



Estudo do ADN antigo de amostras de seis populações do Neolítico final/Calcolítico Português

Cristina Afonso¹; Ana Maria Silva¹; Mercedes Gonzalez-Ruiz²; Cristina Santos²; Assumpció Malgosa²

Introdução

Existem dois modelos explicativos para a origem do Neolítico europeu:

- Modelo de Difusão Dêmica (contribuição genética proveniente do Médio Oriente);
- Modelo de Difusão Cultural (continuidade genética Paleolítica).

A análise de do ADN antigo constitui uma área promissora nos estudos das populações do passado. As informações obtidas, ao incluírem dados sobre relações filogenéticas, relações de parentesco e identificação sexual, permitem estudar eventos migratórios e, deste modo contribuir na análise do processo de transição para o Neolítico, nomeadamente na Península Ibérica.

Objectivos:

Procedeu-se à determinação dos haplogrupos mitocondriais e respectivos haplotipos da amostra em estudo, com o objectivo de:

- Determinação de distâncias populacionais e relações matrilineares;
- Identificação sexual.

Amostra

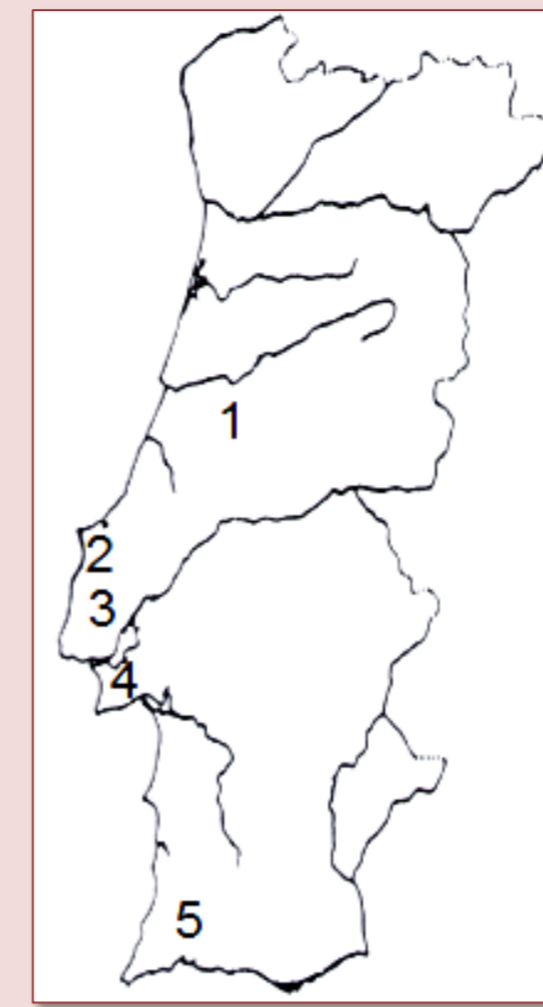


Figura 1: Mapa de Portugal com os locais arqueológicos estudados (1 - DEA, 2 - PMI e PMII, 3 - CM, 4 - SP e 5 - MCI) (adaptado [1]).

- 40 indivíduos do Neolítico final/Calcolítico, de seis monumentos funerários do centro/sul de Portugal continental (Tab. 1; Fig. 1).

Tabela 1: Locais arqueológicos e respectiva datação (UBAR – Laboratório per Radiocarboni de Universidade de Barcelona; Sac – INETI, Lisboa) (adaptado [1-2]).

Estações Arqueológicas	Código	N	Datação (YBP)	Calibração (2 sigmas)	Referência
Gruta Natural da Cova da Moura	CM	5	4715 ± 50 YBP	3636 – 3549 cal AC	UBAR – 593
Dólmen do Ansião	DEA	1	4640 ± 90 YBP	3637 – 3094 cal AC	Sac – 1559
Tholos de Paimogo I	PMI	10	4250 ± 90 YBP	3077 – 3066 cal AC	Sac – 1556
Tholos de Paimogo II	PMII	5	-	-	-
Hipogeu de São Paulo II	SP	6	3969 ± 190 YBP	2905 – 1950 cal AC	UBAR – 629
Hipogeu de Monte Canelas I	MCI	10	4460 ± 110 YBP	3379 – 2881 cal AC	ICEN – 1149

Metodologia

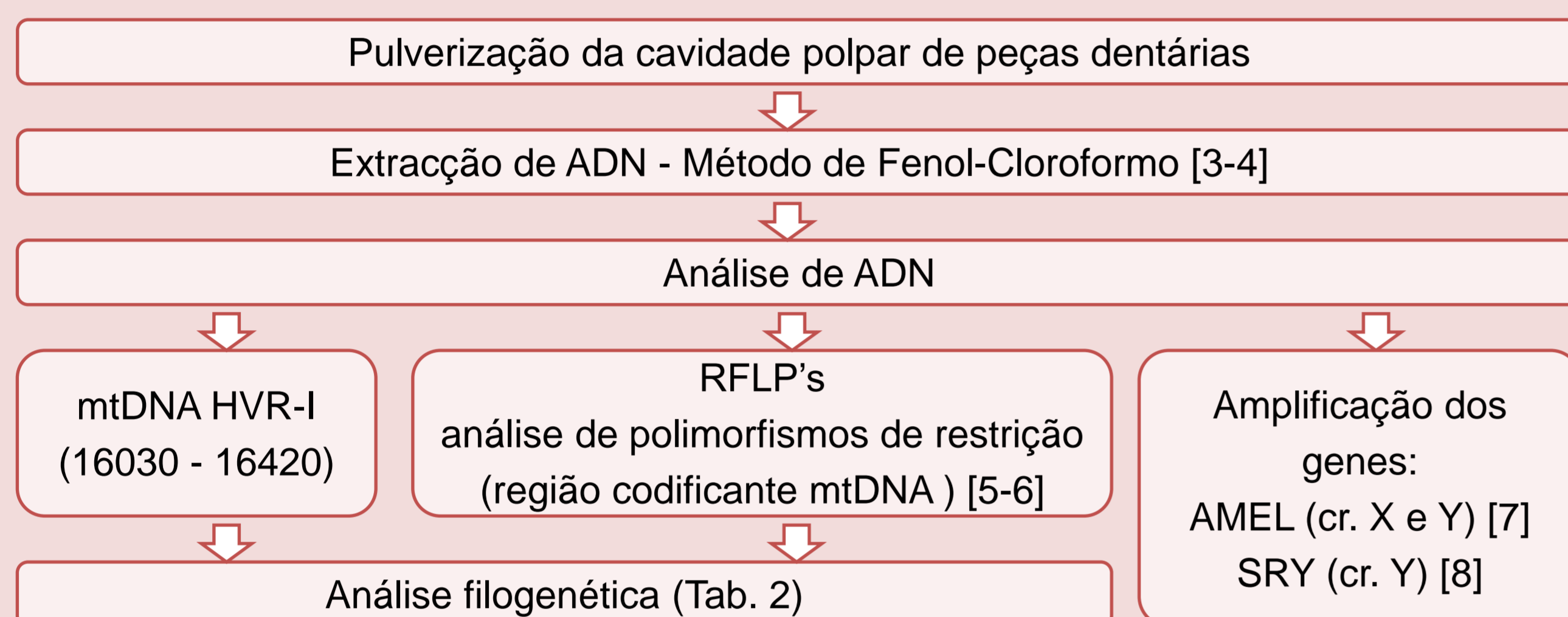


Tabela 2: Populações de referência utilizadas na análise filogenética.

População	Código	N	Referência
Populações antigas			
Paleolítico (Espanha/Italia)	PaleoEI	7	[9-11]
Mesolítico Europa	MesoEu	20	[12]
Mesolítico Marrocos	MesoMar	22	[13]
Neolítico Síria	NeoSir	18	[10,14]
Neolítico Escandinávia	NeoEs	21	[15-16]
Neolítico Espanha	NeoSp	11	[17]
Calcolítico Espanha	CalSp	10	[10,14]
Pre-Romano Espanha	PRSp	17	[18]
Populações modernas			
Portugal (Norte)	NPt	100	
Portugal (Centro)	CPT	82	[19]
Portugal (Sul)	SPT	59	
Portugal	Pt	54	
Espanha	Sp	71	[20]
Populações modernas			
Galiza	Glz	92	[21]
País Basco	PBsc	105	[20,22]
Jordânia	Jrd	6	[23]
Egipto	Egt	67	
Núbia	Nub	80	[24]
Turquia	Trq	74	[25-26]
Israel/Palestina	Plt	117	[27-28]
Iraque	Irq	116	
Irão	In	12	[27]
Síria	Sir	69	
Marrocos (Berberes)	MBer	62	
Marrocos	Mar	39	[23,29]
Mauritânia	Maur	35	

Nota: Todos os resultados são preliminares, faltando a clonagem e replicação independente para a sua validação.

Resultados e Discussão

Preservação do ADN antigo:

- Amplificação positiva foi obtida em 92,5% das amostras;
- Amplificação da região hipervariável (HVR-I) completa foi possível em 72,5% das amostras.

Varição do ADN mitocondrial:

- Determinou-se os haplogrupos mitocondriais em 24 indivíduos (Tab. 3) – 87,5% por PCR-RFLP's, e 12,5% por posições nucleotídicas na HVR-I: 79,17% Hg H, 16,67% Hg U e 4,15% Hg X.

Tabela 3: Resultados do mtDNA, mutações da HVR-I e PCR-RFLP's. Nas amostra identificadas com * foi apenas possível sequenciar uma parte da HVR-I.

Amostra	Sequência HVR-I (16030 - 16401)	Hg mtDNA (RFLP's)	Hg mtDNA (final)
CM 183*	CRS	H	H
CM 187	16189 16223 16278	X	X2b
CM 194	16111 16129	H	H
MCI 176.1	16294 16304	H	H
MCI 206.4*	CRS	H	H
MCI 288.5	16256	H	H
MCI 337*	16356	H	H
MCI 384.11*	16311 16354	-	H
MCI 386.37	16256 16270 16274	-	U5a1*
MCI 435.3	16093	H	H
PM 13622	CRS	U	U
PM 14638	16192 16217 16270A	U	U5b2*
PM 14714	CRS	H	H
PM 15079	16356	U	U4
PM 15986	16270	H	H
PM 17334	16147	-	H
PMII 527	16183C 16189	H	H
PMII 542	16183C 16189	H	H
PMII 556	CRS	H	H
PMII 591	16292G	H	H
SP 5730	CRS	H	H
SP 8001	CRS	H	H
SP 18248	CRS	H	H
SP 18861	CRS	H	H

- Isto sugere uma influência Paleolítica, visto que não se encontraram haplogrupos Neolíticos.

Análise Filogeográfica:

Foi conseguida uma boa separação das amostras pertencentes ao mesmo haplogrupo, e as amostras em estudo posicionam-se correctamente na filogenia (Fig. 2).

A maioria das sequências obtidas não são partilhadas com outras sequências antigas, mas sim com populações actuais da Península Ibérica e Médio Oriente – o que sugere uma continuidade genética.

Há 10 haplotipos não partilhados, que pertencem a haplogrupos Europeus, e diferem de outras amostras europeias por uma ou mais mutações previamente descritas como hotspots mutacionais [30].

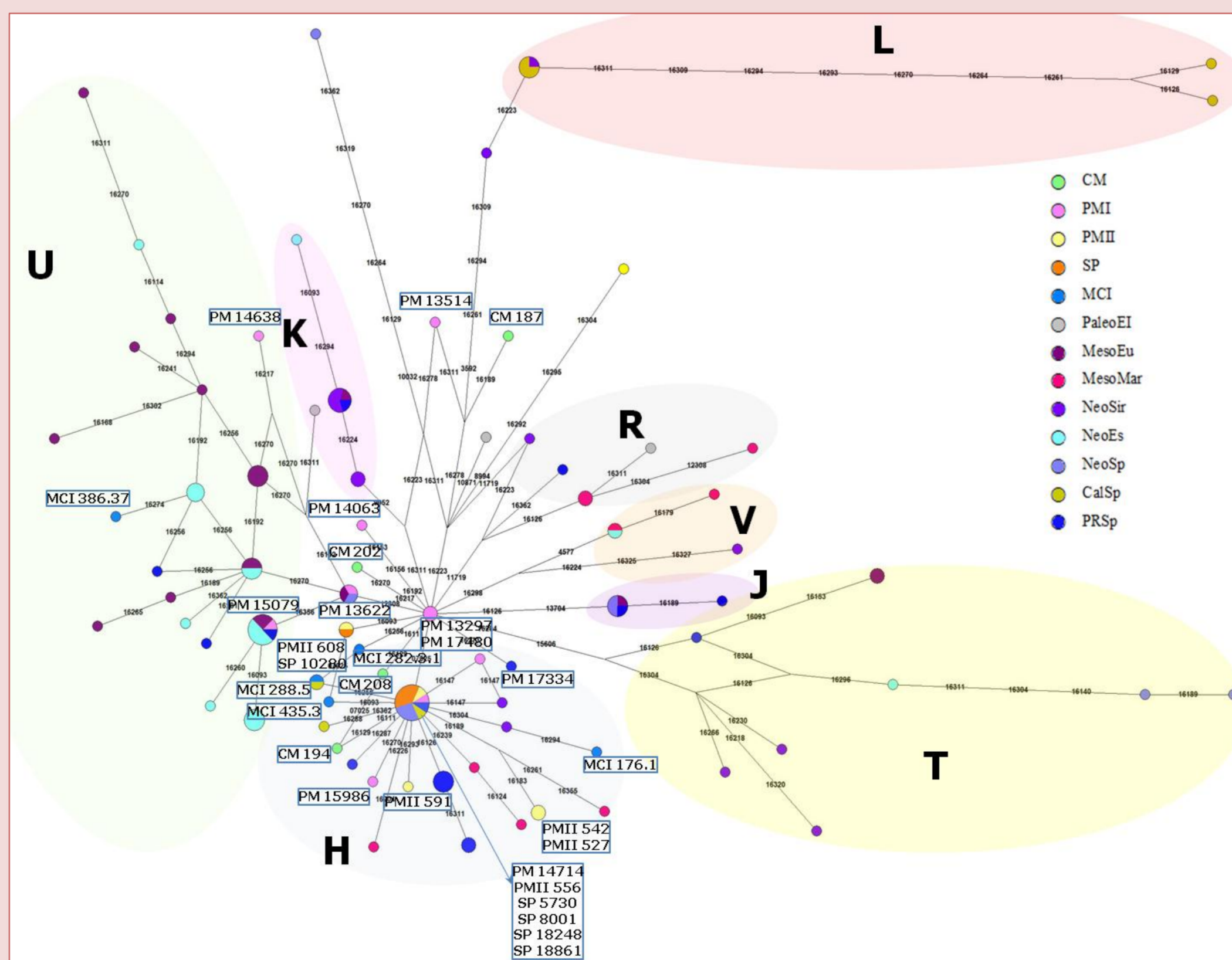


Figura 2: Network calculado a partir de Median Joining das populações antigas em estudo e de referência.

A representação das distâncias genéticas entre as populações usadas (Fig. 3) indica que as amostras estão mais próximas das populações da Península Ibérica, especialmente as do País Basco (PBsc) e Galiza (Glz), devido à elevada proporção do haplogrupo H, típico dessas populações. Quanto às populações antigas, a população estudada (NeoPt) está mais próxima das do Paleolítico de Itália e Espanha (PaleoEI), o que pode indicar uma origem genética Paleolítica das amostras em estudo.

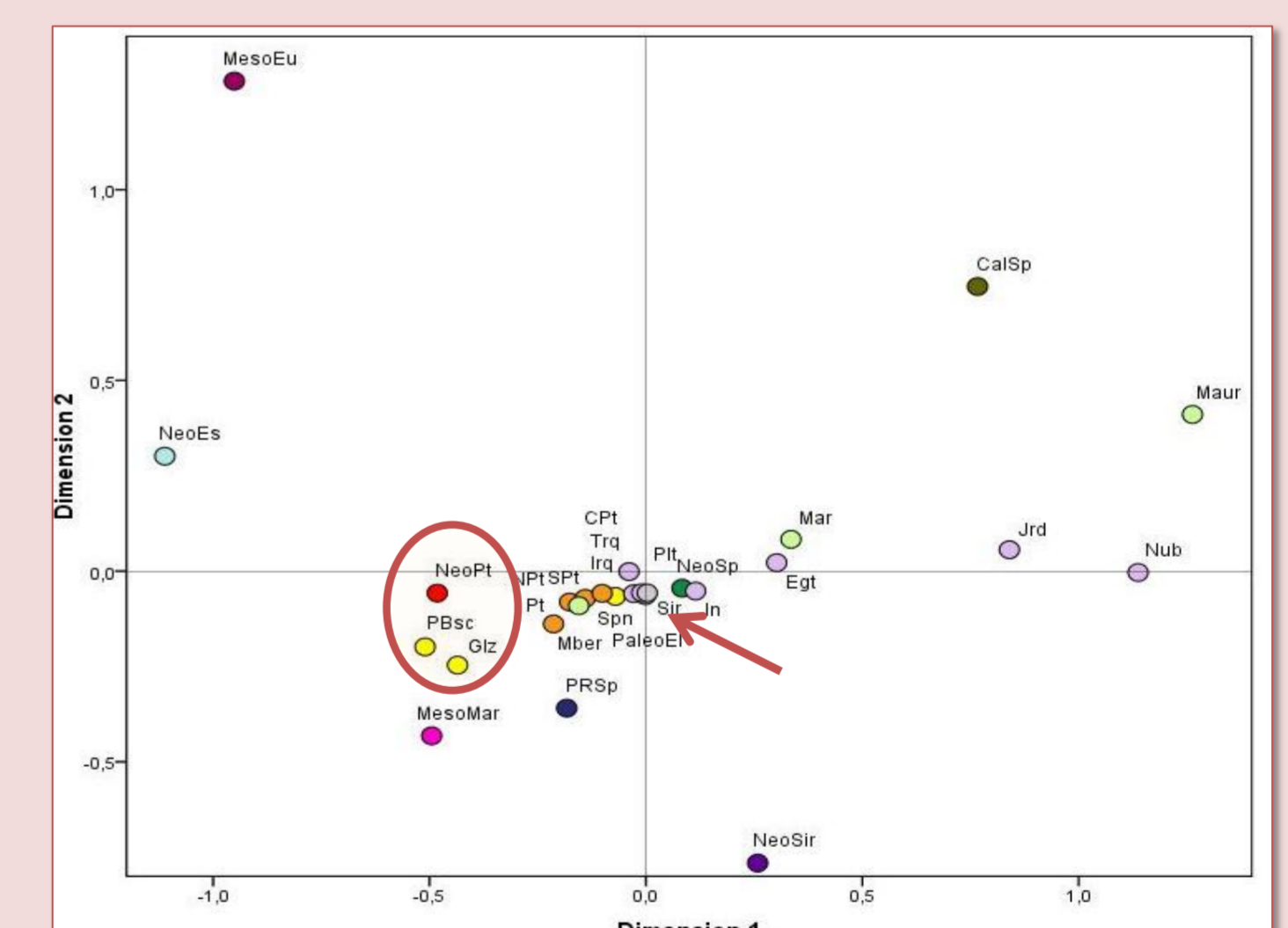


Figura 3: Escalamento multidimensional da matriz de distâncias genéticas.

Parentesco e Determinação sexual:

- Possíveis relações de matrilinearidade:

- CM 194 e CM 208 (16111 e 16129);
- MCI 282.3.1 e MCI 288.5 (16256);
- PMII 527 e PMII 542 (16183C e 16189).

- A determinação sexual foi possível em 16 indivíduos:

- 62,5% do sexo feminino
- 37,5% do sexo masculino.

Considerações finais

- Foi obtida uma boa eficiência de extração (92.5%);
- Os resultados obtidos neste estudo apoiam o Modelo de Difusão Cultural, ou, pelo menos, uma explicação onde o impacto genético Neolítico seja reduzido;
- Maior prevalência do sexo feminino nas séries estudadas o que vai de encontro com os dados obtidos nos estudos antropológicos.

Agradecimentos: Centro de Investigação em Antropologia e Saúde; Museu Municipal de Torres Vedras; Museu Municipal de Almada; CGL 2008-00800 del Ministerio de Educación e Innovación.

Referências

1. A. M. Silva, Universidade de Coimbra (1996).
2. A. M. Silva, Universidade de Coimbra (2002).
3. A. Malgosa et al., *Rec Res Dev Microb* 9, 213 (2005).
4. A. Helgason et al., *PLoS Genet* 5 (2009).
5. A. Torroni et al., *Genetics* 144, 1835 (1996).
6. R. Montiel et al., in *Rec Adv Mol Biol and Evol: Appl Biol Anthropol*, C. Santos, M. Lima, Eds. (2007), pp. 209-249.
7. F. R. Santos et al., *Nat Genet* 18, 103 (1998).
8. T. Shinka et al., *J Hum Genet* 46, 263 (2001).
9. D. Caramelli et al., *PNAS* 100, 6593 (2003).
10. E. Fernández, *Universitat de Barcelona* (2005).
11. D. Caramelli et al., *PLoS One* 3, e2700 (2008).
12. B. Bramanti et al., *Science* 326, 137 (2009).
13. R. Kéfi et al., *Anthropologie* 43, 1 (2005).
14. E. Fernández et al., *For Sci Int: Genet Suppl* 1, 271 (2008).
15. H. Malmström et al., *Curr Biol* 19, 1758 (2009).
16. L. Melchior et al., *PLoS One* 5, (2010).
17. M. L. Sampietro et al., *Proceedings* 274, 2161 (2007).
18. M. L. Sampietro et al., *Ann Hum Genet* 69, 535 (2005).
19. L. Pereira et al., *Ann Hum Genet* 64, 491 (2000).
20. H. B. Corte-Real et al., *Ann Hum Genet* 60, 331 (1996).
21. A. Salas et al., *Euro J Hum Genet* 6, 365 (1998).
22. J. Bertranpetit et al., *Ann Hum Genet* 59, 63 (1995).
23. N. Maca-Meyer et al., *BMC Genet* 2, 13 (2001).
24. M. Krings et al., *Am J Hum Genet* 64, 1166 (1999).
25. F. Calafell, *Ann Hum Genet* 60, 35 (1996).
26. D. Comas, *Mol Biol Evol* 13, 1067 (1996).
27. M. Richards et al., *Am J Hum Genet* 67, 1251 (2000).
28. A. Di Rienzo, A. C. Wilson, *PNAS* 88, 1597 (1991).
29. J. C. Rando et al., *Ann Hum Genet* 62, 531 (1998).
30. B. A. Malyarchuk, I. B. Rogozin, *Ann Hum Genet* 68, 324 (2004).

¹Centro de Investigação em Antropologia e Saúde, Dep. De Ciências da Vida, Universidade de Coimbra, 3000 - Coimbra, Portugal;

²Dep. Biología Animal, Biología Vegetal e Ecología, Unitat d'Antropologia Biológica, Facultat Biociències, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain