disponível em: doi.org/10.1371/journal.pone.0011105. Acesso em: 19 jun. 2025.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 931–945, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature03001>. Acesso em: 25 jun. 2025.

ISERN, N.; FORT, J.; DE RIOJA, V. L. The ancient cline of haplogroup K implies that the Neolithic transition in Europe was mainly demic. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 11229, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11629-8>. Acesso em: 26 jun. 2025.

KEY, F. M. *et al.* Mining metagenomic data sets for ancient DNA: Recommended protocols for authentication. **Trends in genetics: TIG**, v. 33, n. 8, p. 508–520, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28688671/>. Acesso em: 18 jun. 2025.

KHAF AEI, M. *et al.* An Effective Method for Extracting DNA From Human Hair Samples. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v. 8, n. 2, p. 141-145, 2021. Disponível em: https://www.biotechrep.ir/article_117890.html. Acesso em: 16 jun. 2025.

KING, C. *et al.* A quantitative approach to detect and overcome PCR inhibition in ancient DNA extracts. **BioTechniques**, v. 47, n. 5, p. 941–949, 2009. Disponível em: doi.org/10.2144/000113244. Acesso em: 22 jun. 2025.

KRINGS, M. *et al.* Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 19–30, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9230299/>. Acesso em: 2 jan. 2025.

LARSON, G. *et al.* Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 39, p. 15276–15281, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17855556/>. Acesso em: 2 jan. 2025.

LIMA, D. V. R. DE *et al.* O SÍTIO CEMITÉRIO FURNA DOS OSSOS EM SANTANA DO MATOS-RN: Estudos Preliminares dos Restos Osteológicos Humanos Encontrados em Superfície. **CLIO - Arqueológica**, v. 32, n. 2, p. 17, 2018. Disponível em: doi.org/10.20891/clio.v32n2p17-47. Acesso em: 26 jun. 2025.

LLAMAS, B. *et al.* From the field to the laboratory: Controlling DNA contamination in human ancient DNA research in the high-throughput sequencing era. **Science and technology of archaeological research**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2017. Disponível: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20548923.2016.1258824>. Acesso em: 19 jun. 2025.

MACAULAY, V. *et al.* Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5724, p. 1034–1036, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15890885/>. Acesso em: 22 jun. 2025.

MELCHIOR, L. *et al.* Evidence of authentic DNA from Danish Viking Age skeletons untouched by humans for 1,000 years. **PloS one**, v. 3, n. 5, p. e2214, 2008. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002214>. Acesso em: 22 jun. 2025.

MERHEB, M. *et al.* Mitochondrial DNA, a powerful tool to decipher ancient human civilization from domestication to music, and to uncover historical murder cases. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 5, p. 433, 2019. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/5/433>. Acesso em: 3 jan. 2025.

MERRIWETHER, D. A.; FERRELL, R. E. The four founding lineage hypothesis for the New World: a critical reevaluation. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 5, n. 1, p. 241–246, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8673292/>. Acesso em: 22 jun. 2025.

MISHMAR, D. *et al.* Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 1, p. 171–176, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12509511/>. Acesso em: 22 jun. 2025.

MORAES-FILHO, E. M. L.-J. *et al.* Uso da pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*), como curativo biológico oclusivo, no tratamento de queimaduras. **Revista Brasileira de Queimaduras**, v. 16, n. 1, p. 10–17, 2017. Disponível em:

<http://rbqueimaduras.org.br/details/341/pt-BR/uso-da-pele-de-tilapia--oreochromis-niloticus---como-curativo-biologico-oclusivo--no-tratamento-de-queimaduras>. Acesso em: 21 jun. 2025.

MORENO-MAYAR, J. V. *et al.* Early human dispersals within the Americas. **Science (New York, N.Y.)**, v. 362, n. 6419, 2018. Disponível em:

<https://www.science.org/doi/full/10.1126/science.aav2621>. Acesso em: 8 fev. 2025.

NEVES, W. A.; HUBBE, M. Cranial morphology of early Americans from Lagoa Santa, Brazil: implications for the settlement of the New World. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 51, p. 18309–18314, 2005. Disponível em:

<https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.0507185102>. Acesso em: 19 jun. 2025.

NIEVES-COLÓN, M. A. *et al.* Comparison of two ancient DNA extraction protocols for skeletal remains from tropical environments. **American journal of physical anthropology**, v. 166, n. 4, p. 824–836, 2018. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29603124/>. Acesso em: 24 jun. 2025.

NING, J. *et al.* Different influences of DNA purity indices and quantity on PCR-based DGGE and functional gene microarray in soil microbial community study. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 5, p. 983–993, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-009-1912-0>. Acesso em: 22 jun. 2025.

PÄÄBO, S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. **Nature**, v. 314, n. 6012, p. 644–645, 1985. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/314644a0>. Acesso em: 2 jan. 2025.

PÄÄBO, S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 6, p. 1939–1943, 1989. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.86.6.1939>. Acesso em: 23 jul. 2025.

PARKER, C. *et al.* A systematic investigation of human DNA preservation in medieval skeletons. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 18225, 2020. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-75163-w>. Acesso em: 7 jun. 2025.

PENNA, P. M. M. *et al.* BIOSSEGURANÇA: UMA REVISÃO. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 555–565, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v77p5552010>. Acesso em: 21 jun. 2025.

PINHASI, R. *et al.* Isolating the human cochlea to generate bone powder for ancient DNA analysis. **Nature protocols**, v. 14, n. 4, p. 1194–1205, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0137-7>. Acesso em: 3 jan. 2025.

PINHASI, R. *et al.* Optimal ancient DNA yields from the inner ear part of the human petrous bone. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129102, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0129102>. Acesso em: 7 jun. 2025.

PONCE DE LEÓN, M. S. *et al.* Human bony labyrinth is an indicator of population history and dispersal from Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 16, p. 4128–4133, 2018. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1717873115>. Acesso em: 7 jun. 2025.

POSTH, C. *et al.* Deeply divergent archaic mitochondrial genome provides lower time boundary for African gene flow into Neanderthals. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 16046, 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/ncomms16046>. Acesso em: 19 jun. 2025.

POSTH, C. *et al.* Reconstructing the deep population history of central and south America. **Cell**, v. 175, n. 5, p. 1185- 1197.e22, 2018. Disponível em: [https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(18\)31380-1](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(18)31380-1). Acesso em: 8 fev. 2025.

PUSHPARAJ, P. N. Revisiting the micropipetting techniques in Biomedical Sciences: A fundamental prerequisite in good laboratory practice. **Bioinformation**, v. 16, n. 1, p. 8–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.6026/97320630016008>. Acesso em: 21 jun. 2025.

RAMIREZ, A. Teste de PCR como ferramenta de diagnóstico (1/2): Princípios básicos. **3tres3**, 20 jun. 2022. Disponível em: https://www.3tres3.com.br/artigos/teste-de-pcr-como-ferramenta-de-diagnostico-1-2-principios-basico_2422/. Acesso em: 3 jun. 2025.

RITO, T. *et al.* The first modern human dispersals across Africa. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80031, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24236171/>. Acesso em: 26 jun.2025.

RIZZI, E. *et al.* Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. **Genetics, selection, evolution: GSE**, v. 44, n. 1, 2012. Disponível em: <https://gsejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1297-9686-44-21>. Acesso em: 2 jan. 2025.

ROHLAND, N. *et al.* Extraction of highly degraded DNA from ancient bones, teeth and sediments for high-throughput sequencing. **Nature protocols**, v. 13, n. 11, p. 2447–2461, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41596-018-0050-5>. Acesso em: 8 fev. 2025.

ROHLAND, N.; HOFREITER, M. Ancient DNA extraction from bones and teeth. **Nature protocols**, v. 2, n. 7, p. 1756–1762, 2007. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.247>. Acesso em: 7 jun. 2025.

RUIZ-VILLALBA, A. et al. Amplification of nonspecific products in quantitative polymerase chain reactions (qPCR). **Biomolecular detection and quantification**, v. 14, p. 7–18, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.10.001>. Acesso em: 23 jul. 2025.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/271968/>. Acesso em: 19 jun. 2025.

SANTOS, J. D. S. **Cariri e Tarairiú? Culturas tapuias nos sertões da Paraíba**. 2009. Tese (Doutorado em História) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: <http://tede2.pucrs.br/tede2/handle/tede/2318>. Acesso em: 26 jun. 2025.

SCHIEBELHUT, L. M. *et al.* A comparison of DNA extraction methods for high-throughput DNA analyses. **Molecular ecology resources**, v. 17, n. 4, p. 721–729, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12620>. Acesso em: 15 jun. 2025.

ŠENOVSÁ, A. *et al.* Sanger sequencing of mitochondrial hypervariable region of ancient samples for DNA authentication and screening before high-throughput sequencing. **Journal of archaeological science, reports**, v. 40, n. 103216, p. 103216, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2352409X21004284>. Acesso em: 26 jun. 2025.

SILVA, P. C.; MALABARBA, M. C.; MALABARBA, L. R. Using ancient DNA to unravel taxonomic puzzles: the identity of *Deuterodon pedri* (Ostariophysi: Characidae). **Neotropical ichthyology**, v. 15, n. 1, p. e160141, 2017. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ni/a/fRmwmGRzmJhXPz9zHQ8X6Yf/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

SILVA, R. C. DA *et al.* Comparison of DNA extraction methods for COVID-19 host genetics studies. **PloS one**, v. 18, n. 10, p. e0287551, 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10615309/#:~:text=Comparison>. Acesso em: 24 jun. 2025.

SILVA, R. C.; LIMA, A.; SOUZA, L. C. DA S. Principais métodos de sequenciamento de DNA. **Scientific Electronic Archives**, v. 15, n. 10, 2022. Disponível em: <https://sea.ufr.edu.br/index.php/SEA/article/view/1603>. Acesso em: 8 fev. 2025.

SIRAK, K. *et al.* Human auditory ossicles as an alternative optimal source of ancient DNA. **Genome research**, v. 30, n. 3, p. 427–436, 2020. Disponível em: <https://genome.cshlp.org/content/30/3/427>. Acesso em: 7 jun. 2025.

SKOGLUND, P. *et al.* Separating endogenous ancient DNA from modern day contamination in a Siberian Neandertal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 6, p. 2229–2234, 2014. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1318934111>. Acesso em: 17 jun. 2025.

SKOURTANIOTI, E. *et al.* Ancient DNA reveals admixture history and endogamy in the prehistoric Aegean. **Nature ecology & evolution**, v. 7, n. 2, p. 290–303, 2023. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/jhg2016147>. Acesso em: 3 jan. 2025.

SOUZA, D. L. DE *et al.* A perspectiva dos pesquisadores sobre os desafios da pesquisa no Brasil. **Educação e Pesquisa**, v. 46, p. e221628, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ep/a/WgdZnSMrX49LLTJMffmsqNK/>. Acesso em: 18 jun. 2025.

STRAUBE, N. *et al.* Successful application of ancient DNA extraction and library construction protocols to museum wet collection specimens. **Molecular ecology resources**, v. 21, n. 7, p. 2299–2315, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1755-0998.13433>. Acesso em: 15 jun. 2025.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. **Faculdade de Medicina**. Fortaleza: UFC, 201X. Disponível em: <https://www.medicina.ufc.br/nucleo-de-pesquisa-e-desenvolvimento-de-medicamentos/>. Acesso em: 28 jun. 2025.

VALVERDE, L. *et al.* Segments HVS-I and HVS-II of mitochondrial DNA in a population from Santa Catarina (Brazil): Predominance of European lineages. **Forensic science international. Genetics supplement series**, v. 2, n. 1, p. 338–339, 2009. Disponível em: [https://www.fsigeneticssup.com/article/S1875-1768\(09\)00194-2/fulltext](https://www.fsigeneticssup.com/article/S1875-1768(09)00194-2/fulltext). Acesso em: 22 jun. 2025.

VAN OVEN, M.; KAYSER, M. Updated comprehensive phylogenetic tree of global human mitochondrial DNA variation. **Human mutation**, v. 30, n. 2, p. E386-94, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18853457/>. Acesso em: 22 jun. 2025.

VERNESI, C. *et al.* Genetic characterization of the body attributed to the evangelist Luke. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 23, p. 13460–13463, 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11606723/>. Acesso em: 2 jan. 2025.

VESPASIANI, D. M. *et al.* Denisovan introgression has shaped the immune system of present-day Papuans. **PLoS genetics**, v. 18, n. 12, p. e1010470, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9731433/>. Acesso em: 8 fev. 2025.

VILANOVA, S. *et al.* SILEX: a fast and inexpensive high-quality DNA extraction method suitable for multiple sequencing platforms and recalcitrant plant species. **Plant methods**, v. 16, n. 1, p. 110, 2020. Disponível em: <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-020-00652-y>. Acesso em: 24 jun. 2025.

WAGES, J. M., Jr. Polymerase chain reaction. In: **Encyclopedia of Analytical Science**. [s.l.] Elsevier, p. 243–250, 2005. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977004751?via%3Dihub>.

Acesso em: 3 jan. 2025.