

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

*“Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus, 1758) e
Trichuris sp. (Roederer, 1761)”*

por

Daniela Leles de Souza

*Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na
área de Saúde Pública.*

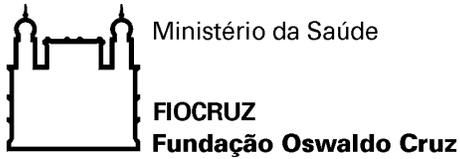
Orientador principal: Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo
Segunda orientadora: Prof^a. Dr^a. Alena Mayo Iñiguez

Rio de Janeiro, julho de 2010.

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Esta tese, intitulada

“Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer, 1761)”

apresentada por

Daniela Leles de Souza

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

Prof. Dr. Marcelo Luiz Carvalho Gonçalves

Prof. Dr. Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro Bastos

Prof. Dr. Luiz Fernando Rocha Ferreira da Silva

Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo – Orientador principal

Tese defendida e aprovada em 26 de julho de 2010.

A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Rio de Janeiro, 26 de julho de 2010.

Daniela Leles de Souza

CG/Fa

Serviço de Gestão Acadêmica - Rua Leopoldo Bulhões, 1.480, Térreo – Manguinhos-RJ – 21041-210
Tel.: (0-XX-21) 2598-2730 ou 08000230085

E-mail: secasp@ensp.fiocruz.br Homepage: <http://www.ensp.fiocruz.br>

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

S729 Souza, Daniela Leles de
Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer, 1761). / Daniela Leles de Souza. Rio de Janeiro : s.n., 2010.
218 f. il., tab., mapas

Orientador: Araújo, Adauto José Gonçalves de
Iñiguez, Alena Mayo

Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010

1. *Ascaris* - parasitologia. 2. *Ascaris* – genética. 3. *Trichuris* - parasitologia. 4. *Trichuris* - genética. 5. Doenças parasitárias - história. 6. Paleopatologia. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.9

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Dr. Adauto Araújo e Dra. Alena Mayo Iñiguez pela amizade, incentivo à pesquisa, pelas incontáveis contribuições durante a realização desta tese e artigos dela resultantes, pessoas sem as quais esta tese não existiria.

À Dra. Ana Carolina Paulo Vicente por ceder os laboratórios para realização dos experimentos e pelas contribuições na pesquisa.

À Koko Otsuki (Rosa) não somente pelo apoio técnico, mas principalmente pelo carinho, pela amizade e por ser no Rio de Janeiro meu laço familiar escolhido.

À equipe do laboratório do Centro de Saúde Germano Sinval Faria ENSP-FIOCRUZ, Ary Carmo, Simone M.S. Lopez e Selma R. Lima, por cooperar com as análises parasitológicas das amostras do Rio de Janeiro.

Aos Dr. Filipe Aníbal Carvalho-Costa e Dr. Márcio Neves Bóia pela viagem proporcionada à cidade de Santa Isabel do Rio Negro no Estado do Amazonas, oportunidade indescritível, e que permitiu discussões enriquecedoras desta tese, sem as quais não poderia ter feito se lá não estivesse estado.

À equipe de pós-graduação em medicina tropical do IOC-FIOCRUZ: Adriano G. Silva, Carlos José C. Moreira, Lauren H. Jaeger, Joanna G. Valverde, Patrícia P. Martins e Viviane F. Meneses, pela coleta e cooperação na análise parasitológica das amostras de Santa Isabel do Rio Negro-AM, e moradores da cidade pela receptividade com nosso grupo de pesquisa.

À Dra. Sheila Mendonça pela oportunidade única na participação da escavação do sítio arqueológico Cubatão-I-SC, Brasil e pelos esclarecimentos sobre o sítio que foram de suma importância para interpretação dos resultados obtidos.

Ao Dr. Ondemar Dias e Jandira Neto pela incrível oportunidade na participação da coleta do material da Igreja da Sé, localizada na Praça XV na cidade do Rio de Janeiro, Brasil; e a Laura da Piedade, arqueóloga responsável pela coleta do material e que nos esclareceu aspectos relevantes para pesquisa do material.

Ao Dr. Jackson Victor de Araújo do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela análise de fungos no solo do sítio arqueológico Cubatão I-SC, Brasil.

A Dra. Maria de Lurdes Rodrigues e Anderson S. Dias pela receptividade e por tão prontamente nos disponibilizarem algumas das amostras suínas usadas neste estudo.

Aos Dr. Alexandre Belo e Dr. Sérgio Miranda Chaves pelas sugestões à época da qualificação do projeto de Doutorado.

Aos colegas dos laboratórios do LGMM e Paleoparasitologia, tanto aos que ainda lá estão quanto aos que já rumaram a novas empreitadas, pela amizade e sugestões nos trabalhos e apresentações resultantes desta tese.

À ENSP e meus professores por contribuir na minha formação acadêmica.

Às Instituições financiadoras dessa pesquisa: CAPES, IOC-FIOCRUZ, ENSP-FIOCRUZ, FAPERJ e CNPq por também me conceder a bolsa de estudos.

Finalmente à minha família e amigos queridos que mesmo não citados nominalmente foram primordiais por sempre me impulsionarem a concretizar meus sonhos.

RESUMO

Ascaris lumbricoides e *Trichuris trichiura* são os helmintos intestinais de maior prevalência na população mundial e também no material arqueológico. Porém, na América do Sul pré-colombiana, o encontro de ovos de *A. lumbricoides* é raro. Recentemente um estudo de diagnóstico paleoparasitológico molecular apontou para um sub-diagnóstico de *Ascaris* sp. na América do Sul. No registro arqueológico de parasitos intestinais predominam achados de ovos de *Trichuris* sp. ao invés de *Ascaris* sp. Isto parece contraditório, em virtude do número de ovos eliminados por cada parasito. Os objetivos desta pesquisa foram: avaliar marcadores moleculares para o diagnóstico de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. em material moderno pela caracterização molecular destes parasitos; caracterizar geneticamente isolados de sítios arqueológicos sul americanos para verificar a real paleodistribuição destes parasitos em uma perspectiva paleoepidemiológica e compará-la com a epidemiologia moderna destas infecções; avaliar os fatores envolvidos na paleodistribuição encontrada. As amostras foram submetidas ao diagnóstico por microscopia óptica, seguida da extração do DNA, PCR e sequenciamento nucleotídico. Na avaliação dos marcadores moleculares, a região *ITS1* de *Ascaris* sp. apresentou variação intra-indivíduo, o que descartou seu uso com fins taxonômicos e diagnósticos. A caracterização molecular dos genes mitocondriais *cox1* e *nad1* de *Ascaris* sp. mostrou infecção cruzada de genótipos entre as espécies humana e suína, o que denota a necessidade de monitoramento das populações avaliadas assim como de outras regiões brasileiras para que a infecção não venha a se tornar uma zoonose em potencial no Brasil. Foi possível o diagnóstico molecular de *Trichuris* sp. pelo gene ribossomal 18S DNA. A análise paleogenética mostrou que há subdiagnóstico para ambas as infecções na América do Sul pré-colombiana. Este é o primeiro diagnóstico paleoparasitológico molecular de *T. trichiura* em material sul americano. Estes são também os primeiros registros de recuperação de DNA de parasitos intestinais em material de sítio arqueológico do tipo “sambaqui” e também do período colonial brasileiro. Comparando-se a paleoepidemiologia molecular de *Ascaris* sp. com a epidemiologia molecular moderna foi possível notar que há haplótipos antigos que ainda estão presentes hoje, no entanto a maioria dos haplótipos é característica ao material arqueológico. Observou-se que há haplótipos comuns ao Velho e Novo Mundo, contudo, há também especificidades regionais. Os resultados da análise genética claramente apontam para uma pobre preservação dos ovos no material arqueológico, principalmente de *Ascaris* sp. Os fatores principais envolvidos nessa paleodistribuição, seriam fatores tafonômicos que proporcionaram a quebra maior de ovos de *Ascaris* sp. do que de *Trichuris* sp., e evidências de consumo de plantas vermífugas pelos povos pré-históricos, as quais teriam maior ação sobre *Ascaris* sp. do que *Trichuris* sp.

Palavras-chaves: paleoparasitologia, paleoepidemiologia, coprólitos, ascaríase, trichuríase, DNA antigo, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

Ascaris lumbricoides and *Trichuris trichiura* are the intestinal helminths with higher prevalence in the world today as it was in the past. However, in pre-Columbian South America the findings of *A. lumbricoides* eggs are rare. Recently a study of paleoparasitological molecular diagnosis showed a sub-diagnosis of *Ascaris* sp. in South America. In the archeological material, eggs of *Trichuris* sp. are more common compared with *Ascaris* sp. eggs. This is contradictory taking into account the number of eggs eliminated by each parasite. The aims of this research was: to evaluate molecular markers for *Ascaris* sp. and *Trichuris* sp. diagnosis in modern material; genetic characterization of the samples South American archeological sites aiming the paleodistribution of these parasites in a paleoepidemiological perspective; compare results with the modern epidemiology of these infections; evaluate the factors involved in paleodistribution. Extraction of DNA, PCR and nucleotide sequencing were performed after microscopy. In the evaluation of the molecular markers *Ascaris* sp. *ITS1* region showed intra-individual variation. Therefore, this region to taxonomical and diagnoses studies was discarded. With the molecular characterization of *Ascaris* sp. *cox1* and *nad1* mitochondrial genes it was possible to identify cross infection of genotypes between human and pig hosts. Results showed that surveillance field works in modern populations are necessary to verify the zoonotic potential of this infection in Brazil. The molecular diagnosis of *Trichuris* sp. by ribosomal 18S DNA gene was possible. The paleogenetic analysis showed that there is subdiagnosis for both infections in pre-Columbian South America. This is the first paleoparasitological molecular record of *T. trichiura* in South American samples. These are also the first recovery of DNA of intestinal parasites in "sambaqui" archeological site, and also of the Brazilian colonial period. Molecular paleoepidemiology of *Ascaris* sp. infection compared with modern molecular epidemiology showed that there are ancient haplotypes still present today. However, most of the haplotypes are characteristic of the archaeological material. It was observed that there are common haplotypes both to the Old World and to the New World, but showing regional specificities. The results of the genetic analysis clearly pointed to a poor preservation of eggs in archeological material, mainly of *Ascaris* sp. Taphonomy may be the main factor involved in paleodistribution, breaking more eggs of *Ascaris* sp. than *Trichuris* sp. Evidences of consumption of vermifuge plants by prehistoric groups should also have influence, as some plants should have more efficacy eliminating *Ascaris* sp. than *Trichuris* sp.

Key-words: paleoparasitology, paleoepidemiology, coprolites, ascariasis, trichuriasis, ancient DNA, molecular diagnosis.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

	páginas
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Parasitos intestinais transmitidos pelo solo	11
1.1.1 <i>Ascaris</i> sp.....	12
1.1.2 <i>Trichuris</i> sp.....	17
1.1.3 Associação <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.....	21
1.2 Diagnóstico parasitológico tradicional e suas limitações.....	21
1.3 Diagnóstico molecular de helmintos	22
1.3.1 Epidemiologia molecular de <i>Ascaris</i> sp.	23
1.3.2 Epidemiologia molecular de <i>Trichuris</i> sp.	27
1.4 Paleoparasitologia	27
1.4.1 Paleodistribuição de <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp. por microscopia óptica.	32
1.4.2 Paleodistribuição de <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp. por diagnóstico molecular	37
2. OBJETIVOS	41
2.1 Objetivo geral	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Avaliando a variabilidade intra-indivíduo de <i>Ascaris</i> sp.	42
3.1.1 Amostras fecais atuais	42
3.1.2 Metodologia	42
3.2 Caracterização dos genes mitocondriais <i>cox1</i> e <i>nad1</i> de <i>Ascaris</i> sp. do Brasil.....	44
3.2.1 Amostras atuais	44
3.2.2 Metodologia	45
3.3 Diagnóstico molecular de <i>Trichuris</i> sp. em amostras modernas.	48
3.4 Diagnóstico molecular de <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp. em material arqueológico.....	49
3.4.1 Amostras.....	50
3.4.2 Metodologia	52
3.5 Avaliando o paradoxo <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp. no material arqueológico	58
4 RESULTADOS	59
4.1 Avaliando a variabilidade intra-indivíduo de <i>Ascaris</i> sp.	59
4.2 Caracterização dos genes mitocondriais <i>cox1</i> e <i>nad1</i> de <i>Ascaris</i> sp. do Brasil.....	62
4.3 Diagnóstico molecular de <i>Trichuris</i> sp.	73
4.4 Diagnóstico molecular de <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp. em material arqueológico.....	75
4.5 Avaliando o paradoxo <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp. no material arqueológico	94

5 DISCUSSÃO	103
5.1 Detectada variabilidade intra-indivíduo na região <i>ITS1</i> de <i>Ascaris</i> sp. do Brasil	103
5.2 A caracterização genética dos genes mitocondriais <i>cox1</i> e <i>nad1</i> de <i>Ascaris</i> sp. isolados de humanos e suínos do Brasil mostrou haplótipos comuns a ambos hospedeiros.....	107
5.3 Diagnóstico molecular de <i>Trichuris</i> sp.	111
5.4 Paleoepidemiologia molecular de <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	112
5.5 Mudanças epidemiológicas nas infecções por <i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.: uma história evolutiva contada pelos achados arqueológicos	123
6 CONCLUSÕES	138
7 ASPECTOS ÉTICOS	142
8 REFERÊNCIAS	143
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Parasitos intestinais transmitidos pelo solo

Também conhecidos como geohelminhos, são os parasitos intestinais que têm seu ciclo de transmissão diretamente ligado a uma passagem obrigatória pelo solo em condições ideais de temperatura (20°C a 30°C) para manutenção de seu ciclo de vida e conseqüentemente infectarem um determinado hospedeiro. Os principais geohelminhos que infectam a espécie humana são os nematóides intestinais *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis* e os ancilostomídeos *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*. Estima-se que aproximadamente 1,2 bilhões de pessoas estejam infectadas por *A. lumbricoides* em todo mundo, 70 milhões por *S. stercoralis* e 800 e 700 milhões por *T. trichiura* e ancilostomídeos, respectivamente (Crompton 1999, Keiser e Utzinger 2008). Embora estes parasitos tenham preferência por locais mais quentes e úmidos, ou seja, as regiões tropicais e subtropicais, atualmente, devido à rápida dispersão do homem pelos mais diversos ambientes se pode dizer que tais parasitos têm uma distribuição cosmopolita, encontrando-se dispersos em praticamente todas as partes do globo terrestre. A intensidade da infecção é um fator chave na sintomatologia e gravidade da doença causada por estes parasitos, quando estabelecida. Sendo assim, a maior parte da população é portadora assintomática da infecção. No entanto, nos chamados grupos de risco como, por exemplo, crianças, principalmente em condições sócio-econômicas desfavorecidas, altas cargas parasitárias podem se instalar e os fatores desencadeadores de doença aparecer (Rey 2008). Até recentemente, modelos de projeção do quadro das doenças no mundo previam que a maioria dos países, incluindo os de economia periférica, teria passado ou estaria na chamada fase de “transição epidemiológica” onde

principalmente as doenças crônico-degenerativas advindas do envelhecimento da população e mudanças comportamentais substituiriam as doenças infecciosas, tais como as causadas por geohelminhos. No entanto, as altas prevalências destas infecções, juntamente com uma visão de complexidade, mostram que embora a transição epidemiológica seja uma realidade, as doenças infecciosas permanecem com altas prevalências na população. A visão de complexidade tenta explicar a emergência e reemergência das infecções transmissíveis outrora controladas, levando em consideração o aumento da pauperização, ondas migratórias, mudanças demográficas, comportamento social, exploração de novos nichos, transporte e domiciliação de animais selvagens, mudanças climáticas, degradação ambiental e perda de biodiversidade, viagens internacionais, ecoturismo, mudanças na agricultura, novas tecnologias médicas, sem deixar de mencionar os fatores intrínsecos ao parasitismo (Sabroza et al. 1992, Sabroza e Walter-Towers 2001, Daszak et al. 2001, Ellis e Wilcox 2009). Como as infecções causadas por geohelminhos têm ciclo de transmissão fecal-oral, condições de saneamento básico e higiene pessoal são essenciais para o controle destas infecções, assim como a maioria dos fatores acima mencionados. Portanto, a manutenção destas infecções em níveis tão elevados tem sido favorecida principalmente nos países em desenvolvimento onde principalmente a falta de saneamento básico, aumento populacional, pauperização e desigualdades sociais são condições permanentes (Simões 2002).

1.1.2 *Ascaris* sp.

O parasito

Ascaris lumbricoides (Linnaeus 1758) é um parasito intestinal do filo Nematelminthes, classe Nematoda, superfamília Ascaridoidea, família Ascarididae,

característico da espécie humana e de alguns outros primatas do gênero *Pan* sp., *Gorilla* sp., *Hilobates* sp., *Macaca* sp., *Papio* sp. e *Colobus* sp., *Alouatta* sp. (Stuart et al. 1990, Mutani et al. 2003, Hope et al. 2004, Jones-Engel et al. 2004, Gillespie et al. 2005, Eckert et al. 2006, Lim et al. 2008, Rey 2008, Teichoreb et al. 2009). *Toxocara canis* é outro parasito de importância para infecção humana que também se encontra nesta família. Dentre os parasitos intestinais *A. lumbricoides* é o de maior prevalência na população mundial, infectando bilhões de pessoas em todo mundo (O’Lorcain e Holland 2000).

Por este parasito se encontrar também em primatas não humanos, é possível considerar que este tenha sido adquirido filogeneticamente pela espécie humana, ou em outras palavras, um ancestral comum aos primatas não humanos e humanos o transferiu para espécie humana nos primórdios da relação destas espécies (Confalonieri 1988). No entanto, esta ainda é apenas uma hipótese, pois ainda não está esclarecido o papel do hospedeiro suíno na origem da infecção humana a época da domesticação do porco (*Sus scrofa scrofa* e/ou *Sus domestica*), uma vez que *Ascaris* spp. de origem humana e suína são muito semelhantes. Sendo assim, supõe-se que o *Ascaris* sp. existente em suínos possa ter passado para espécie humana ou esta possa ter transferido o parasito para os suínos na época da domesticação do porco, a qual ocorreu aproximadamente 10.000 anos (Loreille e Bouchet 2003).

Breves dados sobre a morfologia dos vermes adultos e ovos

Ascaris sp. são vermes longos, cilíndricos e com extremidades afiladas. As fêmeas são maiores que os machos medindo de 200 a 350 mm de comprimento e de 3 a 6 mm de circunferência, tendo a parte posterior retilínea ou ligeiramente encurvada. Os machos medem de 150 a 300 mm de comprimento e 2 a 4 mm de circunferência, tendo a extremidade caudal encurvada (O’Lorcain e Holland 2000, Rey 2008). Esse tamanho pode variar de acordo com o número de parasitos que o hospedeiro alberga; quanto mais

parasitos, menores são em tamanho (Rey 2008). Ovos férteis medem entre 60 e 70 μm de comprimento por 40 e 50 μm de largura, possuindo uma casca externa mamilonada muito resistente a condições adversas, porém alguns ovos se apresentam descorticados (sem a casca externa), mas ainda assim identificáveis. (O’Lorcain e Holland 2000, Quilès et al. 2006).

Ciclo biológico

A infecção é contraída via fecal/oral, pela ingestão de ovos férteis eliminados com as fezes. A formação da larva se dá no meio externo e as condições ótimas de temperatura para sua formação são de 20 a 30°C, após mais uma semana há a primeira muda e as larvas se tornam infectantes. Após a ingestão desses ovos há eclosão das larvas de segundo estágio que irão ganhar a mucosa intestinal e penetrar na circulação sanguínea ou linfática aonde chegarão ao coração e serão levadas ao pulmão, onde sofrerão a segunda muda. As larvas, agora de terceiro estágio e com sexo já reconhecível, ganham os alvéolos pulmonares e realizam a terceira muda. As larvas de quarto estágio chegam aos bronquíolos onde são arrastadas juntamente com o muco pelos movimentos ciliares da mucosa, então sobem pela traquéia e laringe para serem deglutidas com as secreções brônquicas e alcançarem o estômago e intestino. No intestino as larvas sofrem a quarta e última muda que as transformam em adultos jovens. Ao final de dois meses e meio as fêmeas começam a ovipor (Figura 1) (Rey 2008).

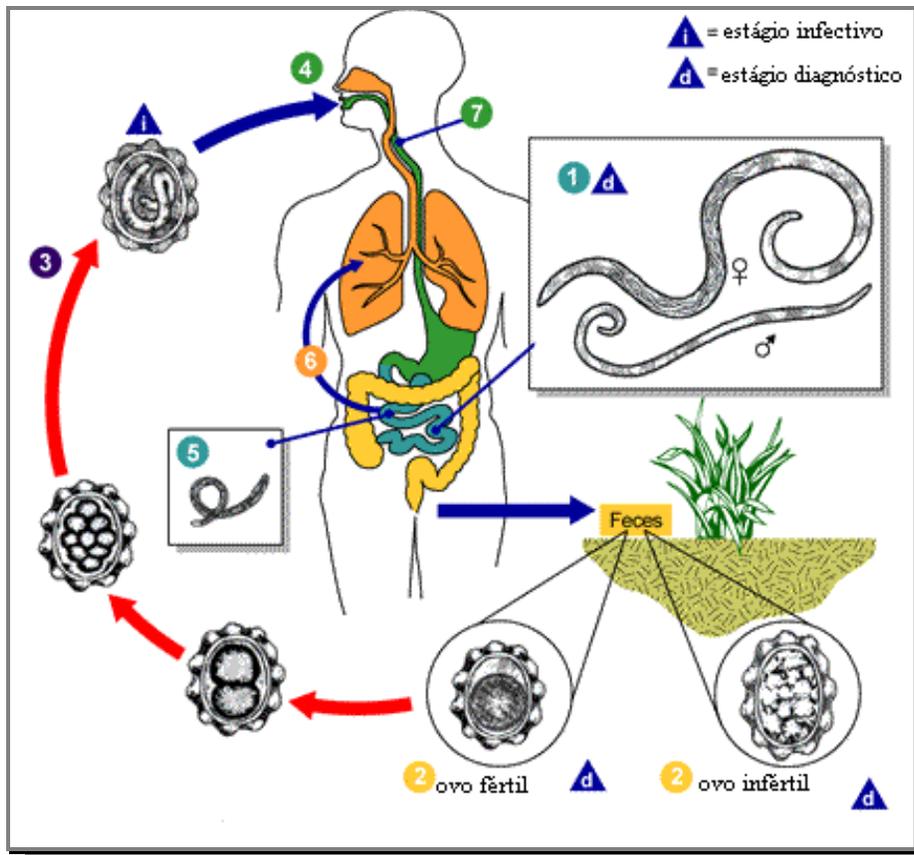


Figura 1: Esquema do ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*.

Legenda: ① Vermes adultos. Oviposição pelas fêmeas e passagem dos ovos para as fezes. ② Ovos inférteis também podem ser ingeridos, mas não são infectantes. Ovos férteis embrionados tornam-se infectantes após algumas semanas. ③ Dependendo de condições ambientais ótimas os ovos larvados podem ser ingeridos. ④ Eclosão das larvas. ⑤ Invasão da mucosa intestinal, e carreamento das larvas pelo sistema porta, as quais ganham à circulação e chegam aos pulmões. ⑥ Maturação das larvas nos pulmões, penetração das cavidades alveolares, chegada aos brônquios. ⑦ Ascensão pela traquéia e laringe, e deglutição. Ao ganharem o intestino se desenvolvem em vermes adultos. De 2 a 3 meses são requeridos entre a ingestão dos ovos infectantes e a oviposição pelas fêmeas adultas. Vermes adultos podem viver entre 1 e 2 anos.

Fonte: modificado de CDC. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Distribuição geográfica

A. lumbricoides é um parasito de distribuição cosmopolita, ocorrendo principalmente em países de ambiente temperado e tropical. Altas prevalências de *Ascaris* sp. estão relacionadas principalmente a condições de subdesenvolvimento e falta de saneamento básico e/ou fatores ligados ao tipo de agricultura. Estima-se que 73% das

infecções por *A. lumbricoides* estejam na Ásia, 12% na África e 8% na América Latina (O’Lorcain e Holland 2000).

Patologia

Na maioria das vezes a ascaríase é assintomática, não trazendo maiores complicações. A ação patogênica pode ser desenvolvida durante a migração das larvas, podendo ocorrer hemorragias, pneumonia difusa ou lobar e crises de asma (Rey 2008). Casos mais graves estão relacionados a localizações ectópicas das larvas podendo atingir o sistema nervoso. Já no intestino os sintomas mais comuns são dores abdominais, náuseas, perda de apetite, emagrecimento, irritabilidade; quadros de obstrução intestinal podem ocorrer quando altas cargas parasitárias estão presentes (O’Lorcain e Holland 2000). Porém, esses casos mais graves são muito raros e acometem na maioria das vezes crianças que se apresentam mal nutridas e com outros problemas associados (Rey 2008).

Tratamento

A maioria dos antihelmínticos é eficaz contra esse parasito, tais como pirantel, mebendazol, levamisol e piperazina (Rey 2008). No entanto, a diminuição da prevalência, não só de *A. lumbricoides* como de outros parasitos intestinais, está mais estreitamente associada às melhorias no saneamento básico que vêm ocorrendo ao longo dos anos. Este fato tem permitido a não aquisição de verminoses ou mesmo que os indivíduos não venham a se reinfectar (Simões 2002).

Importância para saúde coletiva

Estima-se que *A. lumbricoides* infecte 1/4 da população mundial (Crompton 1999). Em suínos encontra-se a espécie *Ascaris suum* (Goeze 1782), muito semelhante morfológica e molecularmente a *A. lumbricoides*. Ainda hoje se discute se estas espécies são realmente diferentes (Anderson 2001). Regiões endêmicas que usam como fertilizantes fezes de suínos tais como a China, têm apontado interesse em entender

principalmente a epidemiologia molecular da infecção, pois infecções cruzadas entre as espécies de *Ascaris* sp. humanos e suínos têm sido registradas, o que pode representar um problema para os programas de controle da ascariase (O’Lorcain e Holland 2000, Peng et al. 2003, 2005, 2007). Uma vez que a resistência a anti-helmínticos nas espécies animais vem aumentando progressivamente, há a preocupação da aquisição de isolados resistentes à medicação pela população humana e conseqüentemente o potencial do surgimento de uma zoonose nestas regiões (Anderson 2001, Coles et al. 2006).

E, não obstante, os conhecidos fatores comuns à maioria das outras helmintíases, os quais em sua maioria seriam evitáveis com medidas preventivas de baixo custo, continuam a sobrecarregar os sistemas de saúde, acarretando gastos maiores, pois por muitas vezes os pacientes já se encontram em um estágio agravado da doença. Além de sintomas não tão evidentes fisicamente, mas que afetam, por exemplo, o rendimento escolar de crianças e nos adultos o desempenho no trabalho (O’Lorcain e Holland 2000).

1.1.3 *Trichuris* sp.

O parasito

O gênero *Trichuris* sp. (Roederer 1761), Filo Nematelminthes, Classe Nematoda, Superfamília Trichuroidea, compreende mais de 70 espécies, as quais já foram encontradas em diversos grupos de mamíferos: marsupiais, artiodátila, carnívoros, roedores, insetívoros e primatas. *T. trichiura* é um nematóide intestinal da família Trichocephalidae e infecta principalmente a espécie humana e outros grandes primatas (Gotoh 2000, Gotoh et al. 2001, Hahn et al. 2003, Gillespie et al. 2004, Legesse e Erko 2004, Kalema-Zikusoka et al. 2005, Chapman et al. 2005, Weyher et al. 2006, Levecke et al. 2007, Reichard et al. 2007, Gillespie e Chapinan 2008, Córdon et al. 2008, Rey 2008). *Trichuris suis* é um parasito

intestinal encontrado em suínos, semelhante ao *T. trichiura*, mas não tão semelhantes entre si quanto o são *A. lumbricoides* e *A. suum*. Sendo assim, considera-se que este parasito tenha sido adquirido pela espécie humana pelo contato com primatas não humanos, ou seja, filogeneticamente adquirido (Confalonieri 1988). *T. trichiura* também está entre os parasitos intestinais de maior prevalência na população mundial (Rey 2008).

Breves dados sobre a morfologia dos vermes adultos e ovos

Os vermes adultos medem de 3 a 5 cm de comprimento, os machos são um pouco menores que as fêmeas e a parte posterior do macho é enrolada em espiral. A parte anterior é mais delgada e longa que a caudal, aparentando um chicote. Na parte anterior está a boca, que é provida de um estilete e esôfago, e na posterior intestino e órgãos reprodutores. O tamanho dos ovos varia entre 50 e 55µm de comprimento por 22 a 23µm de largura. O ovo tem um aspecto bem característico no formato de um barril, composto por três cascas interrompidas e “vedadas” por dois plugs em cada extremidade. Por vezes os ovos se apresentam com somente um ou nenhum dos plugs, mas este fato não impede o diagnóstico (Rey 2008).

Ciclo biológico

Quando os ovos ganham o solo, em condições ideais de temperatura, que variam entre o mínimo de 10°C a um ótimo de temperatura em torno de 35°C, há a formação das larvas e estas após determinado tempo passam a ser infectantes para o homem. Após ingestão destes ovos há eclosão e liberação das larvas na luz do intestino. As larvas penetram o ceco, onde ficam por algum tempo. Após completado o desenvolvimento, os vermes adultos se fixam à mucosa. Completado o ciclo, os ovos aparecem nas fezes e estão prontos para ganharem o solo e darem início a um novo ciclo (Figura 2) (Stephenson et al. 2000, Rey 2008).

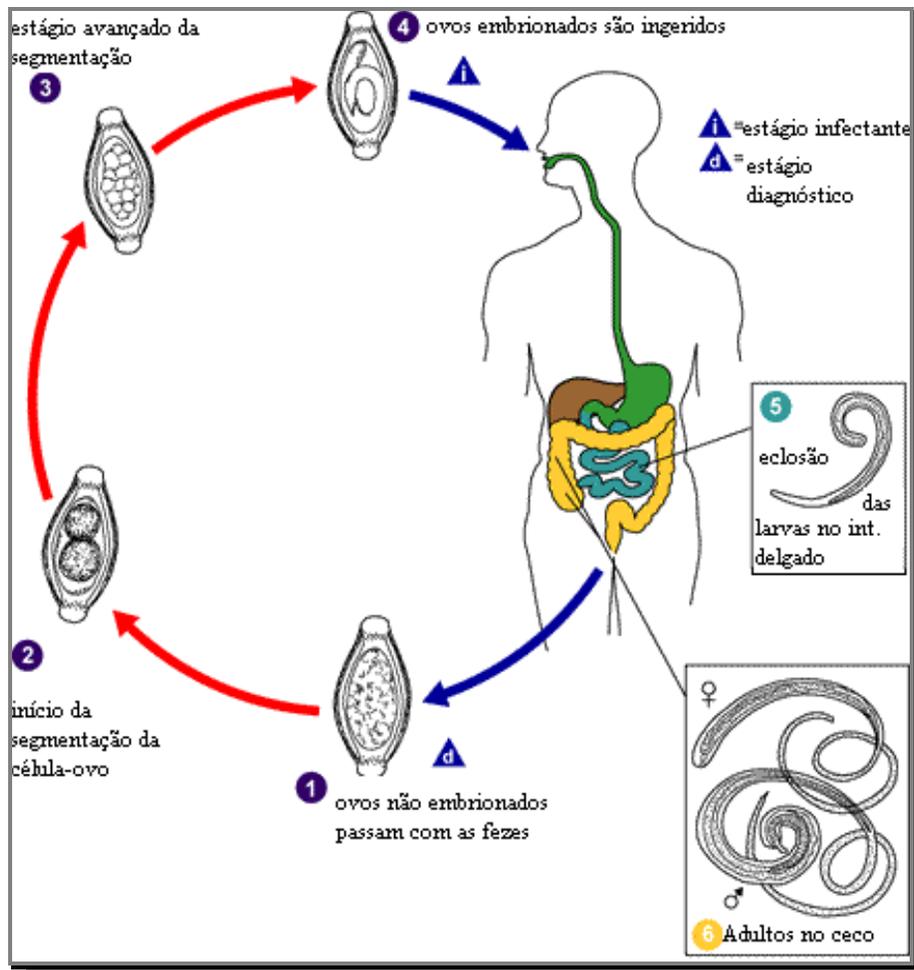


Figura 2: Esquema do ciclo biológico de *Trichuris trichiura*.

Legenda: ❶ Ovos contidos nas fezes ganham o solo. ❷ Os ovos se desenvolvem no solo. ❸ Embrionamento do ovo. ❹ Ovos se tornam infectantes. Depois da ingestão, os ovos passam ao intestino delgado, onde há eclosão das larvas. ❺ Maturação e estabelecimento das larvas assim como dos adultos no intestino. ❻ Os vermes adultos vivem no ceco e ascendem ao cólon intestinal aonde se fixam com a porção anterior na mucosa. A fêmea inicia a oviposição em 60 a 70 dias após a infecção que pode chegar a 20.000 ovos por dia. Vermes adultos podem viver aproximadamente um ano.

Fonte: modificado de CDC. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>

Distribuição geográfica

Devido à similaridade de hábitat fora do hospedeiro com o parasito *Ascaris* sp. pode-se dizer que a distribuição de *T. trichiura* segue o mesmo padrão daquele. As maiores prevalências para população infantil são encontradas principalmente na China, Índia e

outros países asiáticos; América Latina; Caribe e Oriente Médio (Stephenson et al. 2000).

Patologia

A maioria dos pacientes é assintomática. Os casos mais graves estão principalmente ligados à carga parasitária, que irá depender de condições como a imunidade do indivíduo, questões de ordem nutricional, dentre outras. Em infecções consideradas intensas uma fêmea pode eliminar até 20.000 ovos. Geralmente a população parasitária dentro do hospedeiro não passa de dez indivíduos, mas há registros de até 1.000 vermes. Mesmos em casos sintomáticos, geralmente o quadro não passa de dores abdominais e diarreias. Porém há registros de casos de prolapso retal, e por este parasito viver aderido ao intestino condições de anemia podem ser potencializadas (Stephenson et al. 2000, Rey 2008).

Tratamento

Geralmente os anti-helmintícos mebendazol e pamoato de oxantel têm sido usados no combate a esta helmintíase (Rey 2008). Porém, há estudos que mostram que em doses únicas mebendazol, pamoato de oxantel e albendazol não são eficientes no combate a esta parasitose quando comparada à infecção causada por *A. lumbricoides* e ancilostomídeos (Keiser e Utzinger 2008).

Importância para saúde coletiva

Exceto pelos fatores inerentes ao potencial zoonótico da infecção por *A. suum*, ainda não observado para *T. suis*, pode-se dizer que a trichuríase determina os mesmos problemas causados por qualquer helmintíase, com o agravante de ser mais resistente à medicação.

1.1.4 Associação *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp.

A. lumbricoides e *T. trichiura* são uma das associações parasitárias mais encontradas em todo o mundo. Isto provavelmente se deve pelo mecanismo de transmissão e metabolismo semelhantes, ocupação de nichos muito próximos fora do hospedeiro, grande quantidade de ovos eliminados, resistência de seus ovos, ou, ainda, pela estratégia evolutiva adotada por cada um desses parasitos. No entanto, são fatores primordiais na manutenção da alta prevalência desta associação assim como sua dispersão pelo mundo, a alta densidade demográfica, principalmente nos países em desenvolvimento aonde as condições de saneamento básico são precárias e as condições ambientais adequadas ao ciclo evolutivo do parasito (Rey 2008, Stephenson et al. 2000, O’Lorcain e Holland 2000).

1.2 Diagnóstico parasitológico tradicional e suas limitações.

Tradicionalmente o diagnóstico parasitológico para *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. é feito pela microscopia óptica, pelo encontro de ovos dos parasitos no exame direto das fezes. No entanto, para o diagnóstico de *Ascaris* sp. existem limites no nível de espécie. Como mencionado anteriormente, *A. lumbricoides* (parasito de humanos) e *A. suum* (parasito de suínos) são muito semelhantes. A distinção entre estas duas espécies é ainda controversa. Ocorre que os ovos de *A. suum* e *A. lumbricoides* são indistinguíveis morfológicamente. Ainda se discute se estas espécies podem se tratar de uma única espécie, e por estas limitações o diagnóstico molecular tem sido proposto (Anderson 2001, Peng et al. 2007).

1.3 Diagnóstico molecular de helmintos.

Com o surgimento das ferramentas de diagnóstico molecular veio também o interesse em se aplicar estas técnicas ao estudo dos parasitos intestinais. As técnicas moleculares passaram então a ser aplicadas principalmente no sentido de distinguir espécies crípticas e/ou muito intimamente relacionadas. Estudos filogenéticos têm sido usados para averiguar a origem, dispersão e relações entre determinados grupos de parasitos. No entanto, no universo dos parasitos intestinais, ainda é pequeno o número de genes e de genomas completos de helmintos disponíveis (Lukes et al. 2005). O estudo de genomas pode proporcionar um conhecimento profundo de parasitos patogênicos, assim como dos mecanismos de resistência do parasito e/ou de interação com o hospedeiro que facilitem o parasitismo, e assim contribuir para o desenvolvimento de medicamentos e/ou outras ações que sejam mais eficazes no combate a estes helmintos. Hoje as abordagens de “transcriptoma” e “proteômica” são essenciais ao entendimento destes mecanismos. Contudo, segundo uma atualização da revisão feita por Lukes et al. (2005) observa-se que dois dos helmintos intestinais de maior prevalência na população mundial, *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, dentre muitos outros, ainda não contam com informações genética de seu genoma mitocondrial completo disponíveis ou em andamento nos bancos internacionais de sequências (Tabela 1).

Tabela 1: Helmintos parasitos humanos de importância na área da saúde coletiva e a representatividade dos seus genomas mitocondriais completos depositados no GenBank.

Helmintos	Genomas mitocondriais completos	
	2005	Janeiro de 2010
Vermes filiformes		
<i>Taenia saginata</i>	Não	Sim
<i>Hymenolepis nana</i>	Não	Não
<i>Taenia solium</i>	Sim	Sim
<i>Diphyllobothrium latum</i>	Não	Sim
<i>Echinococcus</i> sp.	Sim	Sim
Vermes cilíndricos		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Não	Não
Ancilostomídeos	Sim	Sim
<i>Trichuris trichiura</i>	Não	Não
<i>Enterobius vermicularis</i>	Não	Sim
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Não	Não
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Sim	Sim
<i>Onchocerca volvulus</i>	Sim	Sim
<i>Brugia malayi</i>	Sim	Sim
<i>Loa loa</i>	Não	Não
<i>Trichinella</i> sp.	Sim	Sim
<i>Dracunculus medinensis</i>	Não	Não
<i>Trichostrongylus orientalis</i>	Não	Não
Trematoda		
<i>Schistosoma</i> sp.	Sim	Sim
<i>Paragonimus westermani</i>	Sim	Sim
<i>Opisthorchis</i> sp.	Não	Sim
<i>Clonorchis sinensis</i>	Não	Sim
<i>Fasciola hepatica</i>	Sim	Sim
<i>Fasciolopsis buski</i>	Não	Não
Total 23 (100%)	10 (43,4%)	15 (65,2%)

Fonte: modificado de Lukes et al. 2005.

1.3.1 Epidemiologia molecular de *Ascaris* sp.

Embora mais de 100 milhões de pessoas estejam infectadas por *A. lumbricoides* na América Latina, a maioria dos estudos moleculares para *Ascaris* sp. foram conduzidos na China, país com os maiores índices de prevalência para a parasitose tanto em humanos quanto suínos (O’Lorcain e Holland 2000, Anderson 2001, Peng et al. 2007). Este crescente interesse em estudos de epidemiologia molecular de *Ascaris* sp., deve-se também

a relatos de infecção cruzada na América do Norte e Dinamarca (Anderson 2001, Nejsun et al. 2005). Quando a espécie humana adquire um parasito de espécies animais selvagens e/ou domésticas e estabelece infecção, configura-se um quadro zoonótico (Rey 2008). Em especial nas espécies animais, devido principalmente a alta frequência e doses de anti-helmínticos empregadas, a resistência a estes medicamentos tem aumentado (Larsen 1999, Mota et al 2003). Com isto, pesquisadores têm aventado o potencial zoonótico da ascariase e a possível aquisição de isolados resistentes a anti-hemínticos pela população humana, o que traria grandes implicações para os programas de controle da ascariase (Anderson 2001, Criscione et al. 2007b, Scott 2008).

Estudos envolvendo a epidemiologia molecular de *Ascaris* sp. com o objetivo de distinguir as espécies do hospedeiro humano e suíno têm sido propostos por Anderson desde 1993. Efetivamente, Zhu et al. (1999) empregando PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction -Restriction Fragment Length Polymorfism*), identificaram perfis de restrições diferentes para *Ascaris* sp. de origem humana e suína usando como alvo molecular a região nuclear *ITS1* (*Internal Transcribed Spacer 1*) (Figura 3).

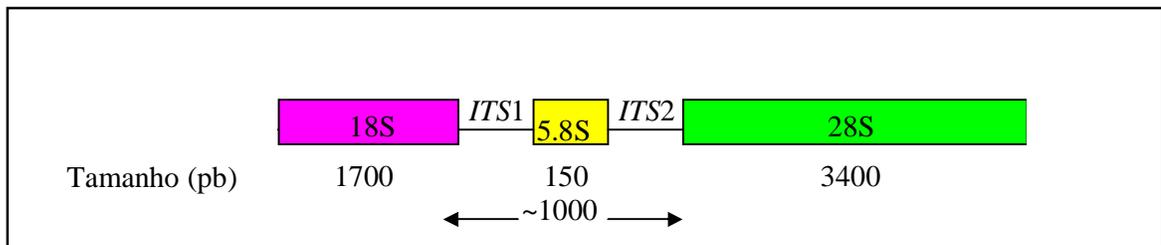


Figura 3: Esquema dos genes rRNA e regiões espaçadoras da maioria dos nematóides.

Legenda. *ITS1* e 2: região espaçadora interna transcrita 1 e 2. RNT: região terminal não transcrita. 18S 5.8S, e 28S: genes rRNA 18S, 5.8S e 28S, respectivamente.

Fonte: modificado de Dorris et al. (1999).

Peng et al. (2003), usando o mesmo alvo molecular, encontraram cinco genótipos do parasito (G1-G5) na espécie humana e suína em diferentes províncias chinesas. O genótipo classificado como G1 foi o mais prevalente na espécie humana (69,5%) enquanto G3 foi mais prevalente em suínos (82,4%). Os genótipos classificados como G4 e G5 foram encontrados somente na espécie humana, mas com baixa prevalência, de 0,4 e 0,6%, respectivamente. Já o genótipo G2 não mostrou ter afinidade maior por um ou outro hospedeiro, sendo a percentagem dos achados de 25,5% e 15,2%, na espécie humana e suína, respectivamente. Porém a maioria destas pesquisas usou larvas e/ou vermes adultos, material este de difícil acesso no Brasil para análise parasitológica de rotina, onde normalmente somente fezes estão disponíveis. Sendo assim, Leles (2007) e Leles et al. (2009) (Anexo I) propuseram um protocolo de diagnóstico molecular para *Ascaris* sp. em fezes, onde ressaltam a falta de estudos moleculares com este parasito na América do Sul. O estudo, além de estabelecer uma metodologia de diagnóstico, realiza a genotipagem que teve como resultado a caracterização do novo genótipo G6 para região *ITS1*. Os mesmos autores encontraram alta variabilidade intra-indivíduo em isolados de *Ascaris* sp. do Brasil usando como alvo a região *ITS1* e salientam os problemas de trabalhar com este alvo, dependendo do objetivo da pesquisa (Leles et al. 2010a, Anexo II).

Outros marcadores moleculares têm sido propostos para o estudo da epidemiologia molecular de *Ascaris* sp (Figura 4). Marcadores mitocondriais como cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) e NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) foram usados por Peng et al. (2005) em amostras provenientes de seis províncias chinesas, aonde os autores encontraram para o gene *cox1*, dez diferentes haplótipos de *Ascaris* sp. no hospedeiro humano (H1-H10) e dez em suínos (P1-P10). Para *nad1*, 11 diferentes haplótipos de *Ascaris* sp. foram encontrados no hospedeiro humano (H1-H11) e 15 em suínos (P1-P15). No entanto, ainda assim foi encontrado um haplótipo comum entre as espécies do

hospedeiro humano e suíno para o gene *cox1*. Leles et al. (2010b) (Anexo III) usando estes mesmos marcadores moleculares em amostras da América do Sul também mostraram a existência de haplótipos comuns ao hospedeiro humano e suíno.

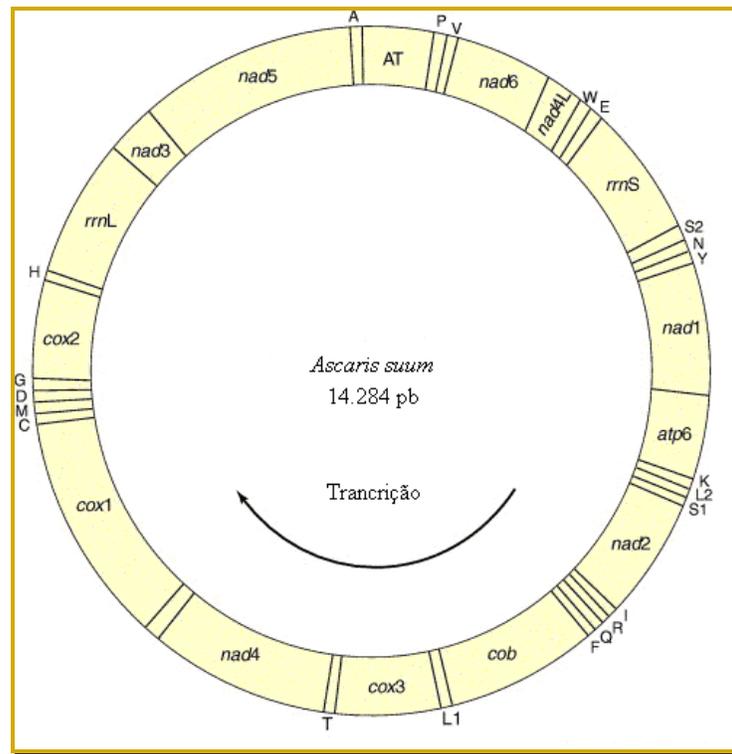


Figura 4. Genoma mitocondrial de *Ascaris suum*. Forma circular e tamanho de 14.284 pb (número de acesso no Genbank X54253). Contêm 12 genes protéicos (*cox1-3*, *nad1-6*, *nad4L*, *cob*, *atp6*), dois genes ribossomais e 20 genes transportadores. A seta indica o sentido da transcrição.

Fonte: modificado de Okimoto et al. (1992); Hu e Gasser (2006).

Microssatélites também têm sido propostos para estudo da epidemiologia molecular de *Ascaris* sp. e têm demonstrado que hibridização entre *Ascaris* sp. da população humana e suína tem ocorrido, o que a longo prazo trará implicações para os programas de controle da ascaríase (Criscione et al. 2007a, 2007b).

1.3.2 Epidemiologia molecular de *Trichuris* sp.

Estudos envolvendo o gênero *Trichuris* sp. como, *T. vulpis*, *T. suis*, *T. skrjabini*, *T. muris* e *T. arvicolae* têm proposto as regiões *Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1)* e *Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)* como diagnóstica de espécie, a região tem mostrado alta divergência entre as espécies do gênero *Trichuris* sp. (Cutillas et al. 2002, 2004, 2007).

Até pouco tempo atrás, para *T. trichiura* existia apenas uma sequência para o gene 18S depositada no GeneBank (número de acesso: DQ118536), o que não permitiria estudos mais robustos, uma vez que essa região é mais conservada, especialmente em espécies proximamente relacionadas como *T. trichiura* e *T. suis*. Apenas recentemente foram depositadas no GeneBank as primeiras sequências de *ITS* de *T. trichiura* (Cutillas et al. 2009). Os autores mostraram que, apesar de relacionados, isolados de *T. trichiura* de primatas não humanos e isolados de *T. suis* de porcos domésticos e selvagens são geneticamente diferentes e facilmente distinguíveis pela técnica de PCR-RFLP.

Pode-se dizer que ainda são incipientes os estudos com *T. trichiura*, dado o pequeno número de isolados estudados e informação genética disponível, e ainda não existem estudos usando a região *ITS* como alvo molecular em *T. trichiura* isolados de humanos.

1.4 Paleoparasitologia

Paleoparasitologia é a ciência que estuda os parasitos em material paleontológico e arqueológico (Ferreira et al. 1979). Em um sentido mais abrangente, a paleoparasitologia estuda as relações parasito-hospedeiro, assim como a origem e evolução das infecções, traçando um cenário paleoepidemiológico (Araújo et al. 2003). Os primeiros parasitos

recuperados em material antigo foram ovos de *Schistosoma haematobium* encontrados nos rins de múmias egípcias datadas de 3.200 AP (Antes do Presente) (Ruffer 1910). Com o desenvolvimento da técnica de reidratação em fosfato trissódico por Callen e Cameron (1960), os coprólitos (fezes dessecadas ou fossilizadas) passariam a ser estudados. Diversos tipos de materiais preservados nos sítios arqueológicos são potencialmente fonte de informação para os estudos paleoparasitológicos, tais como coprólitos, sedimentos, latrinas, fossas, corpos artificial ou naturalmente mumificados, artefatos que guardam vísceras preservadas, esqueletos, dentre outros. A paleoparasitologia nasce no Brasil no final da década de 70, constituindo hoje um consolidado grupo de pesquisa no país. Outros grupos de pesquisa em paleoparasitologia têm se espalhado pelo mundo, como nos Estados Unidos da América, França, Coréia, Japão, dentre outros, os quais também têm contribuído enormemente para esta área de pesquisa.

A paleoparasitologia tem relatado achados de parasitos no Velho e Novo Mundo, quer por evidências diretas ou indiretas. As evidências diretas constituem-se no achado de vestígios dos parasitos, como ovos de helmintos ou suas larvas (por exemplo, *Ascaris* sp., *Trichuris* sp., *Enterobius* sp., *Capillaria* sp., ancilostomídeos dentre outros), cistos de protozoários, antígenos ou ainda fragmentos de DNA preservados do parasito (Figura 5).

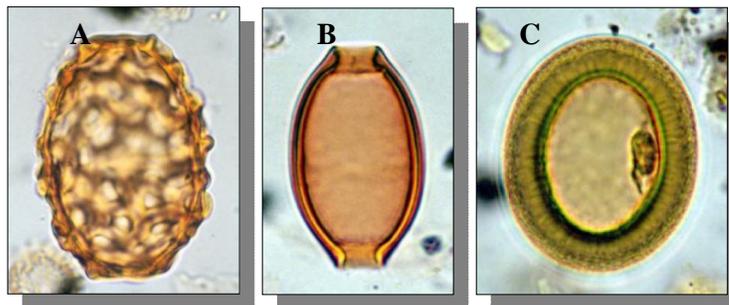


Figura 5. Ovos de parasitos. A: *Ascaris lumbricoides*.
B: *Trichuris trichiura*. C: *Taenia* sp.
Fonte: Matsui et al. 2003.

As evidências indiretas constituem-se, por exemplo, na observação de lesões ósseas características ocasionadas por algumas infecções como as deixadas pela tuberculose em estágio avançado ou sífilis terciária, hanseníase, dentre outras. Ou mesmo àquelas sugestivas da infecção, como, por exemplo, as deixadas pelos povos do Peru e Bolívia em cerâmicas mochica “huacos”, que representam figuras antropomórficas com mutilações de nariz e outros desenhos sugestivos de leishimaniose tegumentar (Altamirano-Enciso et al. 2003) (Figura 6).



Figura 6: Cerâmica da região andina, com mutilações de nariz e boca sugestivas de leishimaniose tegumentar.

Fonte: Pessoa 1948.

Os achados mais antigos de parasitos em material antigo datam do cretáceo inferior, ou seja, aproximadamente 100 milhões de anos atrás, tais como cistos de protozoários e ovos de helmintos em um coprólito de dinossauro encontrado na Bélgica (Poinar e Boucot 2006). Larvas de nematódeos também já foram encontradas em coprólito de hiena na Itália datado de 1,5 milhões de anos por grupo de pesquisa brasileiro (Ferreira et al. 1993). Sianto et al. (2009) fizeram uma revisão das zoonoses no passado pelos achados de

parasitos de animais em coprólitos humanos. Os autores mostraram que muitas das zoonoses hoje existentes estavam presentes no passado, sugerindo que estes dados, somados a estudos de emergência e reemergência de doenças, podem servir para traçar cenários futuros de disseminação das doenças infecciosas. Gonçalves et al. (2003) fizeram uma extensa revisão dos achados de parasitos de humanos por microscopia óptica no Velho e Novo Mundo (Tabela 2). Estes dados mostram o potencial da paleoparasitologia na reconstrução de cenários paleoepidemiológicos e como aporte na compreensão de infecções atualmente existentes, assim como na predição de outros cenários, como aumento, diminuição, desaparecimento ou o aparecimento de infecções parasitárias.

Tabela 2: Achados de parasitos em material arqueológico humano no Velho e Novo mundo.

*Achados de parasitos em material arqueológico humano	Novo Mundo		Velho Mundo	
	Período pré-contato	Período pós-contato	Período pré-contato	Período pós-contato
<i>Ancilostomídeos</i>	+	+	+	+
<i>Ascaris lumbricoides</i>	+	+	+	+
<i>Trichuris trichiura</i>	+	+	+	+
<i>Enterobius vermicularis</i>	+	-	+	-
<i>Strongyloides stercoralis</i>	?	-	+	-
<i>Trichonstrongylus</i> sp.	+	+	-	-
<i>Fasciola</i> sp.	?	+	-	?
<i>Shistosoma</i> sp.	-	-	+	+
<i>Dicrocoelium</i> sp.	-	?	+	-
Opisthorchiformes	+	-	+	-
<i>Paragonimus</i> sp.	-	+	+	+
<i>Taenia</i> sp.	-	+	+	+
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	+	+	+	+
<i>Hymenolepis</i> sp.	+	-	-	-
Acanthocephala	+	-	-	-
<i>Entamoeba</i> sp.	+	-	-	-
<i>Giardia duodenalis</i>	+	-	+	+
<i>Chilomastix mesnili</i>	-	-	+	-
<i>Cryptosporidium parvum</i>	+	-	-	-
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	+	-	-	-
<i>Isospora belli</i>	+	-	-	-
<i>Sarcocystis hominis</i>	+	-	-	-
<i>Echinococcus granulosus</i>	+	+	+	?
<i>Trichinella spiralis</i>	+	-	-	-

*Achados de parasitos em material arqueológico humano	Novo Mundo		Velho Mundo	
	Período pré-contato	Período pós-contato	Período pré-contato	Período pós-contato
<i>Dracunculus medinensis</i>	-	-	+	-
Vermes filariformes	-	-	+	-
Total 26	17	9	16	8

Fonte: modificado de Gonçalves et al. (2003). *: coprólitos, sedimentos, material de fossas e latrinas, material coletado de múmias e artefatos funerários. ?: diagnóstico incerto.

A paleoparasitologia tem rompido fronteiras e conseguido o reconhecimento internacional de outras ciências, ao propor alternativas da entrada da espécie humana nas Américas (Araújo et al. 2008a). Este trabalho aponta de forma incontestável vias transoceânicas de entrada do homem nas Américas, ao demonstrar que achados de geohelmintos em material pré-colombiano não poderiam ter vindo com a espécie humana pelo estreito de Bering, uma vez que este apresentava temperaturas muito abaixo da necessária para a manutenção e transmissão destes parasitos.

A aplicação de técnicas de biologia molecular à análise parasitológica, constituindo a paleoparasitologia molecular, também denominada por outros autores de paleomicrobiologia, permitiu a recuperação de parasitos antes não identificáveis à microscopia óptica (Drancourt e Raoult 2005). A partir da revisão feita por Drancourt e Raoult (2005) para estudos envolvendo diagnóstico molecular de helmintos em material antigo, observa-se que somente um helminto foi acrescentado recentemente à lista proposta pelos autores, *T. trichiura* (Oh et al. 2010). Contudo, embora nesta listagem de 2005 não contivesse o parasito *A. lumbricoides*, já havia um trabalho publicado por Loreille et al. (2001) onde caracterizaram molecularmente este parasito em material proveniente da Bélgica, datado da Idade Média. Os outros dois únicos trabalhos envolvendo diagnóstico molecular de helmintos em material arqueológico acrescentados a esta lista são de grupos de pesquisa do Brasil (Iñiguez et al. 2006, Leles et al. 2008). As ferramentas de

diagnóstico molecular têm procurado elucidar grandes catástrofes ocorridas ao longo da história, responsáveis por dizimar populações, tais como a “Peste de Atenas”. Estudos de paleoparasitologia molecular têm apontado a bactéria *Salmonella* sp., como possível responsável pela Peste da Atenas (Papagrigrakis et al. 2006), embora mais estudos devam ser realizados. A abordagem molecular tem ainda permitido estudos filogenéticos de muitos parasitos, abordando sua origem, evolução e dispersão (Ujvari 2008).

Núcleos de pesquisa em biologia molecular que usam material arqueológico como fonte de pesquisa têm se consolidado no Brasil, como o de Paleogenética na Universidade Federal do Pará, destinado ao trabalho com DNA humano antigo, e o de Paleoparasitologia Molecular na Fundação Oswaldo Cruz, destinado ao estudo de DNA antigo de diversos parasitos, com publicações que mostraram a recuperação de DNA antigo de parasitos como *Enterobius vermicularis*, *Trypanosoma cruzi*, *Ascaris* sp., HTLV e mais recentemente *Mycobacterium tuberculosis*. (Iñiguez et al. 2006, Lima et al. 2008, Fernandes et al. 2008, Leles et al. 2008, Orellana 2008, Iñiguez et al. 2009).

1.4.1 Paleodistribuição de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. por microscopia óptica.

A associação *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp., assim como atualmente, é uma das mais encontradas em material antigo pelo diagnóstico ao microscópio óptico, possivelmente pelos mesmos motivos que a faz tão prevalente ainda hoje, mas principalmente pela resistência dos ovos de ambos parasitos. Até o momento, o achado mais antigo para *Ascaris* sp. pertence ao sítio Arcy-sur-Cure, França datado de 30.000 anos. (Loreille e Bouchet 2003). Já para *Trichuris* sp. o achado mais antigo foi encontrado no sítio Kruger Cave na África do Sul e data de aproximadamente 10.000 anos. Neste sítio também se encontra o segundo achado mais antigo de *Ascaris* sp., que corresponde a associação A.

lumbricoides e *T. trichiura* mais antiga encontrada até agora, embora seja importante ressaltar que há incerteza quanto à origem humana do material deste sítio arqueológico (Evans et al. 1996).

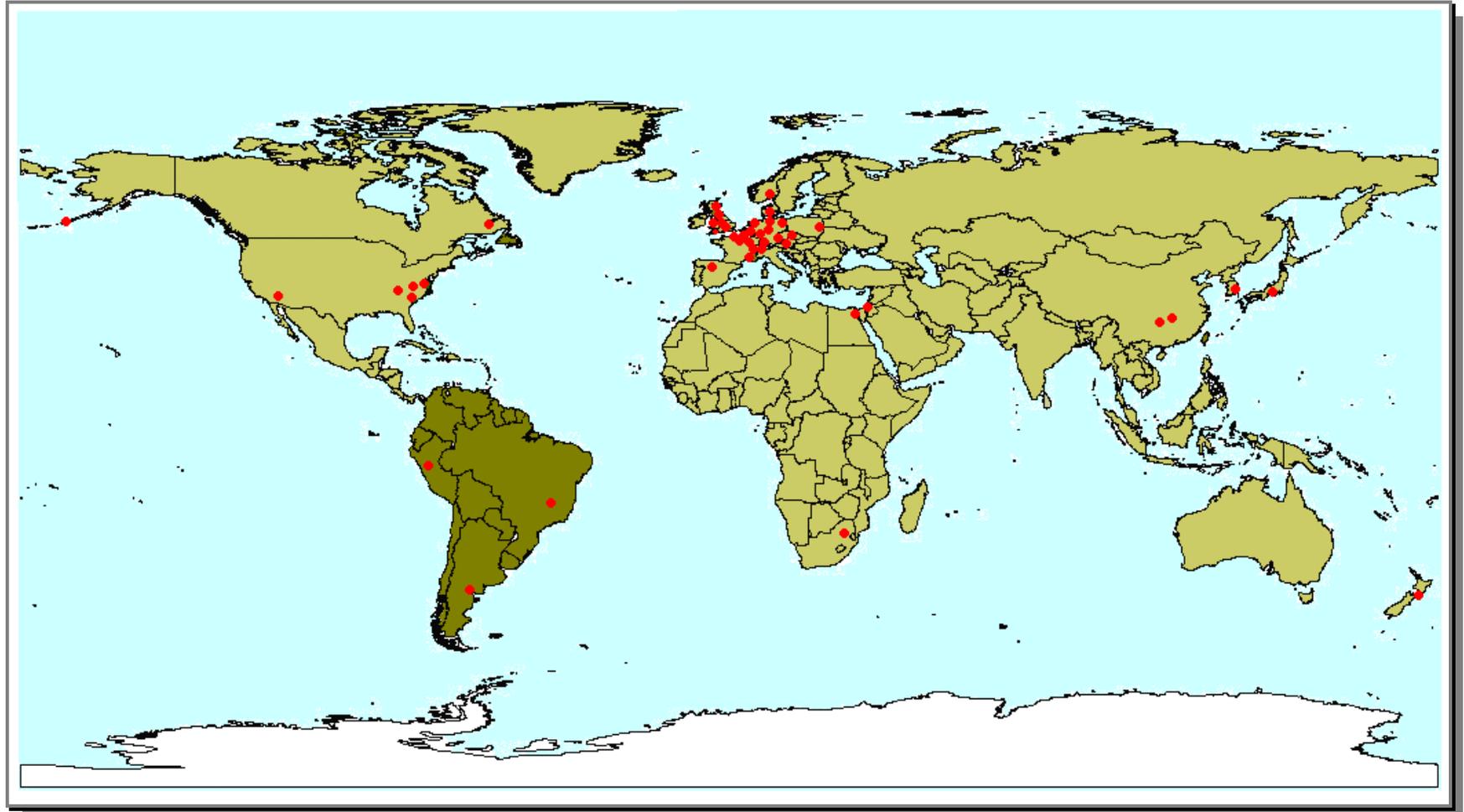
No entanto, quando se observam períodos de tempo e localidades específicas no passado, a distribuição desses parasitos se apresenta de maneira distinta. No período pré-colombiano achados de *A. lumbricoides* são raros na América do Sul (Gonçalves et al. 2003, Leles et al. 2004). O achado mais antigo está datado de 2.277 AC \pm 181 em Huarmey Valley, Peru (Patrucco et al. 1983), seguido do achado pertencente ao sítio arqueológico Gruta do Gentio II, Brasil datado de 3.490 \pm 120 – 430 \pm 70 AP (Gonçalves et al. 2003). Achados de ovos de *Ascaris* sp. em sedimento arqueológico, contidos em cavidade pélvica de restos humanos recuperados no distrito El Potrero de Santa Lucía, Andalgalá-Catamarca, Argentina datados de 470 \pm 200 AC a 310 \pm 90 AD também foram relatados (Pau et al. 2005). E, mais recentemente, achados em esqueleto de colonizador espanhol datado do século XVI no sítio arqueológico Nombre de Jesus na região da Patagônia, Argentina (Fugassa et al. 2006). Neste contexto, porém, fica difícil estabelecer se a infecção foi adquirida no continente sul americano.

Ainda assim, quando se comparam achados em vestígios arqueológicos de *T. trichiura* e *A. lumbricoides* na América do Sul, a ascaríase é inexpressiva se comparada à trichuríase (Figuras 7A e B).

Quanto ao período colonial, principalmente no que se refere à América do Sul, os achados são incipientes, tornando difícil qualquer suposição quanto à distribuição e prevalências das ascaríase e trichuríase. Contudo, para *Trichuris* sp. há um aspecto que desperta interesse, sua possível associação com um quadro clínico chamado “maculo” ou “mal del culo”. Este quadro clínico era caracterizado por prolapso retal e presença de vermes fixados à mucosa intestinal. À época havia relatos inclusive do tratamento do

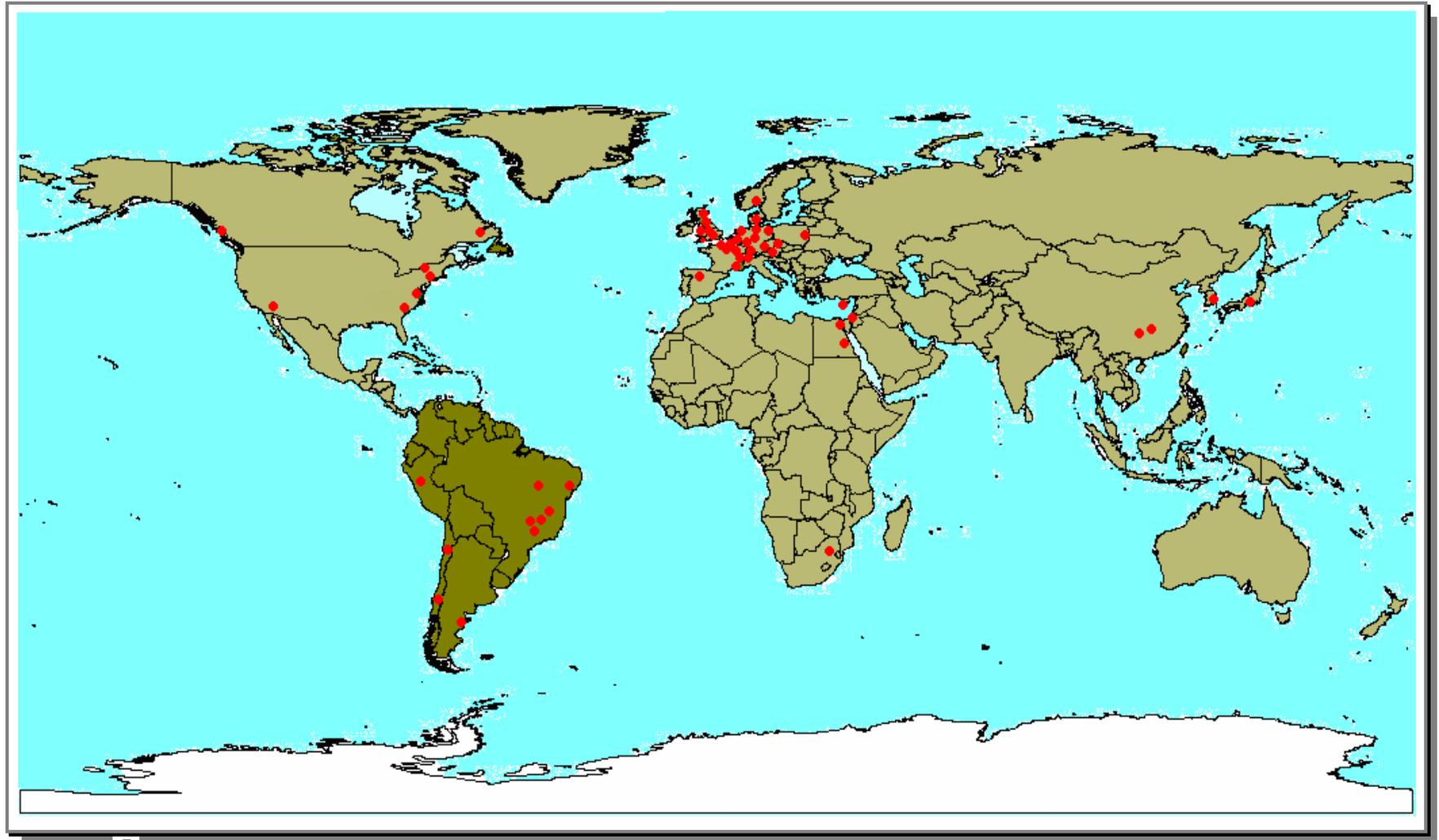
maculo com pólvora, pimenta, dentre outros. Entretanto, o termo “verme” em português seiscentista poderia se referir à diferentes organismos ou parasitos, como helmintos, larvas de insetos e outros. Porém, é importante ressaltar que este quadro clínico era muito comum no Brasil colonial, uma vez que a grande maioria dos cronistas do período se referia a ele (Guanabarinus et al. 2001). Sendo assim, a documentação histórica, ainda não muito explorada pela paleoparasitologia poderia ser utilizada como outra ferramenta na busca de novos achados, não só de *Trichuris* sp. como de outros parasitos, contribuindo para a construção e/ou remodelação de cenários paleoepidemiológicos.

Figura 7A: Paleodistribuição de *Ascaris lumbricoides* por diagnóstico ao microscópio óptico (30.300 AP – 1.930 AD).



Legenda: ● diagnóstico por microscopia óptica. AP: Antes do Presente. AD: Anno Domini.

Figura 7B: Paleodistribuição de *Trichuris trichiura* por diagnóstico ao microscópio óptico (8.300 AC – 1.930 AD).



Legenda: ● diagnóstico por microscopia óptica. AP: Antes do Presente. AD: Anno Domini.

1.4.2 Paleodistribuição de *Ascaris* sp. e *Trichiuris* sp. por diagnóstico molecular.

Considerando o paradoxo dos achados de *A. lumbricoides* e *T. trichiura* no material arqueológico revelados pelos achados por microscopia óptica, Leles (2007) propôs o uso de ferramentas de diagnóstico molecular como alternativa para identificar se problemas de ordem metodológica estariam envolvidos ou se *Ascaris* sp. realmente não estaria presente e/ou em prevalências muito baixas na América do Sul. Esta seria uma excelente abordagem, uma vez que seria capaz de identificar a presença do parasito pela recuperação de fragmentos do seu DNA, mesmo que os ovos do parasito não estivessem sendo observados. O primeiro trabalho com DNA antigo de *Ascaris* sp. foi feito por Loreille et al. (2001). Os autores descrevem a recuperação de DNA de ovos isolados em amostra de latrina da Idade Média no sítio arqueológico "Place d'Armes" em Namur, Bélgica. No entanto, na pesquisa supracitada, de 100 a 300 ovos de *Ascaris* sp. foram isolados para extração do DNA e, conseqüentemente, para detecção molecular do parasito. Porém, ovos de *Ascaris* sp. na América do Sul são raros ou não são encontrados. Sendo assim, a metodologia proposta por Loreille et al. (2001) não se aplicaria às amostras arqueológicas do continente sul americano. Desta maneira, Leles et al. (2008) (Anexo IV) propuseram um diagnóstico molecular de *Ascaris* sp. aplicado diretamente a DNA extraído de coprólitos, o qual se adequaria melhor ao material proveniente da América do Sul, ao invés da metodologia proposta por Loreille et al. (2001). Para rastrear as amostras potencialmente positivas para *Ascaris* sp., mesmo sem a presença dos ovos, escolheram principalmente as amostras positivas para *T. trichiura*, levando-se em conta a forte associação entre estes parasitos. Apesar do limitado número de amostras usadas neste trabalho, os autores apontam para um sub-diagnóstico da infecção na América do Sul, mostrando que a abordagem metodológica usada pela microscopia não detecta a presença de ovos de *Ascaris* sp.

simplesmente porque estes não estão preservados. Dos cinco sítios arqueológicos do Brasil e Chile avaliados, quatro tinham amostras positivas para *T. trichiura* pelo diagnóstico ao microscópio óptico e, destes quatro, três foram positivos para o diagnóstico molecular usando como alvo molecular um fragmento do gene mitocondrial *cytb*; além de uma amostra do Piauí negativa para *T. trichiura*, que foi positiva para *Ascaris* sp., mostrando que *Ascaris* sp. estaria circulando na América do Sul há pelo menos 8.800 anos (Tabela 3).

Tabela 3: Achados de *T. trichiura* e *A. lumbricoides* no período pré-colombiano pelo diagnóstico por microscópio óptico e molecular.

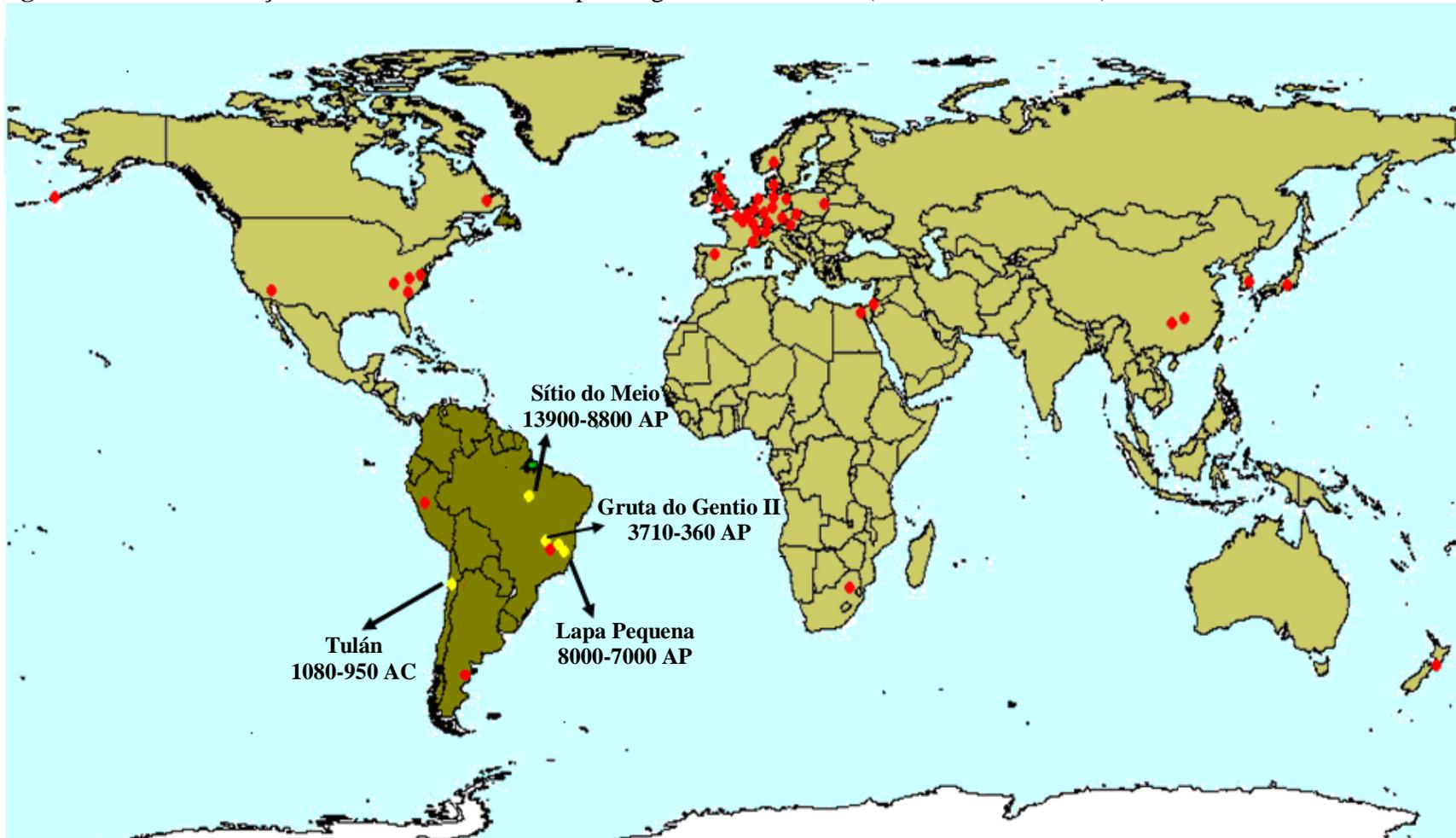
Sítios arqueológicos	País	Diagnóstico por microscopia ótica		Diagnóstico molecular	Datação	Referências
		<i>T. trichiura</i>	<i>Ascaris</i> sp.	<i>Ascaris</i> sp.		
Sítio do Meio, PI	Brasil	-	-	+	8800±60 AP	Gonçalves et al. 2003
Lapa Pequena, MG	Brasil	+	-	+	8800-7000 AP	Gonçalves et al. 2003
Boqueirão Soberbro, MG	Brasil	+	-	-	4905±85-1325±60 AP	Ferreira et al. 1982
Vale Huarney	Chile	-	+	NA	4227±181 AP	Patrucco et al. 1983
Santa Elina, MT	Brasil	+	-	NA	4000-2000 AP	Gonçalves et al. 2003
Gruta do Gentio II, MG	Brasil	+/-	+?	+/-	3490±120-430±70 AP	Ferreira et al. 1980, 1983
Tulán, San Pedro de Atacama	Brasil	+	-	+	3030-2900 AP	Gonçalves et al. 2003
Furna do Estrago	Brasil	+	-	NA	2000 AP	Ferreira et al. 1989
Vale Huarney	Chile	+	-	NA	950 AP	Patrucco et al. 1983

Legenda. NA: não avaliado. ?: diagnóstico incerto. AP: antes do presente.

Fonte: modificado de Leles et al. (2008).

Sendo assim, um novo cenário da paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. começava a ser traçado para América do Sul pelo diagnóstico molecular (Figura 8).

Figura 8: Paleodistribuição de *Ascaris lumbricoides* por diagnóstico molecular (13.900 AP – 360 AP).



Legenda: ● diagnóstico por microscopia óptica; ● diagnóstico molecular. Os sítios arqueológicos onde foi identificada a presença do parasito neste estudo estão indicados por setas. 1: Sítio do Meio, PI; 2: Gruta do Gentio II, MG; 3: Lapa Pequena, MG; 4: Tulán, San Pedro de Atacama, Chile. Fonte: Leles 2007. AP: Antes do Presente. AD: Anno Domini.

Para *T. trichiura* ainda não se pode traçar cenários de paleodistribuição pelo diagnóstico molecular, pois apenas em janeiro de 2010 surgiu o primeiro trabalho envolvendo recuperação de DNA antigo deste parasito, proveniente de um único sítio arqueológico coreano (Oh et al. 2010).

No entanto, existe uma série de fatores que podem ser ainda explorados a fim de esclarecer a paleodistribuição de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. Primeiramente, para dar uma perspectiva paleoepidemiológica à pesquisa e mais robustez aos achados de Leles et al. (2008), amostras e sítios arqueológicos adicionais precisam ser incluídos, assim como outros alvos moleculares passíveis de comparação com a epidemiologia moderna da infecção. O estudo paleogenético de amostras negativas pela microscopia para *Trichuris* sp. pode revelar se o mesmo está ocorrendo para este parasito. Finalmente, tentar elucidar porque os ovos de *Ascaris* sp. não estão sendo preservados nas amostras arqueológicas, principalmente as do continente sul americano (Leles et al. 2010c, Anexo V).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a associação parasitária *Ascaris* sp. e *Trichuris*. sp. de origem humana na América do Sul pré-colombiana por diagnóstico molecular e discutir os fatores envolvidos na paleodistribuição encontrada.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial da região *ITS1* de *Ascaris* sp. como marcador molecular em isolados modernos de origem humana do Brasil.
- Caracterizar molecularmente regiões dos genes *cox1* e *nad1* de *Ascaris* sp. em isolados de material fecal de origem humana e suína do Brasil.
- Diagnosticar molecularmente *T. trichiura* em isolados fecais modernos de origem humana usando como alvo as regiões 18S e/ou *ITS*.
- Diagnosticar molecularmente a presença de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. em coprólitos humanos e/ou sedimentos provenientes de sítios arqueológicos do continente sul americano.
- Buscar os fatores envolvidos na paleodistribuição observada entre *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. por meio de uma revisão sistemática dos achados em material antigo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Avaliando a variabilidade intra-indivíduo de *Ascaris* sp.

3.1.1 Amostras fecais atuais

Nove amostras fecais humanas positivas ao exame parasitológico para *Ascaris* sp. pelos métodos Kato-Katz (Kato 1960, Katz et al. 1972) e/ou sedimentação espontânea (Lutz 1919) foram analisadas. Sete da cidade do Rio de Janeiro e 2 da cidade de Santa Isabel do Rio Negro no estado do Amazonas (Tabela 4).

Tabela 4: Amostras fecais positivas para *Ascaris* sp. usadas no estudo.

Amostras	Localidade
DL01	Rio de Janeiro
DL02	Rio de Janeiro
DL04	Rio de Janeiro
DL13	Rio de Janeiro
DL15	Rio de Janeiro
DL16	Rio de Janeiro
DL17	Rio de Janeiro
041-1	Santa Isabel do Rio Negro
104-5	Santa Isabel do Rio Negro

3.1.2 Metodologia

Inicialmente foi feita sedimentação espontânea pelo método de Lutz (1919) para todas as amostras. Para verificar a variabilidade intra-indivíduo, um único ovo foi isolado de cada amostra fecal com auxílio de um microscópio óptico (Nikon E200 Eclipse) e microscópio estereoscópio (Carl Zeiss DL0603). A extração do DNA e PCR foram feitas

segundo protocolo de diagnóstico molecular para *Ascaris* sp. estabelecido por Leles et al. 2009 (Anexo I).

Extração do DNA: os ovos isolados passaram por prévio tratamento físico de 5 ciclos de ferve-congela (98°C/Nitrogênio líquido). Em seguida foi adicionado 400µl de tampão de digestão (10 mM NaCl; 10mM Tris HCl pH 8.0; 2 mM EDTA), 100µl SDS 10%, 20 µl DTT 1M e 1,2 mg de proteinase K (Iñiguez et al. 2002). A reação foi incubada *over night* em *shaker* a temperatura de 55°C. Posteriormente foi feita extração fenol clorofórmio seguida de purificação em colunas Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Eventualmente os ovos passaram só por tratamento físico.

PCR: acessou-se a região *ITS1* com os oligonucleotídeos XZ5 forward 5'-TGATGTAATAGCAGTCCGGCG-3', XZ1 reverse 5'-GGAATGAACCCGATGGCGCAAT-3' e NC13 reverse 5'-GGCTGCGTTCTTCATCAT-3' (Zhu et al. 1999). A PCR foi realizada em volume final de 50 µl (10 X de Tampão: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl - Invitrogen, pH 8.0); 3 mM MgCl₂; 0.2 mM do mix de dNTP; 200 ng para cada oligonucleotídeo; 2.5 U de *Taq* polimerase Platinum; 3 a 5µl ou 20-100 ng do DNA. Toda PCR foi acompanhada de um controle negativo (todos os reagentes menos o DNA da amostra) e um positivo (verme adulto de *Ascaris* sp.). As reações foram submetidas a um ciclo inicial de 5 minutos a 96°C, seguido de 40 ciclos de 96°C por 30 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto em termociclador programável (PTC 100 60 v, MJ Research, Inc). Produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, em seguida corados com brometo de etídio (diluição: 20µL de brometo de etídio [10mg/ml] em 200mL de água destilada) e visualizados em transluminador.

Sequenciamento nucleotídico: os produtos da PCR amplificados foram purificados em colunas Wizard® SV Gel and PCR Clean - Up System (Promega) seguido de sequenciamento nucleotídico direto usando Kit comercial Big Dye Terminator v 3. 1 Cycle

Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Posteriormente, os produtos foram clonados usando o sistema *pGEM-T* and *pGEM Easy Vector System* (Promega) e pelo menos três clones de cada amostra sequenciados em ambas as fitas em sequenciador automático 3100 Applied Biosystems como descrito pelo fabricante. Os programas Chromas versão 1.45 (School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia), BioEdit Sequence Alignment versão 5.0.9 (Department of Microbiology, North Carolina State University, USA) e DAMBE v4.2.13 foram usados na edição e análise das seqüências nucleotídicas. As seqüências nucleotídicas deste estudo foram depositadas no GenBank (números de acesso: EF1536919–23, EU635683–95 e GQ339794–GQ339801). Todas as seqüências nucleotídicas geradas neste estudo foram alinhadas com auxílio do programa Bioedit v. 5.0.9 e comparadas a todas seqüências disponíveis no GenBank pelo uso da ferramenta Blast (NCBI), disponível no sítio <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

3.2 Caracterização dos genes mitocondriais *nad1* e *cox1* de *Ascaris* sp. do Brasil

3.2.1 Amostras atuais

Foram selecionadas amostras de regiões brasileiras onde há ou houve contato entre a população humana e suína. Quarenta e cinco amostras fecais humanas positivas ao exame parasitológico para *Ascaris* sp. pelos métodos Kato-Katz (Kato 1960, Katz et al. 1972) e/ou sedimentação espontânea (Lutz 1919) foram selecionadas. Trinta e uma eram provenientes da cidade de Santa Isabel Rio do Negro, no estado do Amazonas e treze da cidade Rio de Janeiro. Incluiu-se como controle um verme adulto de *A. lumbricoides* proveniente de Angola. Adicionalmente foram avaliadas onze amostras de origem suína, seis amostras fecais proveniente da região sul do estado de Minas Gerais, três vermes adultos do estado

do Rio de Janeiro e dois vermes adultos do estado do Espírito Santo, sendo que os vermes adultos estavam conservados em formol 5% (Tabela 5).

Tabela 5: Amostras deste estudo.

Localidade (n)	Hospedeiro	Amostras
Rio de Janeiro (13)	Humano	DL01-06; 12-17, 22
Santa Isabel do Rio Negro (31)	Humano	SI11-12; SI15; SI24; 010.7; 033.5; 040.1; 040.4; 041.1; 043.4; 061.10; 062.1; 071.6; 082.5; 103.4; 104.1-2, 4-5; 113.4; 115.2; 126.5-6; 128.3, 5-6, 8; 152.1; 157.15; 163.6; 164.1
Angola (1)	Humano	HAn
Subtotal de amostras humanas (45)		
Minas Gerais, Brasil (6)	Suíno	PMG1-6
Espírito Santo, Brasil (2)	Suíno	PES1-2
Rio de Janeiro, Brasil (3)	Suíno	PRJ1-3
Subtotal de amostras suínas (11)		
Total (56)		

3.2.2 Metodologia

Tratamento prévio das amostras

Fezes: inicialmente as amostras foram codificadas e imediatamente estocadas a -20°C .

Posteriormente, foi feita sedimentação espontânea das fezes, segundo a técnica de Lutz (1919).

Vermes adultos: as amostras foram lavadas três vezes em solução de PBS.

Extração de DNA

As amostras fecais passaram por tratamento físico de cinco ciclos de ferve-congela (98°C /Nitrogênio líquido). Os vermes adultos foram macerados em nitrogênio líquido. Em seguida, adicionaram-se 400 μl de tampão de digestão (10 mM NaCl; 10mM Tris HCl pH

8.0; 2 mM EDTA), 100µl SDS 10%, 20µl DTT 1M e 1,2 mg de proteinase K. A reação foi incubada *over night* em *shaker*, à temperatura de 55°C. Posteriormente, fez-se extração fenol clorofórmio, seguida, de purificação em colunas Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) ou illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Amershan). Adicionalmente, usou-se o Kit comercial QIAamp® DNA Stool Min Kit (Qiagen) com modificações padronizadas por Leles et al. 2009 (Anexo I). O DNA de algumas amostras foi quantificado em espectrofotômetro por absorvância nos comprimentos de onda 260 nm, 280 nm e 320 nm.

PCR

Usaram-se oligonucleotídeos previamente descritos na literatura específicos para os genes mitocondriais *cox1* e *nad1* de *Ascaris* sp. e alguns desenhados especificamente para esta pesquisa (Tabela 6). A reação da PCR foi feita de acordo com Peng et al. (2005). Os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio dos programas Primer 3 e Blast disponíveis nos endereços eletrônicos: <http://primer3.sourceforge.net/releases.php> e www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast. PCR para amplificação de DNA humano mitocondrial foi realizado para verificar a presença de inibidores (Tabela 6).

Tabela 6: Oligonucleotídeos e combinações usadas nas ampliações.

	Oligonucleotídeos	Sequências	Tamanho dos produtos da PCR em pares de base (pb)	Referências
Ascaris sp.	<i>cox1</i> As-Co1F forward As-Co1R reverse	5'-TTTTTTGGTCATCCTGAGGTTTAT-3' 5'-ACATAATGAAAATGACTAACAAC-3'	± 430 pb	Peng et al. 2005
	As-Co1F forward *Cox1R reverse	5'-TTTTTTGGTCATCCTGAGGTTTAT-3' 5'-GCCCCGAGAGTCAAGATCCAT-3'	± 200 pb	Peng et al. 2005 *
	*Cox1F forward As-Co1R reverse	5'-GGATCTTGACTCTCGGGCTTA-3' 5'-ACATAATGAAAATGACTAACAAC-3'	± 250 pb	Peng et al. 2005 *
	<i>nad1</i> MH5F forward As-NDR reverse	5'-TATGAGCGTCATTTATTGGG-3' 5'-GCATCACAATAGCCAACAAATAC-3'	± 400 pb	Peng et al. 2005
	MH5F forward *NAD1R reverse	5'-TATGAGCGTCATTTATTGGG-3' 5'-CAGAAAACCCAATCAAACACA-3'	± 270 pb	Peng et al. 2005 *
	*NAD1F forward As-NDR reverse	5'-CTCCTCTGAATTCTTCGAAA-3' 5'-GCATCACAATAGCCAACAAATAC-3'	± 280 pb	Peng et al. 2005 *
	Humano	<i>cox2</i> Paabo A Paabo C	5'-ATGCTAAGTTAGCTTTACAG-3' 5'-ATTCCCCTAAAAATCTTTGA-3'	± 90 pb

*Desenhados para este estudo.

Sequenciamento nucleotídico

Os produtos da PCR foram purificados em colunas Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguido de sequenciamento nucleotídico direto usando Kit comercial Big Dye Terminator v 3. 1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). Os produtos foram clonados usando o sistema *pGEM-T* and *pGEM Easy Vector System* (Promega). As amostras foram sequenciadas em ambas as fitas em sequenciador automático 3100 Applied Biosystems como descrito pelo fabricante. Os programas Chromas versão 1.45 (School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia), BioEdit Sequence Alignment versão 5.0.9 (Department of Microbiology, North Carolina State University, USA), GeneDoc v 2.6.002 e DAMBE v 4.2.13 foram usados na edição e análise das sequências nucleotídicas. A divergência

nucleotídica das sequências (d) e respectivo desvio padrão (SD) foram calculados para cada gene, para ambos os hospedeiros e também para ambas as regiões geográficas do Brasil usando a distância p (*p-distance*) no programa MEGA v.4.1, incluindo todas as sequências dos genes *cox1* e *nad1* avaliadas no Genbank. A árvore genética *Neighbor-Joining* (NJ) foi construída no programa MEGA v.4.1 e foi avaliada pela análise de *bootstrap* de 1.000 réplicas. Dados do hospedeiro e origem geográfica foram incluídos nas árvores. As sequências nucleotídicas deste estudo foram depositadas no GenBank (números de acesso: GU326948-GU326964).

3.3 Diagnóstico molecular de *Trichuris* sp. em amostras modernas

De 30 a 100 ovos de *Trichuris* sp. de origem humana foram isolados de fezes com auxílio de microscópio óptico (Nikon E200 Eclipse) e microscópio estereoscópio (Carl Zeiss DL0603). Os mesmos procedimentos previamente descritos para ovos isolados de *Ascaris* sp. foram aplicados na extração do DNA de *Trichuris* sp. Adicionalmente foi feita extração de DNA diretamente das fezes seguindo o protocolo padronizado para *E. vermiculares* por Iñiguez et al. (2003), e para *Ascaris* sp. por Leles et al. (2009). Para *T. trichiura* foram desenhados oligonucleotídeos para o gene ribossomal 18S DNA com base na única sequência disponível no GenBank (número de acesso: DQ118536). Para amplificação da região *ITS* de *Trichuris trichiura* foram usados inicialmente oligonucleotídeos universais para nematóides (NC5, NC13R e NC2R) e posteriormente oligonucleotídeos específicos para *T. trichiura* (Cutillas et al. 2009) (Tabela 7). Os oligonucleotídeos foram desenhados com auxílio dos programas Primer 3 e Blast disponíveis nos endereços eletrônicos: <http://primer3.sourceforge.net/releases.php> e www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast.

Tabela 7: Oligonucleotídeos usados para o diagnóstico molecular de *T. trichiura*.

Oligonucleotídeos	Sequências	Tamanho dos produtos da PCR em pares de base (pb)	Referências
18S TT0926 forward TT1214 forward TT1315 forward TT1334 reverse TT1606 reverse TT1709 reverse	5'-TTGCGAAAGCATTGTCAAG-3' 5'- CTGCGAGGATTGACAGATCA-3' 5'-CGAACGAGACTCTGGCCTAC-3' 5'- GTAGGCCAGAGTCTCGTTTCG-3' 5'- ACGTTTCAACCGATTTCCTG-3' 5'- GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3'	120-783 pb	Desenhados para este estudo
ITS NC5 forward NC2 reverse	5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3' 5'-TTAGTTTCTTTTCCCTCCGCT-3'	~1000 pb	Gasser et al. 1996
TTF forward TTR reverse	5'-CTACGTCCCTGCCCTTTGTA-3' 5'- TCTTTTCCCTCCGCTTAACGAT-3'.	905 pb	Cutillas et al. 2009

PCR: a reação da PCR para ambos os alvos moleculares, assim como a ciclagem usada foram realizadas segundo protocolo proposto por Cutillas et al. (2009). Os produtos foram sequenciados diretamente conforme descrito nas sessões anteriores.

Foi feita uma análise das sequências de *ITS* do gênero *Trichuris* sp. disponíveis no Genbank usando-se a ferramenta blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) .

3.4 Diagnóstico molecular de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. em material arqueológico

Setenta e uma amostras foram selecionadas nessa etapa de estudo, compreendendo coprólitos humanos e sedimentos provenientes de diversos sítios arqueológicos, os quais pertencem à coleção do laboratório de paleoparasitologia da ENSP-FIOCRUZ e laboratório de paleogenética anexo ao LGMM/IOC-FIOCRUZ, conforme discriminado abaixo (Tabela 8A-D). Embora a maioria das amostras usadas tenham sido coletadas por outros pesquisadores, muito antes da realização deste estudo, destacam-se as amostras provenientes da Igreja da Sé (Tabela 8A) e sítio arqueológico Cubatão I (Tabela 8B) que

foram coletadas por nosso grupo de pesquisa, seguindo os padrões para estudos paleogenéticos (Drancourt e Raoult 2005).

3.4.1 Amostras

Tabela 8A: Localidade, datações e parasitos encontrados nas amostras arqueológicas pré-Colombianas do Brasil.

Amostras	Descrição	*Parasitos
Sítio Gruta do Gentio II, MG (3.490 +-120 a 430 +- 70 AP)		
A22f	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp., ancilostomídeos
A24a	Coprólito	Capilária, acarídeo, ancilostomídeos, cestóide
A05	Coprólito	Ancilostomídeo
A11	Coprólito	Ascarídeo?
A105	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp., ancilostomídeos
A107	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp., ancilostomídeos
Subtotal 6		
Sítio Lapa Pequena, MG (8000-7000 AP)		
A47	Coprólito	-
A48	Coprólito	-
Subtotal 2		
Sítio Boqueirão Soberbo, MG (4905±85-1325±60 AP)		
A213	Sedimento	<i>Trichuris</i> sp.
A283	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp.
A306	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp.
A308	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp., ancilostomídeo
A319	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp.?
A320	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp.?
Subtotal 6		
Sítio Barreirinho, MG (NA)		
A259	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp.
A266	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp., ancilostomídeos
Subtotal 2		
Sítio Boqueirão da Pedra Furada, PI (8530-7250 AP)		
A337	Coprólito	Ancilostomídeos
A338	Coprólito	Ascarídeo, datação (NA)
A352	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp., ancilostomídeo, datação (NA)
Sítio Boqueirão da Pedra Furada, PI (8530-7250 AP)		
A353	Coprólito	Ascarídeo, datação (NA)
A358	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp., datação (NA)
A360	Coprólito	-
Subtotal 6		
Sítio do Meio, PI (13900-8800 AP)		
1216	Coprólito/sedimento	Oxúrídeo
Sítio Cubatão I, SC (pré-Colombiano)		
A2280	Sedimento dos forames sacrais	-
A2082	Sedimento dos forames sacrais	-
A2083	Sedimento da pelve	-
A2088	Sedimentos dos forames sacrais	-
A2091	Sedimento da pelve	-
A2094	Sedimento da pelve	-
Amostras	Descrição	*Parasitos
Sítio Cubatão I, SC (pré-Colombiano)		
Subtotal 6		
Total 28		

*:Diagnóstico por microscopia óptica. AP: anos antes do presente. NA: não avaliada. ? diagnóstico incerto. - diagnóstico negativo.

Tabela 8B: Localidade, datações e parasitos encontrados nas amostras arqueológicas do período Colonial do Brasil.

Amostras	Descrição	*Parasitos
Igreja Antiga Sé-RJ (XVII-XIX)		
3	Sedimento do sacro	-
4A	Sedimento dos forames do sacro	-
7A	Sedimento dos forames do sacro	-
8A	Sedimento da pelve	-
12B	Sedimento do sacro	-
14B	Sedimento dos forames do sacro	-
17H	Sedimento dos forames do sacro	-
18A	Sedimento dos forames do sacro	-
20A	Sedimento da pelve	-
22B	Sedimento dos forames do sacro	-
23A	Sedimento dos forames do sacro	-
25B	Sedimento dos forames do sacro	-
26A	Sedimento dos forames do sacro	-
28C	Sedimento dos forames do sacro	-
30	Sedimento da pelve	-
32	Sedimento da pelve	-
33C	Sedimento dos forames do sacro	-
34A	Sedimento dos forames do sacro	-
38	Sedimento da pelve	-
Total 19		

*Diagnóstico por microscopia óptica. - diagnóstico negativo.

Tabela 8C: Localidade, datações e parasitos encontrados nas amostras arqueológicas do Chile e Argentina.

Amostras	Descrição	*Parasitos
Tulán, San Pedro de Atacama, Chile (1080-950 AC)		
A710c	Sedimento	Nematóide
A711	Sedimento	<i>E. vermicularis</i> , <i>T. trichiura</i>
A714	Sedimento	<i>E. vermicularis</i> , <i>T. trichiura</i>
A715	Sedimento	<i>Trichostrongylus</i> sp.
A722	Sedimento	<i>E. vermicularis</i>
A724	Sedimento	<i>E. vermicularis</i>
Subtotal 6		
Tilliviche, Chile (4100-1950 AC)		
A160	Coprólito	Ancilostomídeo
A173	Coprólito	<i>Trichuris</i> sp.
A176	Coprólito	<i>D. pacificum</i>
A180	Coprólito	Nematódeo, trematódeo
A182	Coprólito	Nematódeo, trematódeo
Subtotal 5		
Nombre de Jesus, Patagônia, Argentina (XVI)		
M24	Coprólito humano? datação (~ 6000 AP)	-
M51	Sedimentos da pelve	<i>Trichuris</i> sp., <i>Ascaris</i> sp.?
M128 Kit	Sedimentos dos forames do sacro	<i>Ascaris</i> sp., <i>Capillaria</i> sp.
Subtotal 3		
Total 14		

*Diagnóstico por microscopia óptica. AP: anos antes do presente. AC: anos antes de Cristo. NA: não avaliada. ? diagnóstico incerto. - diagnóstico negativo.

Tabela 8D: Localidade, datações e parasitos encontrados nas amostras arqueológicas do Velho Mundo usadas como controle positivo.

Amostras	Descrição	*Parasitos
Lübeck, Alemanha (XV)		
**A389	Sedimento	<i>T. trichiura</i> , <i>A.lumbricoides</i> , <i>Fasciola sp.</i> , <i>Diphylobotrium</i>
Walraversijde, Bélgica (XVI)		
**A1380	sedimento	<i>T. trichiura</i> , <i>A.lumbricoides</i>
**A1384	sedimento	<i>T. trichiura</i> , <i>A.lumbricoides</i>
Subtotal 3		
Espanha (período correspondente ao Colonial do Brasil)		
HM1	sedimento	<i>T. trichiura</i> e <i>A. lumbricoides</i>
HM4	Sedimento	<i>T. trichiura</i> e <i>A. lumbricoides</i>
HM6	Sedimento	<i>T. trichiura</i> e <i>A. lumbricoides</i>
HM8	Sedimento	<i>T. trichiura</i> e <i>A. lumbricoides</i>
HM7	Sedimento	<i>T. trichiura</i> e <i>A. lumbricoides</i>
HM9	sedimento	<i>T. trichiura</i> e <i>A. lumbricoides</i>
HG	Sedimento pelve	<i>T. trichiura</i> e <i>A. lumbricoides</i>
Homem de Gallera		
Subtotal 7		
Total 10		

*Diagnóstico por microscopia óptica. AP: anos antes do presente. AC: anos antes de Cristo. NA: não avaliada. ? diagnóstico incerto. - diagnóstico negativo. ** eventualmente ovos de *Ascaris lumbricoides* e/ou *Trichuris trichiura* foram isolados.

3.4.2 Metodologia

Todas as etapas de trabalho com material arqueológico foram feitas no laboratório de paleogenética anexo ao LGMM-IOC, FIOCRUZ, utilizado exclusivamente para pesquisa com DNA antigo.

Tratamento prévio

Após medidas de prevenção e/ou descontaminação seguindo os critérios de autenticidade com trabalhos envolvendo DNA antigo (Drancourt e Raoult 2005), as amostras foram reidratadas e dissolvidas em solução de Na₃PO₄ 0,5%, com auxílio de um bastão de vidro e becker, depois de fechadas para não contaminação com material moderno, permaneceram reidratando por 72h.

Extração do DNA

As etapas de digestão, extração e purificação do DNA foram realizadas usando-se o protocolos padronizados para os coprólitos por Iñiguez et al. (2002, 2006) e Leles et al. (2008) (Anexo IV), que basicamente consistem no tratamento físico-fenol clorofórmio e físico - *Kit QIAamp® DNA Stool Min Kit* (Qiagen) aqui descritos para amostras modernas. Exceto pela maior concentração de proteinase K (2.4mg) e alternâncias no período e temperatura de incubação (2h a 55°C ou 1 dia a 37°C ou 1 dia a T°C ambiente). Purificações adicionais foram feitas quando necessário. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro por absorvância nos comprimentos de onda de 260nm, 280nm para pureza e 320nm para nucleotídeos livres. Depois o DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose de alta resolução (3%) ou eventualmente em gel de poliacrilamida (8%), e em seguida corados em brometo de etídio (diluição: 20µL de brometo de etídio [10mg/ml] em 200mL de água destilada).

PCR

Na PCR foram usados oligonucleotídeos previamente descritos na literatura, específicos para os genes mitocondriais *citb*, *cox1* e *nad1* de *Ascaris* sp. e região nuclear 18S de *Trichuris* sp. além de outros desenhados especificamente para este estudo. PCR para amplificação de DNA humano mitocondrial (gene citocromo oxidase 2 - *cox2* e região hipervariável 1 – *HVS1*) foram realizados para avaliar a qualidade do DNA antigo no material, assim como averiguar e/ou confirmar a origem humana do material (Tabela 9).

Tabela 9: Oligonucleotídeos e combinações usadas no material arqueológico.

	Oligonucleotídeos	Sequências	Tamanho dos produtos da PCR em pares de base (pb)	Referências
Ascaris sp.	<i>cytb</i> CCRB-Asc1 forward CCRB-Asc2 reverse	5'-GTTAGGTTACCGTCTAGTAAGG-3' 5'-CACTCAAAAAGGCCAAAGCACC-3'	142 pb	Loreille et al. 2001
	<i>cox1</i> As-Co1F forward *Cox1R reverse	5'-TTTTTTGGTCATCCTGAGGTTTAT-3' 5'-GCCCCGAGAGTCAAGATCCAT-3'	~ 200 pb	Peng et al. 2005 *
	*Cox1F forward As-Co1R reverse	5'-GGATCTTGACTCTCGGGCTTA-3' 5'-ACATAATGAAAATGACTAACAAC-3'	~ 250 pb	Peng et al. 2005 *
	<i>nad1</i> *NAD1F forward *NAD1R reverse	5'-CTCCTCTGAATTCTTCGGAAA-3' 5'-CAGAAAACCCAATCAAACACA-3'	150 pb	*
Trichuris sp.	18S *TT1214 forward *TT1709 reverse	5'- CTGCGAGGATTGACAGATCA-3' 5'- GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3'	496 pb	*
	*TT1315 forward *TT1606 reverse	5'-CGAACGAGACTCTGGCCTAC-3' 5'- ACGTTTCAACCGATTCCTG-3'	292 pb	*
	*TT1214 forward *TT1334 reverse	5'- CTGCGAGGATTGACAGATCA-3' 5'- GTAGGCCAGAGTCTCGTTTCG-3'	120 pb	*
Humano	<i>cox2</i> Paabo A forward Paabo C reverse	5'-ATGCTAAGTTAGCTTTACAG-3' 5'-ATTCCCCTAAAAATCTTTGA-3'	92 pb	Paabo 1990
	<i>HVS1</i> L16234 forward H16422 reverse	5'-CACATCAACTGCAACTCCAA-3' 5'-ATTGATTTACGGAGGATGG-3'	188 pb	*

*Desenhados para este estudo.

Alternativamente, fez-se a PCR reconstrutiva previamente à PCR convencional, que consiste basicamente em uma reação de PCR sem os oligonucleotídeos. Esta PCR proposta inicialmente por Golenberg et al. (1996), tem sido aplicada por Iñiguez et al. (2003) em material arqueológico no intuito de reconstruir e aumentar as concentrações de DNA inicial disponível. A reação da PCR foi realizada em volume final de 50 µl (10 X de Tampão: 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl-Invitrogen, pH 8.0; 3 mM MgCl₂; 0.2 mM do mix de dNTP; 50 a 100 ng para cada oligonucleotídeo; 2.5 U de *Taq* polimerase Platinum; 5-10 µl ou 50-100 ng de DNA). Toda PCR foi acompanhada de um controle negativo da reação

(todos os reagentes menos o DNA da amostra) e de um controle negativo da extração de DNA. As reações foram submetidas a um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 45 a 50 ciclos de 94°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos em termociclador programável (PTC 100 60v, MJ Research, Inc). Os produtos da PCR foram submetidos ao sequenciamento direto e/ou foram clonados para o sequenciamento nucleotídico dos produtos clonados conforme descrito anteriormente.

As sequências nucleotídicas do DNA antigo dos parasitos foram comparadas com as obtidas do material atual e antigo por nós trabalhadas e as disponíveis no GenBank. Índices de similaridade entre as sequências nucleotídicas e proteicas foram calculados com auxílio da ferramenta Blast, disponível no sítio (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast), e do programa Gendoc v2.6.002 (usando o código mitocondrial de invertebrados), respectivamente.

Hibridização

O Kit *Gene Images Alkphos Direct Labelling and Detection System* (GE Healthcare) foi utilizado segundo protocolo dos fabricantes, com algumas modificações: a hibridização foi feita a 55°C, *overnight*, e o tempo de exposição variou de 1 a 24 horas. Os alvos moleculares usados como sondas neste ensaio foram os mesmos usados na PCR para *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. em material arqueológico: *Ascaris* sp. (*cytb*, 142 pb; *cox1*, 200 pb; *nad1*, 150 pb) e *Trichuris* sp. (18S, 120 pb).

O esquema de aplicação das amostras foi feito em 3 membranas, assim como dos controles (Figuras 9, 10 e 11A-B).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	47		48		259		266		Al c+		Tt c+	
B		213		283		306		308		319		320
C	22f		24a		05		11		105		107	
D		337		352		353		358		360		1216
E	2080		2082		2083		2088		2091		2094	
F		3A		4A		7A		8A		12B		14B
G	17H		18A		20A		22A		23A		26A	
H		28C		30		32		33C		34A		38

Figura 9: Esquema do DNA aplicado de amostras arqueológicas do Brasil e controles. Alc+: DNA total de *Ascaris lumbricoides* moderno (controle positivo). Ttc+: DNA total de *Trichuris trichiura* moderno (controle positivo). Informações das amostras nas Tabelas 6A e B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	710c		711		714		715		722		724	
B		160		173		176		180		182		HG
C	M51		M128		HM1		HM8		HM7		HM9	
D		389 ovos		1380 ovos		1384 ovos		389 sed.		1380 sed.		1384 sed.

Figura 10: Esquema do DNA aplicado de amostras arqueológicas da América do Sul, Europa e controles. Para detalhes das codificações ver Tabelas 6C e D.

A

	1	2	3	4	5	6
A	<i>Ascaris</i> ovos DNA total		<i>Ascaris</i> Angola DNA total		<i>Trichuris</i> DNA total	
B		Sonda <i>Ascaris</i> ovos		Sonda <i>Ascaris</i> Angola		Humano DNA total

B

	1
A	Sonda <i>Trichuris</i>

Figuras 11A e B: Esquema do DNA total aplicado e sondas dos controles positivos de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* e controles negativos humano nas membranas.

Análises complementares

Amostras de solo do sítio arqueológico Cubatão-I, Joinville-SC, Brasil, foram destinadas a duas análises distintas.

1) Concentração de Amônia (NH₄): duas amostras de solo foram enviadas aos cuidados do Dr. Mauri dos Santos Manhães, do Departamento de Solos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, para pesquisa de granulometria de areia, pH e compostos minerais, dentre eles principalmente, NH₄.

2) Pesquisa de Fungos: duas amostras de solo foram enviadas ao Dr. Jackson Victor Araújo do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Para pesquisa de fungos foi utilizado o método Duddington de espalhamento de solos (Duddington 1955).

3.5 Avaliando o paradoxo *Ascaris sp.* e *Trichuris sp.* no material arqueológico

Inicialmente, dois artigos de revisão de parasitos em material antigo foram usados como norteadores da pesquisa, publicados por Gonçalves et al. (2003) e Bouchet et al. (2003). Foram feitas busca nas bases de dados eletrônicas: *PubMed*, *Isi Web of Science*, *Scopus*, *Ovid*, *Web Wilson* e *Scielo*, assim como busca manual e consulta a especialistas. Todas as referências que preencherem os seguintes critérios de inclusão foram avaliadas: (a) achados de *Ascaris* e/ou *Trichuris* em material antigo e de origem humana; (b) foram considerados materiais antigos achados do início do século XX, século XIX ou anteriores, (c) não foram considerados achados com base em textos históricos, (d) todos os tipos de publicações foram incluídos, como resumos em anais de congressos, cartas, dentre outros, (e) não foram estabelecidos critérios de exclusão com base no idioma e ano de publicação. Nas buscas eletrônicas os seguintes descritores em língua inglesa foram usados: “*Ascaris*”, “*Trichuris*”, “coprolite”, “sediment”, “soil”, “latrine”, “cesspit”, “pit”, “barrel”, “privy”, “remain”, “archaeology”, “archaeoparasitology”, “paleoparasitology”, “paleopathology”, “excavation”, “years ago”, “before present”, “history”, “colonial”, “pre Columbian”, “medieval”, “middle age”, “Iron age”, “Bronze age”, “Roman age”, “period Roman”, “ancient disease”, “ancient parasites”, “burial”, “skeleton” and “mummy”. Os operadores lógicos “AND” e “OR” foram usados para combinação dos descritores e consequente rastreamento das publicações, assim como os símbolos “\$” e “*” para truncar o final das palavras usadas como descritores, a fim de buscar todas as suas derivações. Na avaliação das publicações foram observados os seguintes aspectos: localidade do achado, datação, tipo de material, número de ovos, plantas medicinais vermífugas, esporos de fungos, ovos inférteis, tafonomia e ambiente, dentre outros.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliando a variabilidade intra-indivíduo de *Ascaris* sp.

Vinte e oito seqüências clonadas de *ITS1* foram obtidas dos ovos isolados de *Ascaris* sp. A análise das seqüências mostrou 15 tipos diferentes de seqüências de *ITS1*. Duas correspondiam aos genótipos previamente caracterizados, G1 e G6 (Peng et al. 2003 e Leles et al. 2009a, Anexo I) e 13 novos haplótipos, aqui nomeados H1-H13. O termo haplótipo foi usado para designar diferentes tipos de seqüências de *ITS1* que foram encontradas em amostras únicas. Em cada ovo isolado foram encontrados de 2 a 4 genótipos/haplótipos (Tabela 10).

Tabela 10: Amostras de *Ascaris* sp. do Brasil, localidade, genótipos e haplótipos de *ITS1*.

Amostras	Localidade	Genótipos	Haplótipos
DL01	Rio de Janeiro-RJ, sudeste	G1/G6	-
DL02	Rio de Janeiro-RJ, sudeste	G1/G6	H1
DL04	Rio de Janeiro-RJ, sudeste	G6	H2-4
DL13	Rio de Janeiro-RJ, sudeste	G1	H5-6
DL15	Rio de Janeiro-RJ, sudeste	G1	H7
DL16	Rio de Janeiro-RJ, sudeste	G1	H8-9
DL17	Rio de Janeiro-RJ, sudeste	G6	H10-11
041-1	Santa Isabel do Rio Negro-AM, norte	G6	H12
104-5	Santa Isabel do Rio Negro-AM, norte	G1/G6	H13

Nove das amostras mostraram os polimorfismos característicos dos genótipos G2-G5. O genótipo G1 e/ou G6 foram encontrados em todas as amostras, e cada novo haplótipo em amostras únicas. A presença dos genótipos G1 e G6 em ambas as regiões brasileiras, norte e sudeste, mostrou que há uma relação parasito-hospedeiro entre elas. Embora a maioria dos haplótipos e genótipos encontrados no Brasil não tenham ainda sido

caracterizados em outras regiões do mundo, o fato de se encontrar o genótipo G1, que foi o mais prevalente entre humanos na China e também encontrado em outras partes do mundo como, Bangladesh, Japão, Reino Unido, Austrália, e Dinamarca, mostra não somente uma relação parasito-hospedeiro entre estas regiões como sugere que este genótipo seja amplamente distribuído (Tabela 11).

Para maiores detalhes ver o artigo gerado a partir destes resultados (Leles et al. 2009, Anexo II).

Tabela 11: Genótipos e haplótipos de *ITS1* dos isolados de *Ascaris* sp. do Brasil e do mundo.

Genbank	Genótipos	País	Hospedeiro	*1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Referências	
				2	2	2	2	2	3	3	5	5	5	6	7	8	0	0	0	0	1	2	3	3	3		3
				0	4	7	8	9	0	3	0	5	6	7	3	3	3	5	6	7	8	9	1	3	8	8	
AJ554036	G1	Ba/Br/Ja/Ch	H/P	T	T	T	-	-	G	G	T	A	T	A	G	T	G	C	G	C	T	T	C	T	A	T	Peng et al. 2003 Leles et al. 2009 Ishiwata et al. 2004
AJ554037	G2	Ch	H/P	.	.	.	T	.	.	S	Peng et al. 2003
AJ55403	G3	Ja/Ch	H/P	.	.	.	T	.	.	C	A	Peng et al. 2003 Ishiwata et al. 2004
AJ554039	G4	Ch	H	R	Peng et al. 2003
AJ554040	G5	Ch	H	S	W	Peng et al. 2003
EF153621	G6	Br	H	-	Leles et al. 2009
AJ000895	Al	Au	H	S	-	-	Zhu et al. 1999
AJ000896	As	RU/Di	P	.	.	.	T	T	.	C	S	-	-	A	Zhu et al. 1999
GQ339794	H1	Br	H	.	-	A	Este estudo
EU635686	H2	Br	H	.	.	-	C	T	.	.	.	Este estudo
EU635687	H3	Br	H	A	Este estudo
EU635688	H4	Br	H	.	.	-	C	Este estudo
GQ339795	H5	Br	H	-	G	Este estudo
GQ339796	H6	Br	H	C	Este estudo
GQ339797	H7	Br	H	-	C	.	.	.	Este estudo
GQ339798	H8	Br	H	C	C	.	Este estudo
GQ339799	H9	Br	H	.	-	C	Este estudo
EU635694	H10	Br	H	.	.	-	G	.	Este estudo
EU635695	H11	Br	H	.	.	-	.	T	.	.	G	C	T	.	.	Este estudo
GQ339800	H12	Br	H	-	A	.	.	C	Este estudo
GQ339801	H13	Br	H	.	C	Este estudo

* Os números correspondem à posição nucleotídica dos sítios polimórficos na sequência de referência AJ554036 (Peng et al. 2003). H: humano, P: porco, Al: *Ascaris lumbricoides* (sem nomenclatura), As: *Ascaris suum* (sem nomenclatura), Ba: Bangladesh, Br: Brasil, Ch: China, Au: Austrália, RU: Reino Unido, Di: Dinamarca, Ja: Japão. S: nucleotídeo G ou C, R: nucleotídeo A ou G, W: nucleotídeo A ou T. -: deleção nucleotídica, pontos: similaridade com a sequência de referência G1.

4.2 Caracterização dos genes mitocondriais *nad1* e *cox1* de *Ascaris* sp. do Brasil

A análise das sequências mostrou cinco diferentes haplótipos do gene *cox1*. Dois deles correspondem aos haplótipos previamente caracterizados na China, H9/P9 e P3, os quais foram encontrados em humano/suíno e suíno, respectivamente. Neste estudo, o haplótipo P3 também foi encontrado em humanos e por isto foi nomeado H14, desta maneira, H14=P3. Os outros três haplótipos do gene *cox1* são novos e denominados H11-H13 (Tabela 12A e 12B).

Tabela 12A: Amostras, hospedeiros, localidade e haplótipos do gene *cox1* de *Ascaris* sp.

Haplótipo (n)	Hospedeiro	*Amostras	País	Números de acesso
H1-H8	Humano	NA	China	AJ968324-31
*H9=P9 (9)	Humano, Primata não humano e suíno	010.7; 041.1; 043.4; 071.6; 082.5; 104.5; 128.5; 128.8; 152.1	China Brasil	AJ968332 AJ968342 EU628688 *GU326952
H10	Humano	NA	China	AJ968333
*H11	Humano	SI11	Brasil	* GU326953
*H12	Humano	SI15	Brasil	* GU326954
*H13	Humano	104.2	Brasil	* GU326955
*H14=P3 (37)	Humano e suíno	HAn; DL01-06; DL12-17; DL22; SI12; SI24; 010.7; 033.5; 040.4; 043.4; 061.10; 062.1; 082,5; 103.4; 104.1; 113.4; 115.2; 126.5-6; 128.3; 128.5-6, 8; 152.1; 163.6; 164.1; PMG4	China Angola Brasil	AJ968336 *GU326948 * GU326949 * GU326950 * GU326951
P1	Suíno	NA	China	AJ968334 X54253
P2	Suíno	NA	China	AJ968335
P4	Suíno e Primata não humano	NA	China	AJ968337 EU628687
P5-P10	Suíno	NA	China	AJ968338-43
PJp	Suíno	NA	Japão	AB125698

*Haplótipos, amostras, e números de acesso deste estudo. NA: não avaliado.

Tabela 12B: Haplótipos e polimorfismos definidos para o gene *cox1* de *Ascaris* sp. do Brasil comparado aos disponíveis no GenBank.

Haplótipos	Posição nucleotídica no alinhamento																												
	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	
	1	3	4	6	7	0	1	3	3	6	8	8	9	0	1	4	4	4	5	6	6	7	8	8	3	3	5	5	7
H1	G	G	C	T	G	G	G	A	T	T	T	T	G	T	T	T	C	T	A	G	G	A	G	A	C	G	T	G	T
H2	.	.	.	C	.	.	A	.	.	C	C	C	A	.	.	A
H3	.	.	.	C	.	.	A	.	.	C	.	C	A	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.
H4	A	A	G	A	.	.	A	A	.
H5	A	.	.	C	C	.	C	.	A
H6	A	.	.	C	A
H7	A	.	T	.	.	A	.	.	C	A	A	G	A	.	.	A	.	.	.
H8	A	.	T	.	.	A	T	.	.	A	A	G	A	.	.	A	.	.
H9=P9	A	.	T	.	.	A	A	A	G	A	.	.	A	.	.	.
H10	A	A	.	.	A
P1	A	.	.	C	A	.	.	A
P2	A	G	.	C	A	.	.	A
P3=H14	.	.	.	C	.	.	A	.	.	C	.	C	A	.	.	A
P4	A	.	T	.	.	A	C	A	A	G	A	.	.	A	.	.	.
P5	A	A	T	.	.	A	A	A	G	A	.	.	A	.	.	.
P6	A	.	T	.	.	A	C	A	A	G	A	.	.	A	.	.	.
P7	A	.	T	.	.	A	.	G	A	A	G	A	.	.	A	.	.	.
P8	A	.	T	.	T	A	A	A	G	A	.	.	A	.	.	.
P10	A	.	T	.	.	A	A	A	G	A	G	.	A	.	.	.
PJp	A	A	T	.	.	A	A	A	.	A	.	T
H11	A	.	T	.	.	A	G	A	A	G	A
H12	.	.	.	C	.	.	A	.	.	C	.	C	.	C	A	.	.	A
H13	A	.	T	.	.	A	.	.	.	C	.	C	A	.	.	A

O haplótipo H9=P9 foi encontrado em 9/34 (26%) das amostras da Amazônia e foi identificado somente nesta região. O haplótipo H14=P3 foi o mais prevalente no Brasil, encontrado em 22/34 (65%) das amostras da região amazônica e em todas as amostras de origem humana da região sudeste, incluindo a amostra suína de Minas Gerais. A amostra humana controle da Angola também apresentou o haplótipo H14=P3 (Tabela 12A e C).

Tabela 12C: Prevalências dos haplótipos do gene *cox1* de *Ascaris* sp. de hospedeiros humanos (H) e suínos “porcos” (P).

Haplótipos	China (%)	*Brasil		
		Norte (%)	Sudeste (%)	Total (%)
H1	6 (1.5)	0	0	0
H2	1 (0.3)	0	0	0
H3	14 (3.6)	0	0	0
H4	4 (1)	0	0	0
H5	15 (3.8)	0	0	0
H6	13 (3.3)	0	0	0
H7	4 (1)	0	0	0
H8	2 (0.5)	0	0	0
*H9=P9	325 (82,9)/ 4 (1,2)	9 (26)	0	9 (18,7)
H10	2	0	0	0
Subtotais	392	NA	NA	NA
*H11	0	1 (3)	0	1 (2,1)
*H12	0	1 (3)	0	1 (2,1)
*H13	0	1 (3)	0	1 (2,1)
*H14=P3	54 (16,3)	22 (65)	14 (100)	36 (75)
P1	82 (24,8)	0	0	0
P2	4 (1,2)	0	0	0
P4	8 (2,4)	0	0	0
P5	4 (1,2)	0	0	0
P6	4 (1,2)	0	0	0
P7	124 (37,5)	0	0	0
P8	46 (14)	0	0	0
P10	1 (0,3)	0	0	0
Subtotais/total	331	34	14	48

*: Haplótipos encontrados no Brasil. NA: Não avaliado.

Para o gene *nad1* foram caracterizados cinco novos haplótipos humanos (H12-H16) e um novo haplótipo suíno (P16). Um haplótipo encontrado em suíno, aqui nomeado P17, se mostrou idêntico ao haplótipo humano H12, assim designado H12=P17 (Tabela 13A e B).

Tabela 13A: Amostras, hospedeiros, localidade e haplótipos do gene *nad1* de *Ascaris* sp.

Haplótipos (n)	Hospedeiro	*Amostras	País	Números de acesso
H1-H11	Humano	NA	China	AJ968344-54
*H12=P17 (33)	Humano e Suíno	DL01-02; DL05-06; DL13-17; 010.7; 040.4; 043.4; 061.10; 062.1; 071.6; 082.5; 104.1, 4-5; 113.4; 115.2; 126.5-6; 128.3, 5-6, 8; 152.1; 157.15; 163.6; 164.1; HAn; PES1	Brasil	*GU326956 *GU326957 *GU326958 *GU326959
*H13 (3)	Humano	040.1; 041-1; 082-5	Brasil	*GU326960
*H14 (1)	Humano	103.4	Brasil	*GU326961
*H15 (1)	Humano	115.2c2	Brasil	*GU326962
*H16 (1)	Humano	DL04	Brasil	*GU326963
P1-P3, P4/P7, P5-P6, P8-P15	Suíno	NA	China	AJ968355-69
*P16 (1)	Suíno	PRJ1	Brasil	*GU326964
P	Suíno	NA	NA	X54253

*: Haplótipos, amostras e números de acesso deste estudo. NA: Não avaliado.

O haplótipo *nad1* H12=P17 foi o mais prevalente, encontrado em 22/27 (81,5%) das amostras da Amazônia e em 11/13 (81,6%) amostras da região sudeste o que inclui todas as amostras do Rio de Janeiro e a amostra suína do Espírito Santo. O haplótipo H12=P17 foi também presente na amostra humana de Angola. Os haplótipos de *nad1* H13, H14 e H15 foram encontrados em 3/27 (11%), 1/27 (3,75%) e 1/27 (3,75%) das amostras da Amazônia, respectivamente. O haplótipo H16 e P16 foram encontrados em uma amostra humana e outra suína do Rio de Janeiro, respectivamente (Tabela 13A e C).

Tabela 13B: Haplótipos e polimorfismos definidos para o gene *nad1* de *Ascaris* sp. do Brasil comparado aos disponíveis no GenBank.

Haplótipos	Posição nucleotídica no alinhamento																																					
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3		
	0	0	1	1	2	4	5	5	8	8	8	8	9	0	1	1	2	2	3	3	6	1	1	3	4	5	5	6	7	7	8	0	2	2	3	4		
H1	T	C	A	T	C	T	G	C	A	A	G	G	C	T	C	A	T	A	T	T	A	C	T	G	A	G	T	T	T	T	A	G	C	A	T	A		
H2	.	.	.	C	G	T	G	.	G		
H3	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	.	.	.	C	C	G	A	A	T	.	G	G			
H4	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	.	G	.	.	C	.	.	T	.	.	G	A	A	C	T	.	G	.		
H5	.	T	.	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	.	.	.	G	.	C	G	A	A	T	.	G	.		
H6	T	C	G	T	G	.	G		
H7	G	T	G	.	.	
H8	T	G	T	G	.	G	
H9	C	G	C	T	.	.	
H10	.	T	.	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	C	C	A	G	A	A	T	.	G	.
H11	G	G	T	.	.	G
P1	.	.	G	G	T	G	.	G	
P2	.	T	G	T	G	.	G
P3	C	.	T	.	.	A	.	.	C	G	A	A	T	G	G	G	
P4=P7	A	G	G	.	T	G	.	G	
P5	T	C	.	T	.	.	A	C	G	A	A	T	G	G	G	
P6	G	T	G	.	G
P8	.	.	.	C	T	C	G	T	G	.	G	
P9	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	.	G	.	.	.	C	G	A	A	T	G	G	G	
P10	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	C	C	G	A	A	T	G	G	G	
P11	.	T	.	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	.	G	.	.	C	.	.	T	.	.	G	A	A	C	T	G	G	G	
P12	T	C	.	T	.	.	A	.	.	C	C	G	A	A	T	G	G	G	
P13	.	T	G	.	.	.	A	C	G	.	.	.	G	A	T	G	.	G		
P14	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	.	G	.	.	C	G	A	A	C	T	G	G	G	
P15	.	.	G	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	C	C	G	A	A	.	.	C	.	.	.	T	G	G	G	
P	.	.	G	.	T	C	.	T	.	.	A	.	.	C	G	A	A	T	G	G	G	

Haplótipos	Posição nucleotídica no alinhamento																																						
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3				
	0	0	1	1	2	4	5	5	8	8	8	8	9	0	1	1	2	2	3	3	6	1	1	3	4	5	5	6	7	7	8	0	2	2	3	4			
H13	.	.	G	.	T	T	G	G	G
H14	.	.	G	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	C	C	G	A	A	.	C	T	G	G	G	
H15	.	.	G	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	T	C	C	G	A	A	T	G	G	G
H16	.	T	G	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	C	C	G	A	A	T	G	G	.	
H12=P17	.	.	G	.	T	.	.	T	.	.	A	.	.	C	C	C	G	A	A	T	G	G	G	
P16	.	.	G	.	T	.	.	T	.	G	A	.	.	C	C	C	.	.	C	.	G	A	A	T	G	G	G	

Tabela 13C: Prevalências de haplótipos do gene *nad1* de *Ascaris* sp. de hospedeiros humanos (H) e suínos (P).

Haplótipos	China (%)	Brasil		
		Norte (%)	Sudeste (%)	Brasil (%)
H1	2 (0,4)	0	0	0
H2	6 (1,3)	0	0	0
H3	46 (10)	0	0	0
H4	1 (0,2)	0	0	0
H5	9 (2)	0	0	0
H6	1 (0,2)	0	0	0
H7	10 (2,2)	0	0	0
H8	2 (0,4)	0	0	0
H9	371 (81,2)	0	0	0
H10	3 (0,7)	0	0	0
H11	6 (1,3)	0	0	0
*H12=P17	0	22 (81,5)	11 (84,6)	33 (82,5)
*H13	0	3 (11)	0	3 (7,5)
*H14	0	1 (3,75)	0	1 (2,5)
*H15	0	1 (3,75)	0	1 (2,5)
*H16	0	0	1 (7,7)	1 (2,5)
Subtotais	457	NA	NA	NA
P1	165 (58,7)	0	0	0
P2	4 (1,4)	0	0	0
P3	6 (2,1)	0	0	0
P4/P7	20 (7,1)	0	0	0
P5	45 (15,3)	0	0	0
P6	1 (0,4)	0	0	0
P8	1 (0,4)	0	0	0
P9	7 (2,5)	0	0	0
P10	18 (6,4)	0	0	0
P11	3 (1,1)	0	0	0
P12	1 (0,4)	0	0	0
P13	6 (2,1)	0	0	0
P14	2 (0,7)	0	0	0
P15	3 (1,1)	0	0	0
*P16	0	0	1 (7,7)	1 (2,5)
Subtotais/total	281	27	13	40

*: Haplótipos encontrados no Brasil. NA: Não avaliado.

A análise genética do gene *cox1* mostrou uma árvore com dois grupos principalmente (A e B) (Figura 12). A maioria das amostras do grupo A, com alto valor de *bootstrap* (81%), é constituído por haplótipos suínos da China (P4-P10) e um do Japão. Há quatro haplótipos humanos, incluindo os mais prevalentes na China para ambos os hospedeiros humanos, e suínos, H9 e P7, respectivamente. O haplótipo H9=P9, segundo mais prevalente no Brasil, está neste grupo, assim como os haplótipos H11 e H13, todos da região norte do país. No grupo B, 7 haplótipos humanos (H1-H6, H10) e somente 3 haplótipos suínos (P1-P3) da China foram observados. Interessantemente, neste grupo está situado o haplótipo mais prevalente no Brasil (P3), anteriormente encontrado somente em suínos na China e aqui encontrado tanto em humanos quanto suínos (P3=H14). Um novo haplótipo brasileiro H12 também foi identificado neste mesmo subgrupo, com alto valor de *bootstrap* (86%) (Figura 12).

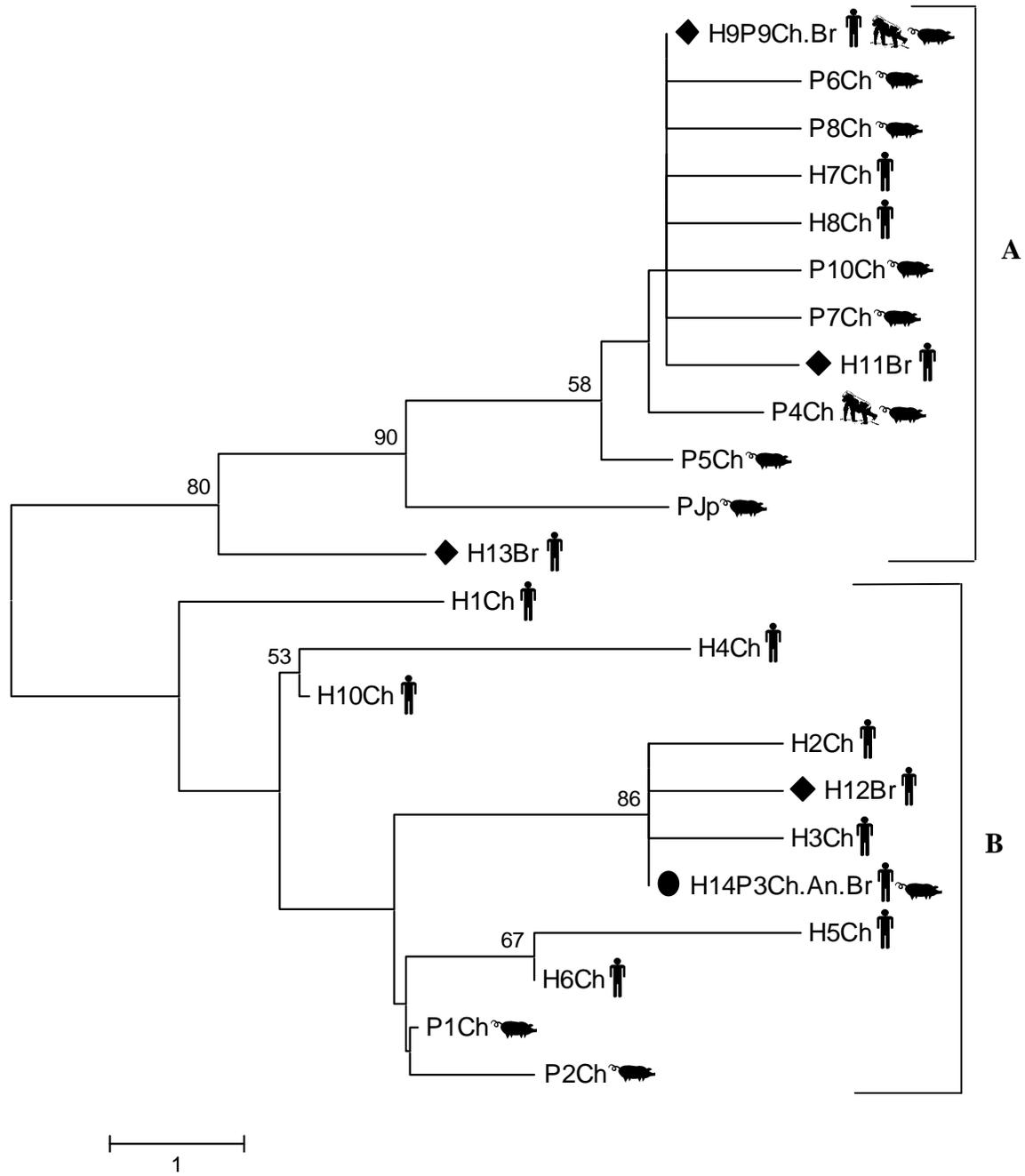


Figura 12: Árvore *Neighbor-Joining* (NJ) inferida para o gene *cox1* (384 pb) de *Ascaris* spp. Suportada por *bootstrap* de 1000 réplicas. Somente valores $\geq 50\%$ são mostrados. Ch: China, Jp: Japão, Br: Brasil e An: Angola. Círculo preto: haplótipos encontrados nas regiões norte e sudeste do Brasil. Losango preto: haplótipos encontrados somente na região norte do Brasil.

A árvore NJ, baseada no gene *nad1* de *Ascaris* sp., também mostrou dois grupos principais (A e B) e os subgrupos segundo hospedeiro ficaram mais evidentes (Figura 13). No grupo A (91% *bootstrap*), há 8 haplótipos suínos (P3, P5, P9-12, P14-15) e somente 4 haplótipos humanos da China (H3-5, H10). Curiosamente, todos, exceto um haplótipo do Brasil, estão estruturados neste subgrupo. Este interessante subgrupo revelou o haplótipo humano mais frequente no Brasil (H12), que também foi encontrado em um suíno, por isso nomeado H12=P17. O novo haplótipo suíno de *nad1* (P16) pertence ao grupo de haplótipos humanos de *Ascaris* sp. de ambas as regiões do Brasil, norte e sudeste. No grupo B, 7 haplótipos humanos (H1-2, 6-9, 11) e 7 haplótipos suínos (P1-2, 4, 6-8, 13) da China estão presentes, incluindo os mais prevalentes para hospedeiros humanos e suínos, H9 e P1, respectivamente. Somente o haplótipo humano H13 do Amazonas ficou situado neste grupo (Figura 13).

Estes resultados estão reunidos no artigo resultante desta etapa da pesquisa (Leles et al. 2010b, Anexo III).

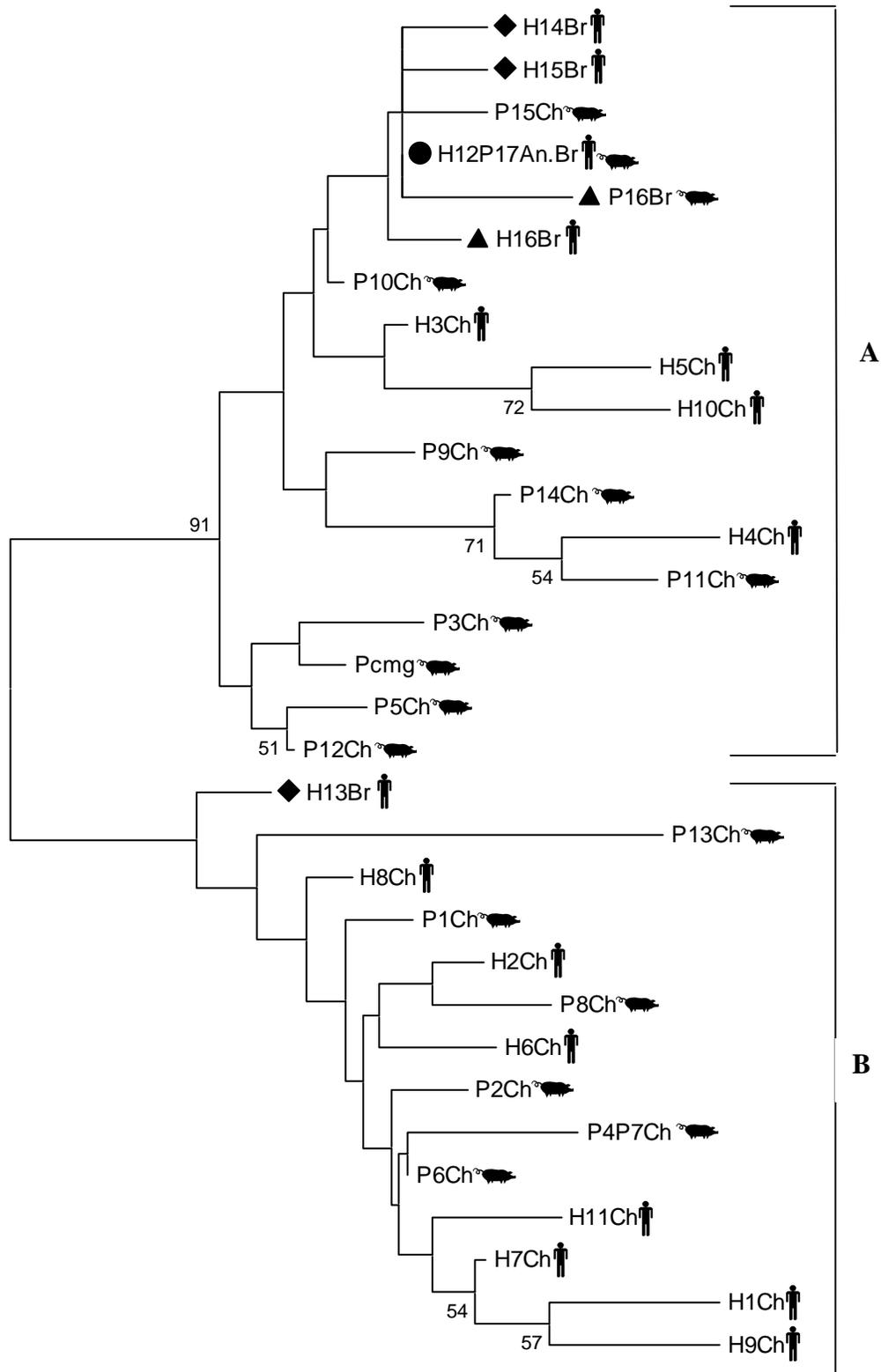


Figura 13: Árvore *Neighbor-Joining* (NJ) inferida para o gene *nad1* (357 pb) de *Ascaris* spp. Suportada por *bootstrap* de 1000 réplicas. Somente valores $\geq 50\%$ são mostrados. Ch: China, Br: Brasil e An: Angola. Círculo preto: haplótipos encontrados nas regiões norte e sudeste do Brasil. Losango preto: haplótipos encontrados somente na região norte do Brasil. Triângulo preto: haplótipos encontrados somente na região sudeste do Brasil.

3.3 Diagnóstico molecular de *Trichuris* sp.

Tanto os oligonucleotídeos universais para nematóides, quanto os desenhados especificamente para *T. trichiura* por Cutillas et al. (2009) para a região nuclear *ITS* não amplificaram as amostras brasileiras. Comparando-se as sequências nucleotídicas de *T. trichiura* com as demais espécies do gênero, observou-se que somente *T. suis* apresenta alguma similaridade nas regiões *ITS1* e *ITS2* com *T. trichiura* (Tabela 14).

Tabela 14: Similaridade entre as sequências de *ITS* de *Trichuris* sp. disponíveis no Genbank.

Parasito	Número de acesso no Genbank	Similaridade (%)		
		<i>ITS1</i>	<i>5.8S</i>	<i>ITS2</i>
<i>T. trichiura</i>	FM991955-56	-	-	-
<i>T. suis</i>	AJ249966, AJ249968	87%	ND	81%
<i>T. vulpis</i>	AM234616	NS	96%	NS
<i>T. ovis</i>	AY439019, AJ310662, AJ238220	NS	94%	NS
<i>T. skrjabine</i>	AJ489248	NS	96%	NS
<i>T. discolor</i>	AB367794-95	NS	96%	NS
<i>T. leporis</i>	AJ310663, AJ251321	NS	ND	NS
<i>T. arvicolae</i>	EU346760, EU276015, AJ310664	NS	ND	NS
<i>T. muris</i>	FM955259-69, EU276016-17, AJ299407	NS	95%	NS

Legenda. ND: não disponível, NS: não significativa.

Já os oligonucleotídeos desenhados neste estudo para o gene 18S rDNA amplificaram os segmentos esperados 409 e 496 pb, usando-se as combinações de oligonucleotídeos TT096F/TT1334R e TT1214/1709R, respectivamente, quando foram usados ovos isolados (Figura 14).



Figura 14. Resultado da PCR para o gene 18S rRNA de *Trichuris trichiura*. Pistas 1-4: amostras de ovos isolados de *Trichuris trichiura*, Pistas 1 e 2 fragmento de 409 pb, Pista 3 amplificação inespecífica, Pista 4 fragmento de 496 pb. Pistas 5-6: controles negativos. Pista 7: marcador 100 pb (Invitrogen).

A análise da sequência consenso do gene 18S rDNA de *T. trichiura* do Brasil mostrou cinco substituições comparada à sequência disponível no GenBank (número de acesso DQ118536) (Tabela 15).

Tabela 15: Polimorfismos de sequência de isolado de *T. trichiura* do Brasil e a depositada no GenBank.

Amostra	Posição da substituição nucleotídica no alinhamento					
	1	1	1	1	1	1
	2	2	2	2	3	3
	2	2	7	8	1	5
	5	6	0	9	4	2
DQ118536	G	A	A	A	T	-
<i>T. trichiura</i> RJ	T	G	G	G	A	C

3.4 Diagnóstico molecular de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. em material arqueológico

Ascaris sp.

As três amostras arqueológicas positivas para *Ascaris* sp., usadas como controles positivos, amplificaram para pelo menos um dos alvos moleculares. A amostra 1380 amplificou dois alvos moleculares (*cytb* e *nad1*) e as amostras 1384 e 389 amplificaram o alvo *cytb*. Oito dos 11 sítios arqueológicos sul americanos avaliados foram positivos para, pelo menos, uma das amostras analisadas e um dos alvos moleculares usados (Tabela 16).

Tabela 16: Diagnóstico paleoparasitológico molecular de *Ascaris* sp.

Sítios arqueológicos	Amostras	Alvos			Total
		<i>cytb</i>	<i>nad1</i>	<i>cox1</i>	
Sítio do Meio-PI, Brasil	A1216	+	+	+	3
Pedra Furada, Brasil	A358	-	+	-	1
Boqueirão Soberbo-MG, Brasil	A320	-	+	-	1
	A319	-	-	+	1
Lapa Pequena-MG, Brasil	A47	+	-	-	1
	A48	-	+	-	1
Gruta do Gentio II-MG, Brasil	A22	+	-	-	1
	A24a	+	-	-	1
	A105	-	+	-	1
Cubatão-SC, Brasil	A2083	-	-	+	1
Tulán, Chile	A714	+	+	-	2
Nombre de Jesus, Argentina	M51	-	+	-	1
	M128	-	+	-	1
Subtotal 8	13	5	8	3	16
Lübeck, Alemanha	A389	+	-	-	1
Walraversijde, Bélgica	A1380	+	+	-	2
Walraversijde, Bélgica	A1384	+	-	-	1
Total 11	12	8	9	3	20

Haplótipos foram definidos pela análise tanto das sequências obtidas do sequenciamento direto quanto da análise de clones. Os haplótipos foram nomeados e definidos com base no trabalho de Peng et al. (2005) para os genes *nad1* e *cox1* de *Ascaris* sp. em amostras modernas. A análise das sequências definiu, tanto para as amostras do continente sul

americano quanto europeu, dez haplótipos do gene *nad1*. Nove constituem novos haplótipos e um foi previamente encontrado em amostras modernas (Tabela 17A). Já para o gene *cox1* a amostra 1216 correspondia a *Ascaris* sp. e foi definido um novo haplótipo; contudo, as amostras 319 e 2083 geraram fragmentos inespecíficos (Tabela 17B). A amostra 319 apresentou 86% e 93% de similaridade na sequência nucleotídica e protéica, respectivamente, com haplótipos de *Ascaris* sp. Já a amostra 2083 apresentou 96% de similaridade na sequência nucleotídica com *Pelioiditis marina* e 98% de similaridade na sequência proteica com o nematódeo de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Para o gene *cytb* foram definidos quatro haplótipos, um identificado em amostras modernas (Tabela 17C).

Tabela 17A: Haplótipos do gene *nad1* de *Ascaris* sp. definidos para o material arqueológico.

Haplótipos (n)	Sítio/País	Amostras	Posição nucleotídica*								
			2	2	2	2	2	2	3	3	
			9	9	9	9	9	9	9	0	0
			2	3	3	6	6	7	8	0	0
			5	3	9	4	5	9	0	3	4
H3/H10/H12/P10/P15/P17 - moderno	China e Brasil	NA	T	T	T	T	T	T	T	T	T
EUBe-01 (1)	Walraversijde/Bélgica	A1380c7	.	.	.	-	-	.	.	.	-
EUBe-01 (1)	Walraversijde/Bélgica	A1380c6	.	C	.	.	-	C	.	.	-
SACH-01 (1)	Tulán/Chile	A714c17	-	.	C	.	-
SAAr-01 (2)	Nombre de Jesus/Argentina	M51c3-4	-	-
SAAr-02 (1)	Nombre de Jesus/Argentina	M128c5	.	.	-	-
SAAr-03 (1)	Nombre de Jesus/Argentina	M128c10	-
**SAAr-04 (3)	Nombre de Jesus/Argentina	M51c1, 2 e 5
SABr-01 (2)	Gruta do Gentio II- MG/Brasil Boqueirão Soberbo- MG/Brasil	A105c4 A320	-	.	.	.	-	.	.	.	-
SABr-02 (2)	Sítio do Meio-PI/Brasil Pedra Furada-PI/Brasil	A1216c2 A358	-	.	.	-	-
EUSA-01 (7)	Walraversijde/Bélgica Tulán/Chile Sítio do Meio-PI/Brasil Lapa Pequena-MG/Brasil	A1380c3,8 e 10 A714c7 e 16 A1216c5 A48	-	.	.	.	-
Total 10											

(*): Posição no genoma completo de *A. suum* (X54253). (**): haplótipo também encontrado em material moderno. (.): similaridade com a sequência de referência H3 (Peng et al. 2003). (-): deleção. NA: não avaliado.

Tabela 17B: Haplótipos do gene *cox1* de *Ascaris* sp. definidos para o material arqueológico.

Haplótipos	Sítio/País	Amostras	Posição nucleotídica*		
			9	9	9
			7	7	8
			0	8	0
			9	3	8
H1-moderno	China	NA	T	G	G
SABr-01	Sítio do Meio/Brasil	A1216	C	A	A

(*): Posição no genoma completo de *A. suum* (X54253).

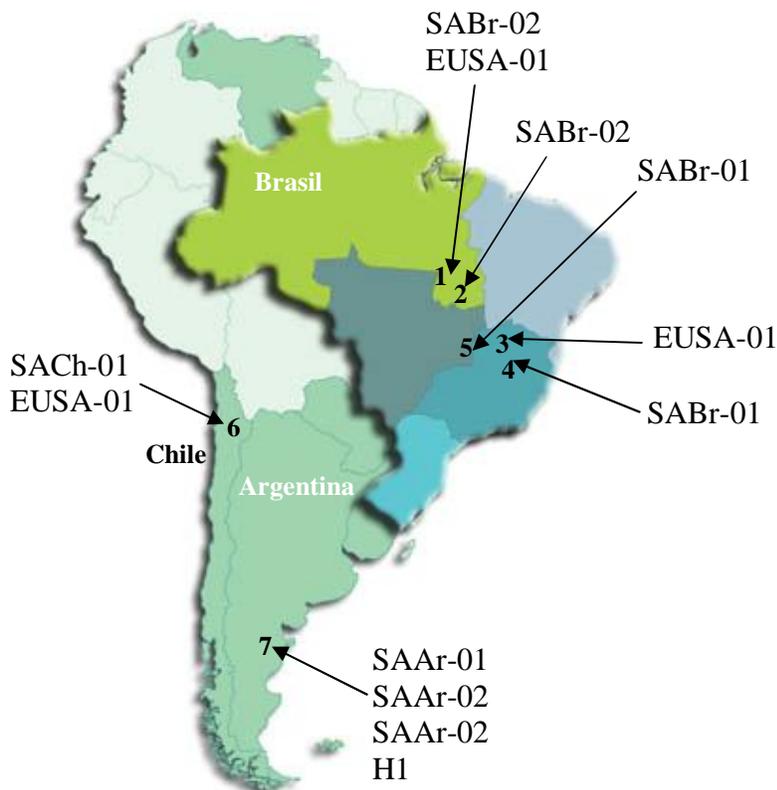
Tabela 17C: Haplótipos do gene *cytb* de *Ascaris* sp. definidos para o material arqueológico.

Haplótipos	Sítio/País	Amostras	Posição nucleotídica*						
			5	5	5	5	5	5	5
			4	4	5	5	5	5	5
			8	9	2	3	5	5	6
			9	2	2	1	4	5	2
ND/ <i>A. suum</i> -moderno	ND	X54253	A	T	C	G	C	T	G
ND/ <i>A. lumbricoides</i> -Moderno	Brasil	Leles et al.. 2008	.	.	T
ND/ <i>Ascaris</i> sp antigo	Namur/Bélgica	Loreille et al.. 2001	G	.	.	A	.	.	.
EUSA-01**	Lübeck/Alemanha Waralversijde/Bélgica Lapa Pequena-MG/Brasil	A389 ovos c2 A1380 ovos e c3 A1380s c1-3 A47c2	.	.	T
EUSA-02	Waralversijde/Bélgica Gruta do Gentio II-MG/Brasil Sítio do Meio-PI/Brasil Boqueirão Soberbo-MG/Brasil	A1384 ovos c1 A22f c1 A1216s c2 A320	.	.	T	.	G	.	.
EUSA-03	Lübeck/Alemanha Lapa Pequena-MG/Brasil Tulán/Chile	A389 ovos c1 A47c1 A714c1	.	C	T
EUGe-01	Lübeck/Alemanha	A389s c1	.	.	T	.	G	.	A
EUBe-01	Waralversijde/Bélgica	A1380 ovos c2	.	.	T	.	A	C	.
Total	5								

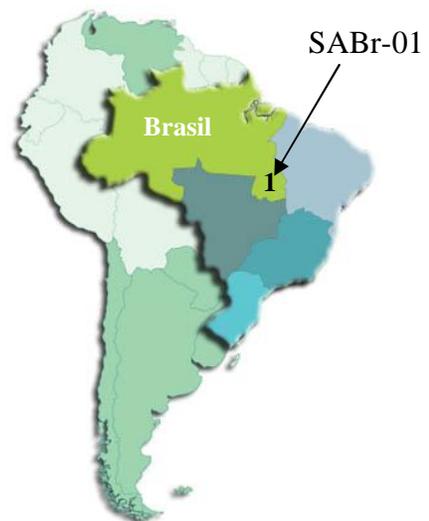
(*): Posição no genoma completo de *A. suum* (X54253). (**): haplótipo também encontrado em material moderno. (.): similaridade com a sequência de referência. (-): deleção. ND: não determinado.

Com os resultados da análise genética foi possível construir um novo mapa da paleodistribuição de *Ascaris* sp. na América do Sul (Figura 15).

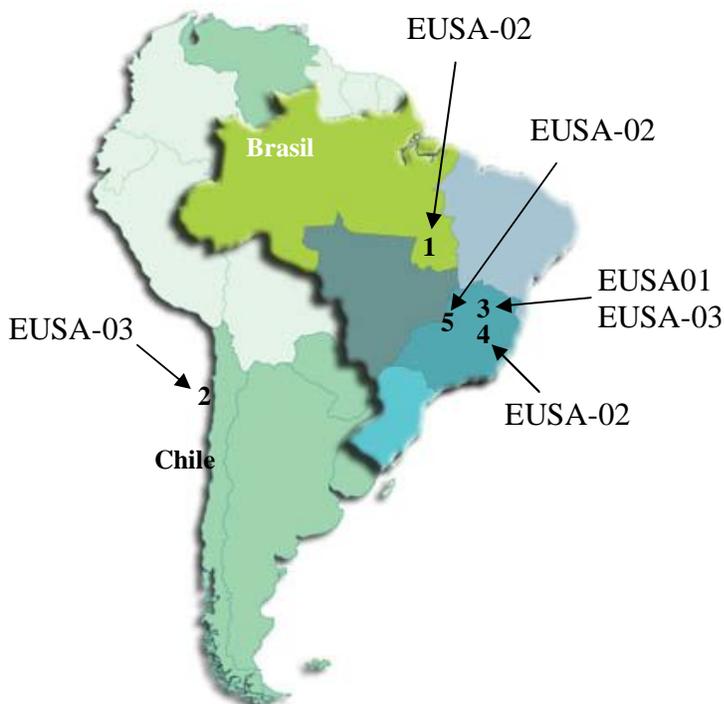
Gene *nad1*



Gene *cox1*



Gene *cytb*



Sítios arqueológicos (datações AP):

1. Meio (8800-13900)
2. Pedra Furada (7250-8530)
3. Lapa Pequena (7000-8000)
4. Boqueirão Soberbo (1265-4990)
5. Gruta do Gentio II (360-3610)
6. Tulán (3030-2900)
7. Nombre de Jesús (500)

Figura 15: Distribuição dos haplótipos dos genes *nad1*, *cytb* e *cox1* de *Ascaris* sp. nos sítios arqueológicos da América do Sul.

Hibridação

Três intensidades de sinal foram consideradas: fraco, médio e forte, mas todas consideradas positivas. A ausência de sinal foi considerada como resultado negativo para hibridação.

Ascaris sp.

Vinte e uma amostras dos sítios arqueológicos sul americanos emitiram sinal para hibridação de ácido nucleico com sonda do fragmento do gene *cytb* (Figura 16 A-D, Tabela 18). Para o gene *cox1* 31, amostras dos sítios sul americanos geraram sinal de hibridação positiva, assim como uma amostra de sítio arqueológico europeu usada como controle positivo (Figura 17 A-D, Tabela 18). O gene *nad1* mostrou maior número de hibridações positivas com 35 amostras dos sítios arqueológicos da América do Sul e duas amostras da Espanha (18 A-D, Tabela 18). Os controles positivos de DNA total do parasito alvo e/ou sonda geraram sinal de hibridação (Figura 19A-C). Controles negativos da hibridação de DNA humano e/ou de outro parasito não geraram sinal, para nenhum dos alvos (Figura 19D).

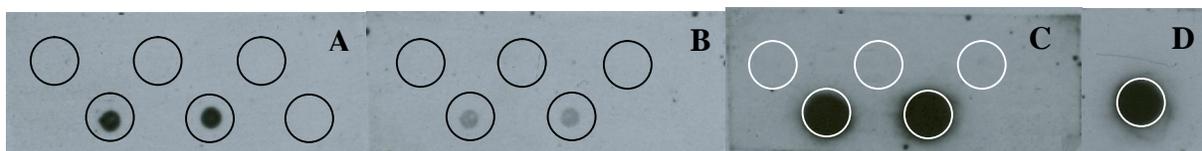


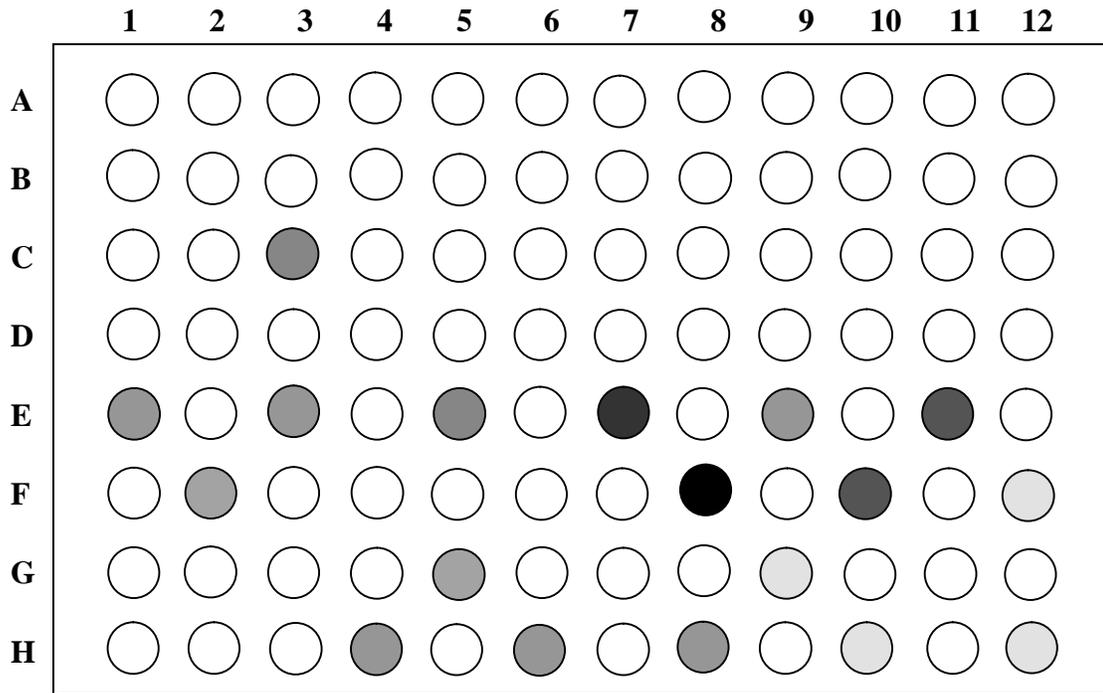
Figura 19. Resultado da Hibridação dos controles positivos e negativos para *Ascaris* sp e *Trichuris* sp. **A:** *cytb*, **B:** *cox1* e **C:** *nad1* para *Ascaris* sp. **D:** 18S para *Trichuris* sp. Esquema da aplicação das amostras (Figuras 11A e B).

Trichuris sp.

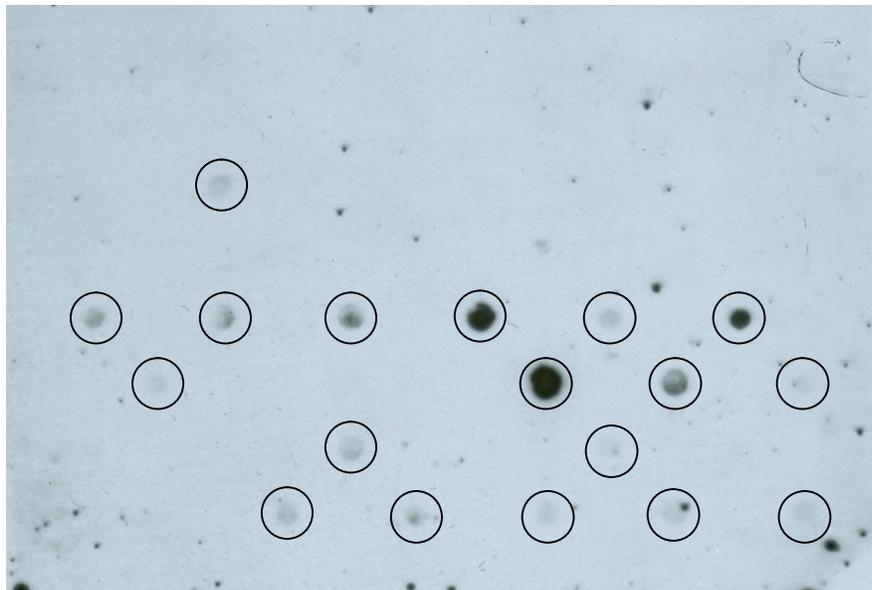
Dezessete amostras dos sítios arqueológicos da América do Sul hibridaram com o fragmento do gene 18S rDNA de *Trichuris* sp. usado como sonda (Figura 20A-D). O controle positivo da sonda gerou o sinal esperado (Figura 19 D, Tabela 18).

Figura 16. Resultado da hibridação com o fragmento do gene *cytb* de *Ascaris* sp. **A e C:** Esquema do resultado da hibridação. **B e D:** Resultado da revelação da hibridação. Intensidade do sinal emitido pela hibridação (cinza claro: fraco, cinza escuro: médio e preto: forte). Amostras aplicadas (Figuras 9 e 10).

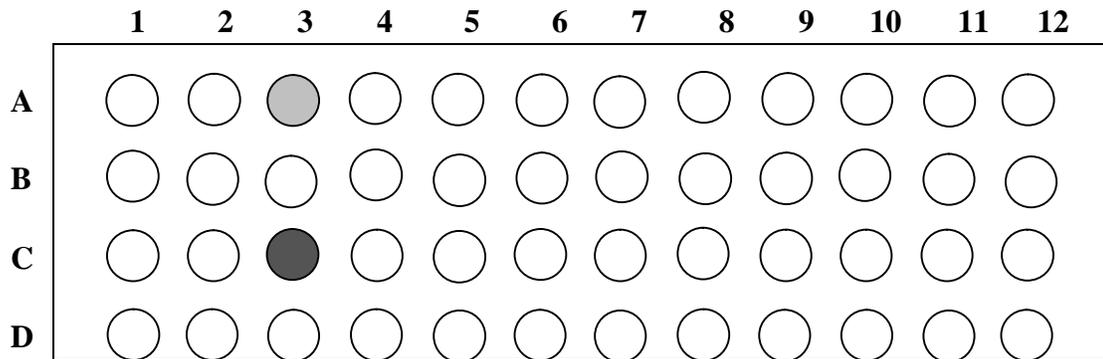
A



B



C

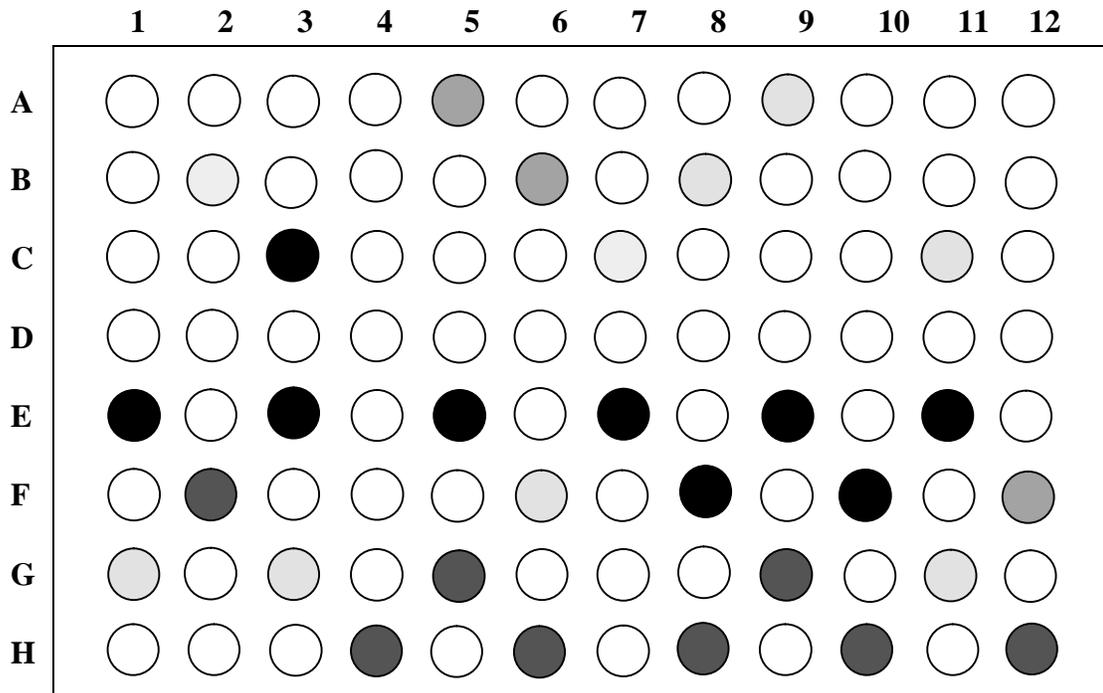


D

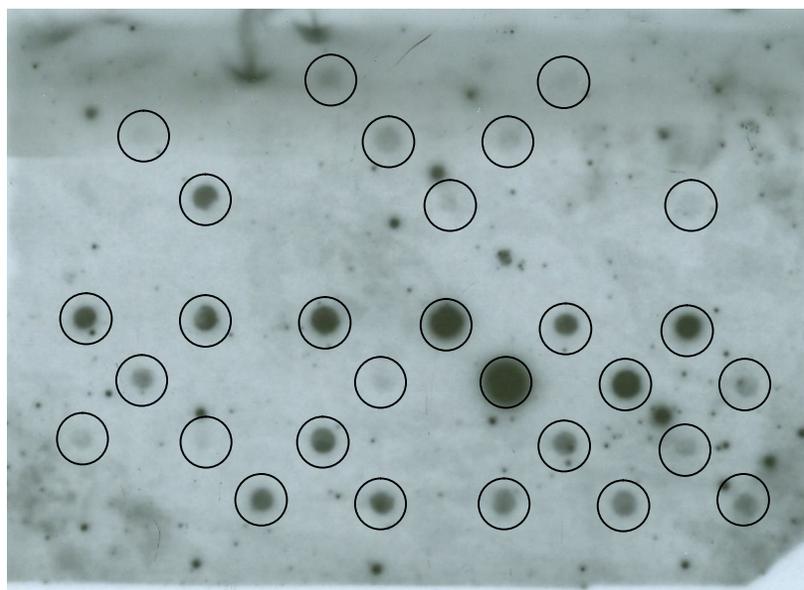


Figura 17. Resultado da hibridação com o fragmento do gene *cox1* de *Ascaris* sp. **A e C:** Esquema do resultado da hibridação. **B e D:** Resultado da revelação da hibridação. Intensidade do sinal emitido pela hibridação (cinza claro: fraco, cinza escuro: médio e preto: forte). Amostras aplicadas (Figuras 9 e 10).

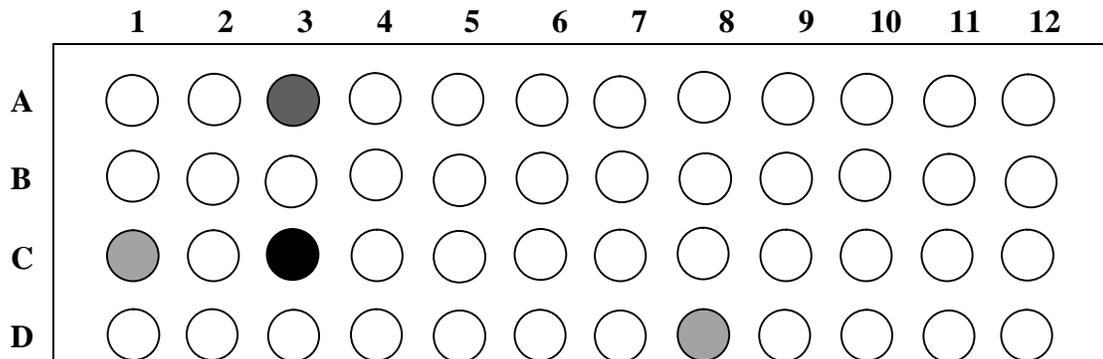
A



B



C



D

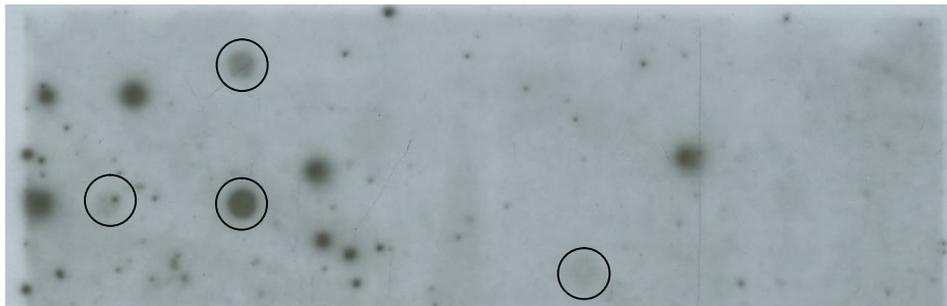
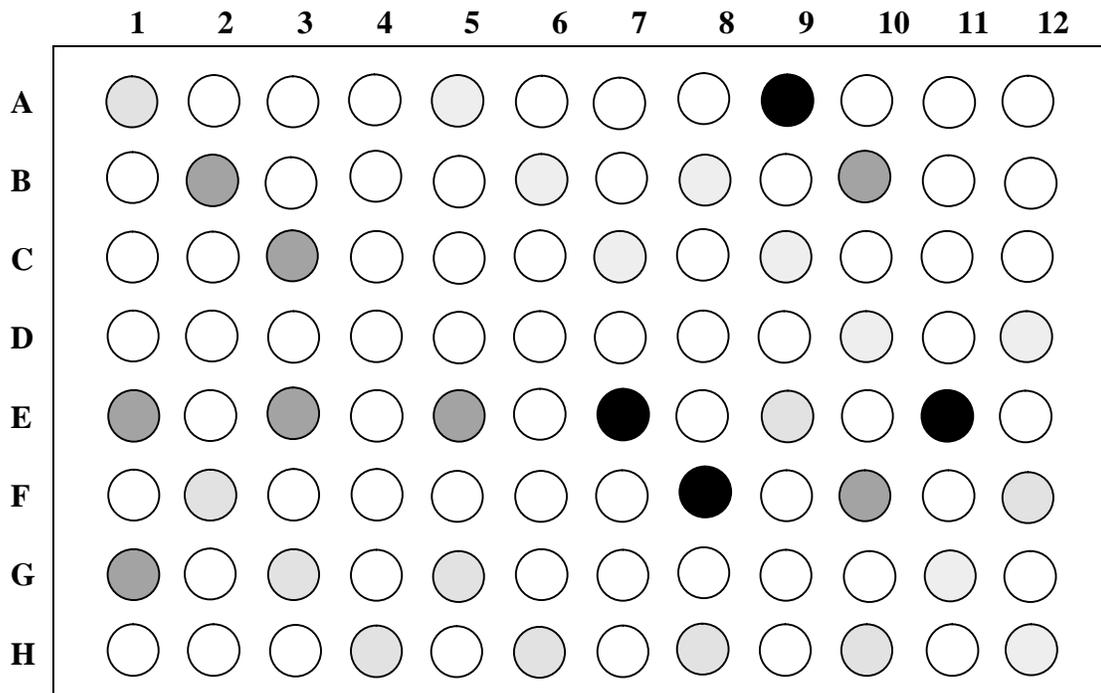
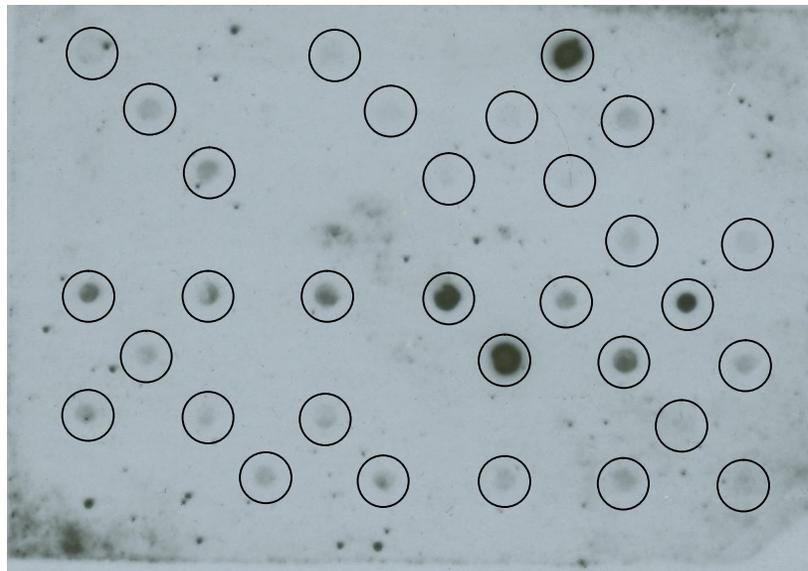


Figura 18. Resultado da hibridação com o fragmento do gene *nad1* de *Ascaris* sp. **A e C:** Esquema do resultado da hibridação. **C e D:** Resultado da revelação da hibridação. Intensidade do sinal emitido pela hibridação (cinza claro: fraco, cinza escuro: médio e preto: forte. Amostras aplicadas (Figuras 9 e 10).

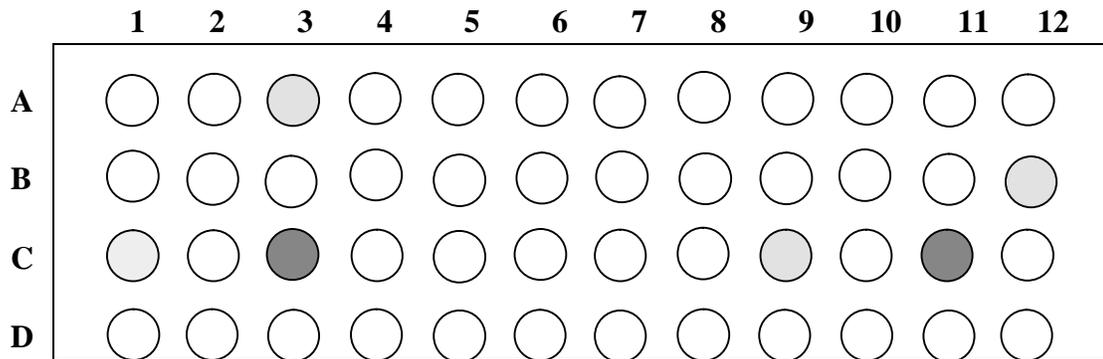
A



B



C



D

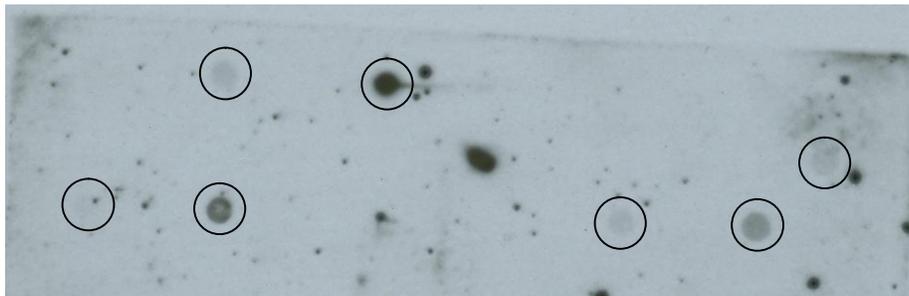
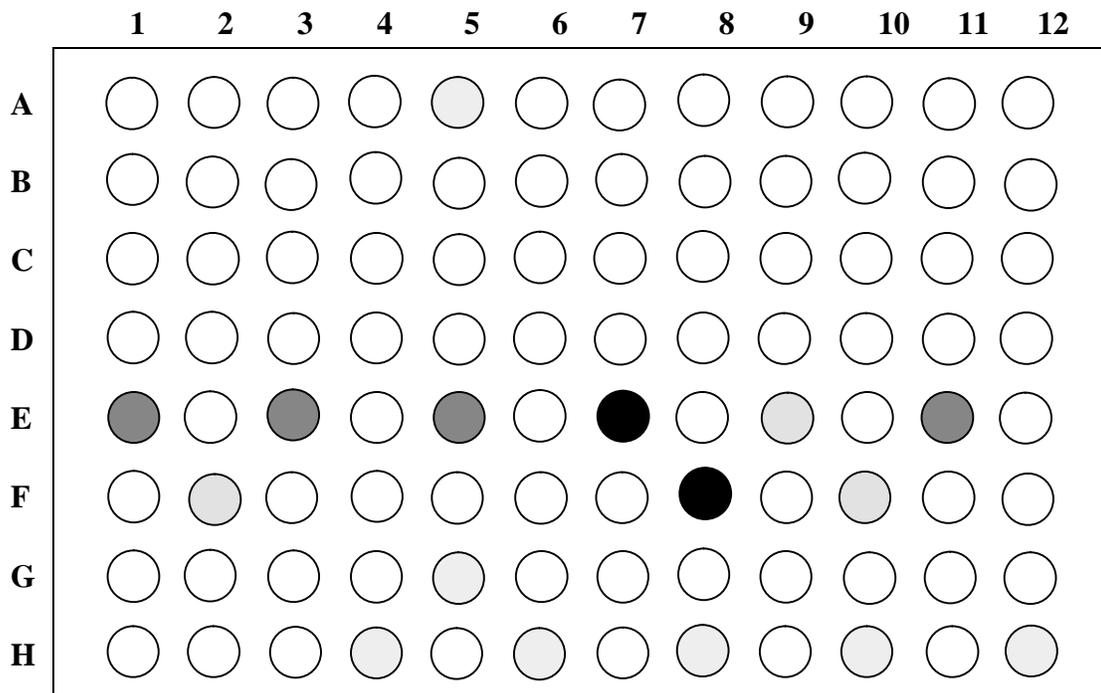
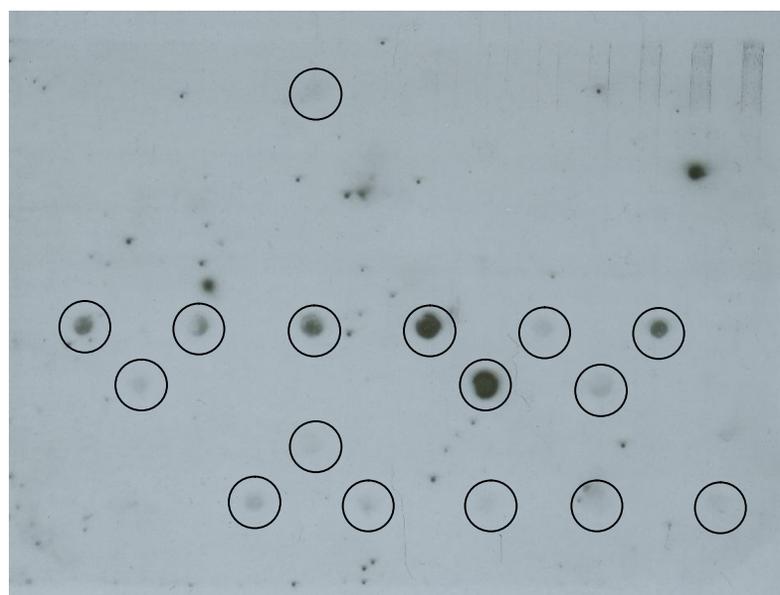


Figura 20. Resultado da hibridação com o fragmento do gene 18S rDNA *Trichuris* sp. **A e C:** Esquema do resultado da hibridação. **B e D:** Resultado da revelação da hibridação. Intensidade do sinal emitido pela hibridação (cinza claro: fraco, cinza escuro: médio e preto: forte). Aplicação das amostras (Figuras 9 e 10).

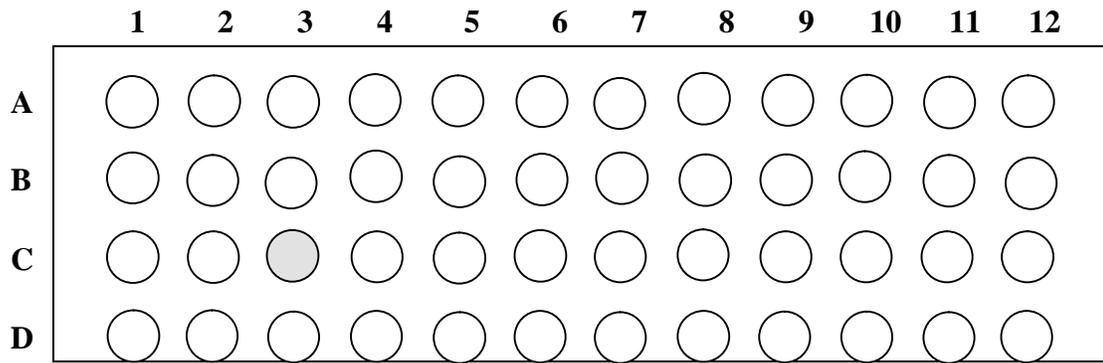
A



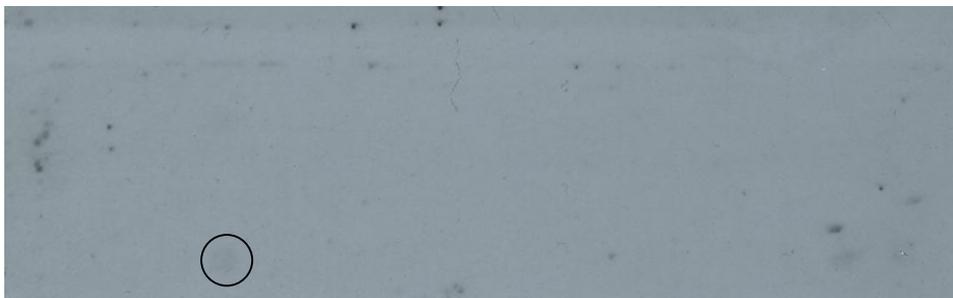
B



C



D



Análises de resultados da hibridação de ácidos nucleicos e PCR

Considerando-se o continente sul americano, como observado nas tabelas 18A e 18B, o ensaio molecular da hibridação mostrou-se mais sensível ao diagnóstico molecular tanto para *Ascaris* sp. quanto para *Trichuris* sp. Para *Ascaris* sp. aproximadamente 63% das amostras foram positivas pela hibridação para um e/ou outro alvo molecular, enquanto apenas 20% pela PCR. Em ambos os ensaios moleculares, obtiveram-se mais resultados positivos quando o alvo usado foi o gene *nad1*, 14% e 58%, quando o ensaio molecular usado foi a PCR e hibridação, respectivamente. Para *Trichuris* sp., não foram obtidos resultados positivos com o uso da PCR. Já pela hibridação um total de 17 amostras foram positivas. Após a aplicação de ambas as abordagens de diagnóstico molecular, PCR e hibridação, novos mapas para paleodistribuição molecular de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. foram traçados (Figuras 21A e B).

Tabela 18A: Comparação dos resultados da Microscopia, Hibridação e PCR para *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. dos sítios arqueológicos do Brasil.

Amostras n (%)	Microscopia	Hibridação					PCR			
		<i>Ascaris</i> sp.			<i>Trichuris</i>	<i>Ascaris</i> sp.			<i>Trichuris</i>	
		<i>cytb</i>	<i>cox1</i>	<i>nad1</i>	sp. 18S	<i>cytb</i>	<i>cox1</i>	<i>nad1</i>	sp. 18S	
L P	A47	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	A48	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Subtotal 2		0	0	1	0	1	0	1	0	0
Ba	A259	<i>Trichuris</i> sp.	-	+	+	+	-	-	-	-
	A266	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
Subtotal 2		0	1	0	1	0	0	0	0	0
BS-I	A213	<i>Trichuris</i> sp.	-	+	+	-	-	-	-	-
	A283	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
	A306	<i>Trichuris</i> sp.	-	+	+	-	-	-	-	-
	A308	<i>Trichuris</i> sp.	-	+	+	-	-	-	-	-
	A319	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	+	-	-	+	-	-
	A320	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	-
Subtotal 6		0	3	4	0	0	1	1	0	0
GG-II	A22f	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-
	A24a	Ascarídeo	+	+	+	-	-	-	-	-
	A05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A11	Ascarídeo	-	+	+	-	-	-	-	-
	A105	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	+	-	-	-	+	-
	A107	<i>Trichuris</i> sp.	-	+	-	-	-	-	-	-
Subtotal 6		1	3	3	0	1	0	1	0	0

Amostras n (%)	Microscopia	Hibridação				PCR			
		Ascaris sp.			Trichuris	Ascaris sp.			Trichuris
		cytb	cox1	nad1	sp. 18S	cytb	cox1	nad1	sp. 18S
BPF	A337	-	-	-	-	-	-	-	-
	A352	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-
	A353	Ascarídeo	-	-	-	-	-	-	-
	A358	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	+	-
	A360	-	-	-	+	-	-	-	-
Subtotal 5		0	0	1	0	0	0	1	0
S	A1216	-	-	-	+	-	+	+	+
Subtotal 1		0	1	1		1	1	1	0
Cubatão-I	A2080	-	+	+	+	+	-	-	-
	A2082	-	+	+	+	+	-	-	-
	A2083	-	+	+	+	+	-	+	-
	A2088	-	+	+	+	+	-	-	-
	A2091	-	+	+	+	+	-	-	-
	A2094	-	+	+	+	+	-	-	-
Subtotal 6		6	6	6	6	0	1	0	0
Igreja da Sé	3A	-	+	+	+	+	-	-	-
	4A	-	-	-	-	-	-	-	-
	7A	-	-	+	-	-	-	-	-
	8A	-	+	+	+	+	-	-	-
	12B	-	+	+	+	+	-	-	-
	14B	-	+	+	+	-	-	-	-
	17H	-	-	+	+	-	-	-	-
	18A	-	-	+	+	-	-	-	-
	20A	-	+	+	+	+	-	-	-
	22B	-	-	-	-	-	-	-	-
	23A	-	+	+	-	-	-	-	-
	26A	-	-	+	+	-	-	-	-
	28C	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	-	+	+	+	+	-	-	-
	32	-	+	+	+	+	-	-	-
	33C	-	+	+	+	+	-	-	-
	34A	-	+	+	+	+	-	-	-
	38	-	+	+	+	+	-	-	-
Subtotal 18		11	15	13	9	0	0	0	0
Total 46 (100)		18 (39)	28 (61)	30 (65)	16 (35)	3 (7)	3 (7)	5 (11)	0

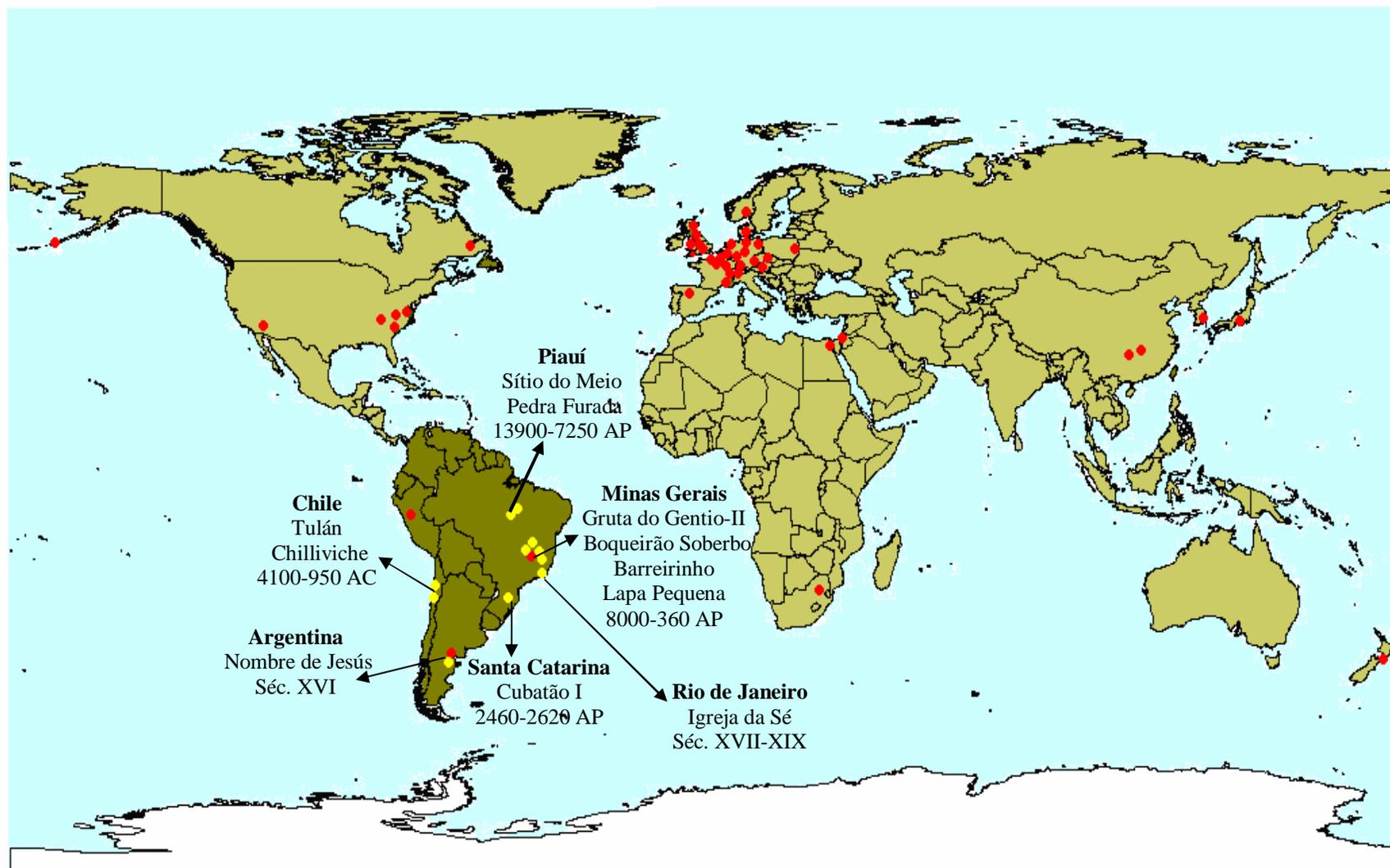
Legenda. LP: Lapa Pequena, BS-I: Boqueirão Soberbo I, GG-II: Gruta do Gentio II (MG). BPF: Boqueirão da Pedra Furada, S: Sítio do Meio (PI). Cubatão I (SC). Igreja da Sé (RJ).

Tabela 18B: Comparação dos resultados da Microscopia, Hibridação e PCR para *Ascaris* sp e *Trichuris* sp. dos sítios arqueológicos europeus e América do sul: Argentina, Chile.

Amostras n (%)	Microscopia	Hibridação				PCR				
		<i>Ascaris</i> sp.			<i>Trichuris</i> sp.	<i>Ascaris</i> sp.			<i>Trichuris</i> sp.	
		<i>cytb</i>	<i>cox1</i>	<i>nad1</i>	18S	<i>cytb</i>	<i>cox1</i>	<i>nad1</i>	18S	
Tulán	A710c	Nematóide	-	-	-	-	-	-	-	-
	A711	<i>Trichuris</i> sp.	+	+	+	-	-	-	-	-
	A714	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	+	-	+	-
	A715	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A722	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A724	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Subtotal 6			1	1	1	0	1	0	1	0
Tilliviche	A160	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	A173	<i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
	A176	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A180	Nematóide	-	-	-	-	-	-	-	-
	A182	Nematóide	-	-	-	-	-	-	-	-
Subtotal 5			0	0	1	0	0	0	0	0
NJ	M51	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	+	+	-	-	-	+	-
	M128	<i>Ascaris</i> sp.	+	+	+	+	-	-	+	-
Subtotal 2			1	2	2	1	0	0	2	0
Total Argentina e Chile 13 (100)			2	3	4	1	1	0	3	0
			(15)	(23)	(31)	(8)	(8)		(23)	
Total América do Sul 59 (100)			20	31	34	17	7	3	8	0
			(34)	(53)	(58)	(29)	(12)	(5)	(14)	
H	HG	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-
	H1	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
	H7	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-
	H8	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-
	H9	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-	-
Lü	A389 ovos	<i>Ascaris</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-
	A389 sed.	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	+	-	-	+	-	-	-
Wal	A1380 ovos	<i>Ascaris</i> sp.	-	-	-	-	+	-	+	-
	A1380 sed.	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	+	-	+	-
	A1384 ovos	<i>Ascaris</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-
	A1384 sed.	<i>Ascaris</i> sp. e <i>Trichuris</i> sp.	-	-	-	-	+	-	-	-

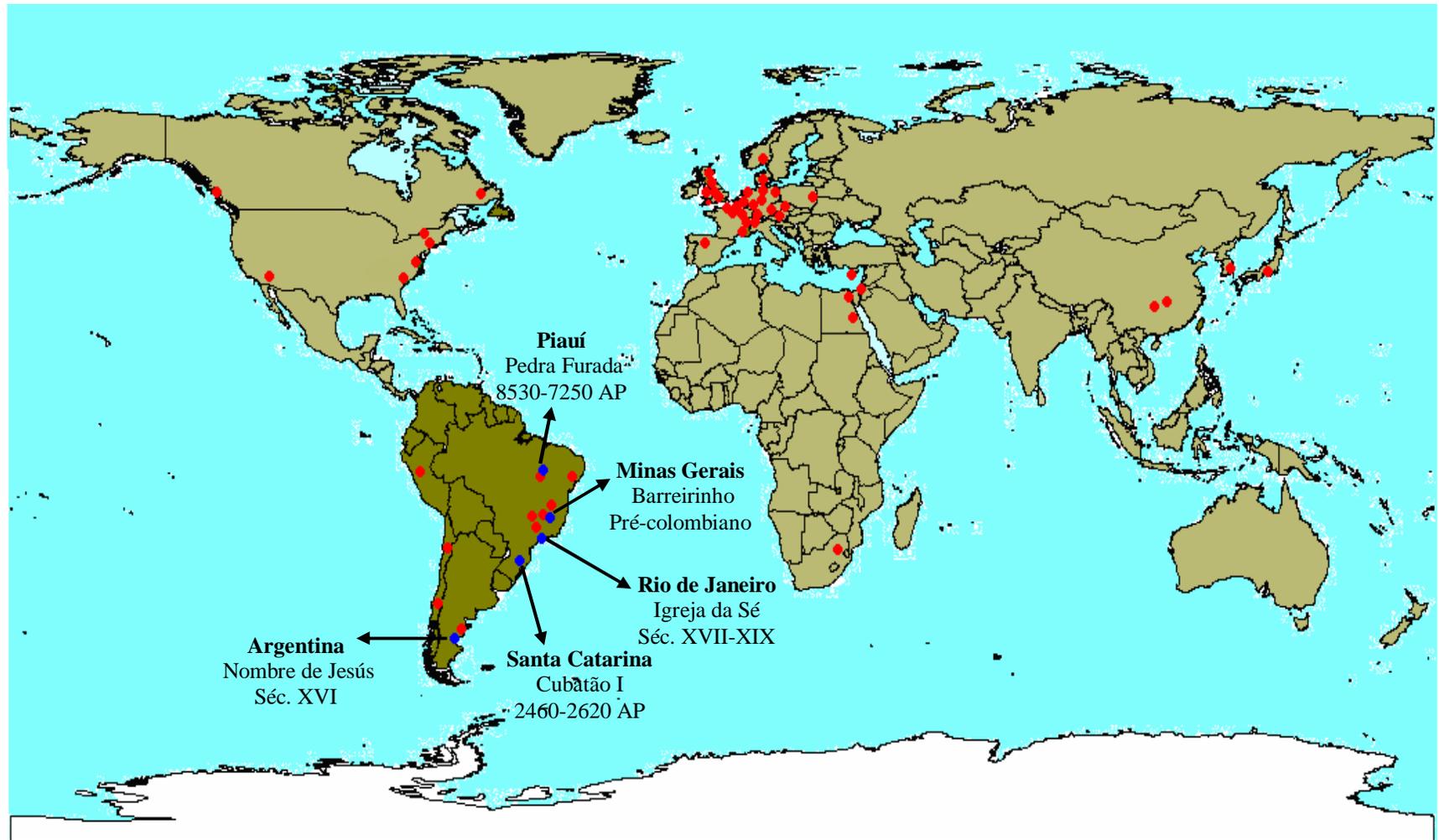
Legenda. Tulán/San Pedro de Atacama, Tilliviche (Chile). H: Homem de Galera. NJ: Nombre de Jesus/Patagônia (Argentina). Lü: Lübeck (Alemanha). Wal: Walraversijde (Bélgica).

Figura 21A: Paleodistribuição de *Ascaris lumbricoides* por diagnóstico molecular (13.900 AP – 360 AP).



Legenda: ● diagnóstico por microscopia óptica; ● diagnóstico molecular. AP: Antes do Presente. AC: Antes de Cristo.

Figura 21B: Paleodistribuição de *Trichuris trichiura* por diagnóstico molecular (8.530 AP – século XIX).



Legenda: ● diagnóstico por microscopia óptica; ● diagnóstico molecular. AP: Antes do Presente.

Análises complementares

Os resultados que avaliaram granulometria de areia, pH e compostos minerais nas amostras de solo do sítio arqueológico Cubatão I, Joinville-SC, estão resumidos na tabela 19.

Tabela 19: Análise de solo do sítio arqueológico Cubatão I, Joinville-SC.

DESCRIÇÃO		FÍSICA GRANULOMETRIA						QUÍMICA			
		Areias %									
Código	Profundidade	G	M	F	Total	Silte %	Argila %	pH %	N %	P mg/dm ₃	NH ₄ mg/dm ₃
2004/312/07	01 – 10	15	9	17	41	34	25	7,7	1,26	697	18,90
2005/313/07	02 - 30	16	10	17	43	37	20	8,3	0,21	14	13,61

Legenda. G: grossa, M: média, F: final. N: nitrogênio, P: fosfato e NH₄: amônia.

Após o emprego da técnica de espalhamento de solo para análise de fungos (Duddington 1955), nenhum crescimento foi observado em nenhuma das amostras.

3.5 Avaliando o paradoxo *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. no material arqueológico

Inicialmente, 88 artigos foram selecionados pela busca sistemática. Destes, 65 tiveram o resumo lido e depois de avaliados os critérios de inclusão, 44 foram estudados integralmente. Depois de avaliados todos os artigos inclusos nos trabalhos norteadores da pesquisa, incluindo os pesquisados por busca manual e a consulta a especialistas, um total de 98 artigos compreenderam esta pesquisa.

Os achados de *Ascaris* sp. e/ou *Trichuris* sp. em material antigo de origem humana, assim como informações sobre origem geográfica, tipo de material, datação número de ovos, presença ou ausência de plantas medicinais, fungos e presença ou ausência de ovos inférteis estão listados na Tabela 20.

A associação *A. lumbricoides* e *T. trichiura* ocorreu em cerca de 59% dos achados arqueológicos em todo o mundo, sendo que esta é de mais de 78% na Europa, podendo chegar a mais de 90% no período correspondente a Idade Média.

Achados de *T. trichiura* foram os mais frequentes, sendo o número ainda mais expressivo quando consideramos os achados isolados. *T. trichiura* foi encontrado sem *A. lumbricoides* aproximadamente duas vezes mais do que o inverso. Este paradoxo ocorre especialmente na América do Sul pré-colombiana, onde a quase totalidade das amostras é composta por *Trichuris* sp. No entanto, este fenômeno também é observado na Europa antes do período neolítico e Ásia (Bouchet et al. 2003, Gonçalves et al. 2003). Na América do Sul pré-colombiana são 16 referências para *Trichuris* sp. e apenas cinco para *Ascaris* sp., contudo duas destas amostras datam do período de contato e correspondem a esqueletos de colonizadores espanhóis, não tendo portanto origem sul-americana assegurada. Achados isolados de *T. trichiura* são também expressivos na Europa e Ásia. Há 12 referências para este

parasito na Europa e quatro para *Ascaris* sp., sendo essa diferença ainda maior na Ásia, cinco achados isolados de *Trichuris* sp. e apenas um de *Ascaris* sp. Já na América do Norte há dois achados a mais de *A. lumbricoides* sem *T. trichiura* e uma única associação *Ascaris-Trichuris* datada do período pré-colonial. África e Oceania contam ainda com poucos achados, o que impede, no momento, qualquer inferência (Tabela 20).

Desta etapa do trabalho resultou a publicação do artigo Leles et al. (2010c), Anexo V.

Tabela 20: Achados de *Ascaris* sp. e/ou *Trichuris* sp. por microscopia óptica, localidade, país e datação.

Sítio/Localidade	País	Datação	Material	Ovos de Parasitos		Referências
				<i>Ascaris</i>	<i>Trichuris</i>	
Europa						
Gree Grotte, Arcy-sur-Cure, Yonne	França	30.160±140-24.660±330 AP	Sedimento e coprólito	+	-	Bouchet et al. 1996
Shilouro-Kambos	Chipre	8300-7000 AC	Sedimento de enterramento	+	+ ^d	Harter et al. 2005
Khirokitia, Larnaka	Chipre	8300-7000 AC	Sedimento de enterramento	+	+	Harter et al. 2005
Gwent Levels at Goldcliff, northern side of the Severn Estuary	País de Gales	5740-5620 cal AC	Sedimento	-	+ ^a	Dark 2004
Clairvaux , Jura	França	3100-2700 AC	Sedimento	+	*+	Dommelier-Espejo 2001
Swifterbant	Países Baixos	5400±40-5230±40 AP	Coprólitos	-	+ ^a	Roever-Bonnet et al. 1979
Arbon, Thurgau	Suíça	3384-3370 AC	Coprólitos e sedimento	+	*+	Dommelier-Espejo 2001
Ötzal	Áustria	5300-5200 AP	Amostras do colon de múmia	-	+	Aspöck et al. 1996
Chalain, Jura	França	3200-3150 AC	Coprólitos	-	+	Dommelier et al. 1998
Chalain, Jura	França	3044-2980 AC	Coprólitos	-	+	Dommelier et al. 1998
Chalain, Jura	França	3080-2950 AC	Sedimento e coprólitos	-	+ ^c	Bouchet et al. 1995
Chalain, Jura	França	3200-2500 AC	Sedimento e coprólitos	-	+	Dommelier-Espejo 2001
Brean Down, Somerset	Inglaterra	Idade do Bronze	Sedimento	+	+	Jones et al. 1988
Hulin, Central Moravia	República Tcheca	1600-1500 AC	Esqueleto	+	+	Šebela et al. 1990
Drobintz girl	Prússia	600 AC	Conteúdo de intestino	+	+	Szidat 1944
Hallstatt	Áustria	2300 anos	Excrementos	+	*+ ^d	Aspöck et al. 1973
Tollund e Grauballe	Dinamarca	Século III-V	Material de estômago	-	+	Helbaek 1958
Man, Central Jutle						
Vilshofen	Alemanha	150-140 AC	Latrina	-	+	Specht 1963
Hallein, Salzburg	Áustria	2000 anos	Excrementos	-	*+ ^d	Aspöck et al. 1973
Bremerhaven	Alemanha	100 AC-500 AD	Material de refugio	+	+	Jansen Jr e Over 1962

Valkenburg on Rhine	Países Baixos	42-100 AD	Sedimento	+	+ ^d	Jansen Jr e Over 1966
Lindow Man	Inglaterra	Idade do Ferro	Intestino	+ ^e	*+	Jones 1986
Bobigny	França	Século II	Enterramento	+	+	Rousset et al. 1996
York	França	Século II-III	Sistema de esgoto	+ ^a	+	Wilson e Rackham 1976
Place d'Armes, Namur	Bélgica	Século II-III	Material de fossa	+ ^{a,f}	+ ^a	Rocha et al. 2006
Karwinden Man	Prússia	500 AD	Conteúdo intestinal	+	+	Szidat 1944
Ribe	Dinamarca	750-800 AD	Coprólito	+	+	Nansen e Jørgensen 1977
York	Inglaterra	Século IX-XII	Solo, latrina, fossas e coprólitos	+	*+	Jones 1984
Coppergate, York	Inglaterra	Século X-XI	Material de fossa	+	*+ ^b	Hall et al. 1983
Winchester	Inglaterra	1000 anos	Sedimento de fossa	+ ^a	*+ ^a	Pike 1967
St. Isidoro's Collegiate-Basilica, Leon	Espanha	Século X-XIII	Cavidade abdominal de múmia	*+ ^f	+	Hidalgo Argüello et al. 2003
Place d'Armes, Namur	Bélgica	IX-XI (1055 AD)	Fossa	+ ^a	+ ^a	Rocha et al. 2006
Place d'Armes, Namur	Bélgica	1055-1100 AD	Latrina	+ ^a	+ ^a	Rocha et al. 2006
Place d'Armes, Namur	Bélgica	Século XII-XIII	Latrina	+	+	Rocha et al. 2006
Place d'Armes, Namur	Bélgica	Século XIV-XV	Latrina	+	+	Rocha et al. 2006
Place d'Armes, Namur	Bélgica	XV-XII (1618 AD)	Latrina	+	+	Rocha et al. 2006
Place d'Armes, Namur	Bélgica	1611-1828 AD	Latrina	+ ^a	+ ^a	Rocha et al. 2006
Winchester	Inglaterra	Século XI-XII	Material de fossa	+ ^a	*+ ^a	Taylor 1955
Paris	França	XII-XV	Coprólitos, sedimento e latrinas	+	+	Bouchet et al. 1989
Rue de Lutèce, Paris	França	XIV-XV	Sedimento e coprólitos	+	+	Bouchet 1993
Southampton	Inglaterra	Século XIII-XIV	Conteúdo de fossa	+ ^a	*+ ^a	Pike 1975
Stroosteeeg, Utrecht	Países Baixos	Século XIII-XIV	Material de fossa	+	+	Boersema e Jansen 1975
Southwark	Europa	Idade Média	Solo	+	+	Rouffignac 1987
Bermondsey, Abbey, Southwark	Europa	Idade Média	Solo	+ ^{a,c}	-	Beard 1986
Beauvais	França	XIII-XVII	Sedimento, fossa e lixeira	+	+	Bouchet 1991
The Cour Napoleon, Paris	França	XI-XV	Sedimento de fossa	+ ^{a,c}	-	Bouchet 1995
The Cour Napoleon, Paris	França	XI-XV	Amostra sob esqueleto de leitão	-	+ ^a	Bouchet 1995

The Carrousel, Paris	França	XI-XV	Excrementos	+	+	Bouchet 1995
Worcester	Inglaterra	XV	Barril-latrina	+ ^{a,b}	*+ ^{a,b,d}	Greig 1981, Moore 1981
Union Terrace, York	Inglaterra	XIV-XVI	Sedimento de latrina construída sob pedra	-	+	Jones et al. 1988
Union Terrace, York	Inglaterra	XIV-XVI	Sedimento de latrina construída sob pedra	+	-	Jones et al. 1988
Oslo	Noruega	XV	Fossa	+	+	Jones 1982
Schleswig	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+	Herrmann 1985
Berlin	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+ ^d	Herrmann 1985
Breisach	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	*+	+	Herrmann 1985
Lübeck	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+	Herrmann 1985, Herrmann e Schulz 1986
Braunschweig	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+	Herrmann 1985
Halmeln	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+ ^d	Herrmann 1985
Höxter	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+	Herrmann 1985
Leshut	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+	Herrmann 1985
Freiburg	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+ ^h	Herrmann 1985, Reinhard et al. 1988
Göttingen	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+ ^h	Herrmann 1985
Marburg	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	*+	+	Herrmann 1985
Regensburg	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	*+	Herrmann 1985
Oldenburg	Alemanha	Idade Média	Solo de latrina	+	+	Herrmann 1985
Vincennes	França	800 AD	Sedimento de encanamento	+	+	Bouchet et al. 2003
Londres	Inglaterra	XV-XVI	Sedimento e latrinas	+	+	Greig 1982
Strasbourg	França	XV-XVI	Latrinas	+	+	Legendre et al. 1986
Montbéliard, Doubs	França	XV	Material de fossas	+	+	Bouchet e Paicheler 1995
Montbéliard, Doubs	França	XV-XVI	Sedimento	+	+	Gonçalves et al. 2003
Raversijde	Bélgica	XVI	Sedimento de latrina	+	+	Fernandes et al. 2005
Paris	França	XVII-XVIII	Sedimento	+	+	Bouchet et al. 1991
Marly-le-Roy, Yveline	França	XVII-XVIII	Latrina	+	+	Bouchet et al. 1998
Namur	Bélgica	XVIII	Sedimento	+	+	Gonçalves et al. 2003
Subtotal de achados				62	70	
Subtotal de achados isolados				4	12	
Subtotal da associação <i>Ascaris</i> e <i>Trichuris</i>				58		

África						
Kruger Cave, Rustenburg Nile valley	África	10000-7000 AP	Coprólito	+ ^{a,b}	*+ ^{a, b}	Evans et al. 1996
PUMII mummy	Núbia	2400 AC-1500 AD	Vísceras em vasos canópicos	-	+	Bouchet et al. 2003
Akhthep's mastaba of Saqqara	Egito	200 AC	Tecido intestinal de múmia	+	-	Cockburn et al. 1975
K2, Greefswald	Egito	715-656 AC	Jarro contento rejeitos embalçados	+	-	Harter et al. 2003
	África do Sul	1000 – 1300 AD	Coprólito	-	+	Dittmar e Steyn 2004
Subtotal de achados				3	3	
Subtotal de achados isolados				2	2	
Subtotal da associação <i>Ascaris</i> e <i>Trichuris</i>				1		
Ásia						
Jerusalém	Oriente Médio	VII-VI AC	Restos de banheiro	-	+	Unpublished observations
Jiangling County, Hubei Province	China	2300 anos (475-221 AC)	Múmia	-	+	Yang et al. 1984, Su TC 1987
Hubei Province	China	167 AC	Múmia	-	+	Liangbiao e Tao 1981, Cheng 1984
Ma-Wang-Dui, Changsha city, Hunan Province	China	2100 anos (206 AC-220 AD)	Intestino e fígado de múmia	-	+	Wei 1973
Nahal-Mishmar Valley	Israel	160 AD	Não avaliado	-	+	Wintenberg 1961
Acre	Israel	1300 AD	Latrina	+	-	Mitchell e Stern 2000
Schinchang-dong, Kwangju city	Corea	100 AC	Solo de uma casa onde ossos humanos foram encontrados	+	+	KNM 1997
Chilgok-gun, Taegu, Gyeongsangbuk Province	Corea	668-935 AD	Sedimento de fossas, onde banheiros existiram	*+ ^{a,f}	+ ^a	Han et al. 2003
Fujiwara Palace Site	Japão	710 AD	Sediment de fossa	+	*+	Matsui et al. 2003
Yangju	Corea	1411± 42 AD	Tecido intestinal de múmia	+ ^e	*+	Seo et al. 2007
Joseon Dynasty	Corea	XVII	Múmia	+	+	Shin et al. 2008

Subtotal de achados				6	10	
Subtotal de achados isolados				1	5	
Subtotal da associação <i>Ascaris e Trichuris</i>				5		
Oceania						
Wellington	Nova Zelândia	150-200 anos	Coprólito	+	-	Andrews 1976
Subtotal				1	0	
Subtotal de achados isolados				1	0	
Subtotal da associação <i>Ascaris e Trichuris</i>				0		
América do Norte						
British Columbia	Canadá	3700-3490 cal AC	Sedimento	+	-	Bathurst 2005
Upper Salts Cave, Kentucky	EUA	570-290 AC	Coprólito	+	-	Fry 1974
Big Bone Cave, Tennessee	EUA	2177-145 AP	Coprólito	+	-	Faulkner et al. 1989
Antelope House, Arizona	EUA	900-1250 AD	Coprólito e Latrina	+	-	Gonçalves et al. 2003
Elden Pueblo, Arizona	EUA	1070-1250 AD	Solo de Latrina	+ ^g	*+ ^g	Hevly et al. 1979, Reinhard et al. 1987
Adak Isle, Alaska	EUA	840±40 AP	Amostra de cavidade abdominal	+	-	Bouchet et al. 2001
Albany, New York	EUA	1600-1700 AD		*+ ^f	+	Fisher et al. 2007
Newfoundle	Canadá	XVII	Privada	+ ^a	+ ^a	Horne e Tuck 1996
Colonial Williamsburg, Virginia	EUA	1720 AD	Fezes de latrinas	+	*+	Reinhard 1990
New Brunswick, New Jersey	EUA	1790-1899 AD	Sedimento de latrinas	*+ ^f	+	Unpublished observations Reinhard et al. 1986
Queen Ann Square, Newport, Rhode Isle	EUA	XVIII	Solo de privada	+	*+	Reinhard et al. 1986
Lutheran Church, Pearl Street, Albany, New York	EUA	1790	Sedimento de privada ou lixeira	+	*+	Reinhard 2004
Wilmington, Delaware	EUA	XIX	Privada	-	+	Fries et al. 1990
Greenwich Village, New York City, New York	EUA	XIX	Solo de Latrina	-	+	Reinhard 1990
Fayette, Michigan	EUA	XIX	Sedimento	-	+	Faulkner et al. 2000
Manhattan, Kansas	EUA	1860-1900	Sedimento ao redor de esqueletos	*+	+	Le Bailly et al. 2006
Wong Nim's Property, San Bernardino, Califórnia	EUA ^h	1880-1930 AD	Sedimento de latrina	+	+	Reinhard et al. 2008

Philadelphia	EUA	Período histórico	Sedimento	+	*+ ^d	Unpublished observations
Upper Salts Cave, Kentucky	EUA	570-290 AC	Coprólito	+	-	Fry 1974
Subtotal				15	13	
Subtotal de achados isolados				5	3	
Subtotal da associação <i>Ascaris</i> e <i>Trichuris</i>				10		
América do Sul						
Lapa Pequena, Minas Gerais	Brasil	8000-7000 AP	Coprólito	-	+	Gonçalves et al. 2003
Huarmey Valey	Peru	4277±181 AP	Coprólito	+ ^e	-	Patrucco et al. 1983
Boqueirão Soberbo, Minas Gerais	Brasil	4905±85-1325±60 AP	Coprólito	-	+	Ferreira et al. 1982
Santa Elina, Mato Grosso	Brasil	4000-2000 AP	Coprólito	-	+	Gonçalves et al. 2003
Orejas de Burro 1	Argentina	3720-3978 cal AP	Sedimento da cavidade abdominal de esqueleto	-	+	Fugassa e Barberena 2006
Gentio Cave, Minas Gerais	Brasil	3490±120-430±70 AP	Coprólito e conteúdo intestinal de múmia	+	+	Ferreira et al. 1980, 1983, Gonçalves et al. 2003
Tulán, San Pedro de Atacama	Chile	1080-950 AC	Coprólito	-	+	Gonçalves et al. 2003
Estrago Cave, Pernambuco	Brasil	2000 AP	Coprólito	-	+	Ferreira et al. 1989
Huarmey Valley	Peru	1000 AD	Coprólito	-	+	Patrucco et al. 1983
San Gerónimo	Peru	1020-1156 AD	Coprólito	-	+	Martinson et al. 2003
Lluta Valley	Chile	Período Incaico intermediário e tardio	Coprólito	-	+	Santoro et al. 2003
Vale Alto de Ica	Peru	725 AD (Nasca tardio)	Coprólito	+	-	Gárate et al. 2005
Cerro El Plomo, Santiago	Chile	450 anos	Fezes de intestino	-	+	Pizzi e Schenone 1954
El Potrero de Santa Lucía, Ealgalá, Catamarca	Argentina	470±200 AC 650±80 AD 310±90 AD	Sedimento	-	+	Pau et al. 2005
Nombre de Jesús	Argentina ⁱ	XVI	Sedimento	+ ^g	*+ ^g	Fugassa e Guichón 2006, Fugassa et al. 2006
Nombre de Jesús	Argentina ⁱ	XVI	Sedimento	+	-	Fugassa et al. 2007
Mummy pre-columbian, culture Murga	Peru	Período Colonial	Fezes do colon de múmia	-	+	Fouant et al. 1982
Itacambira, Minas Gerais	Brasil	XVIII	Coprólitos da	-	+	Araújo et al. 1984

Pedra Furada	Brasil	Não Avaliada	cavidade abdominal de múmia		Gonçalves et al. 2003
			Coprólito		
			-	+	
Subtotal			5	16	
Subtotal de achados isolados			3	14	
Subtotal da associação <i>Ascaris</i> e <i>Trichuris</i>			2		
Total			92	112	
Total de achados isolados			16	36	
Total da associação <i>Ascaris</i> e <i>Trichuris</i>			76		

Legenda: *mais ovos para cada espécie, ^aorigem humana incerta, ^bpresença de plantas vermífugas, ^cdiagnóstico incerto, ^d amostras positivas para *Trichuris* sp. e negativas para *Ascaris* sp., ^eovos inférteis, ^famostras positivas para *Ascaris* sp. e negativas para *Trichuris* sp., ^gpresença de fungos, ^horigem da infecção provavelmente asiática, ⁱorigem da infecção provavelmente europeia. AP Antes do Presente, AC Antes de Cristo, AD Anno Domini. As diferentes cores representam cada continente; roxo: Europa; azul: África; verde: Ásia; vermelho: Oceania; laranja: América do Norte; amarelo: América do Sul.

5 DISCUSSÃO

5.1 Detectada variabilidade intra-indivíduo da região *ITS1* de *Ascaris* sp. do Brasil

Criscione et al. (2007b) analisaram 129 espécimes de *Ascaris* sp. de origem humana e suína da China, Guatemala e Nepal pela técnica de microsátélites. Os autores concluíram que eventos de hibridização ocorrem em populações simpátricas de humanos e suínos infectadas com *Ascaris* sp., e conseqüentemente, a longo prazo, as medidas de controle da ascaríase devem ser reavaliadas. As duas regiões brasileiras estudadas, Amazonas e Rio de Janeiro, possuem altas prevalências para *Ascaris* sp. Costa-Macedo et al. (1998) observaram uma prevalência de 25% em crianças carentes da cidade do Rio de Janeiro. Em Santa Isabel do Rio Negro-AM, foram observadas na população em geral prevalências de até 40% (Carvalho-Costa et al. 2007) para *Ascaris* sp. No Brasil, assim como em outras partes do mundo, o diagnóstico para parasitos intestinais tradicionalmente é feito por microscopia óptica, o qual é incapaz de discriminar ovos de *Ascaris* sp. de origem humana e suína, e estudos de epidemiologia molecular ainda são raros.

Em estudo prévio identificamos dois genótipos de *ITS1* de *Ascaris* sp., G1 e G6, na mesma amostra fecal (Leles et al. 2009, Anexo I). Com estes dados foi possível sugerir variabilidade intra-populacional de *ITS1* em *Ascaris* sp., devido à possibilidade da co-infecção com diferentes genótipos de *Ascaris* sp. presentes nas fezes. Porém, não foi possível avaliar a variabilidade intra-indivíduo. No presente estudo, considerando um único ovo isolado como um indivíduo de *Ascaris* sp., demonstramos a presença de 2-4 genótipos/haplótipos em cada indivíduo. Portanto, fica caracterizada a variabilidade intra-indivíduo da região *ITS1* de *Ascaris* sp. Considerando que a região estudada é uma região não codificadora e que ocorre

em múltiplas cópias (~ 42 cópias em *Ascaris* sp., Pecson et al. 2006), é possível supor que diferentes sequências de *ITS1* ocorressem em um único indivíduo. Alguns pesquisadores têm considerado dois diferentes *ITS1* em *Ascaris* sp., baseados em 6 pb de diferenças para discriminar as espécies *A. lumbricoides* e *A. suum* (Zhu et al. 1999 e Peng et al. 2003). Peng et al. (2003) propuseram cinco genótipos de *Ascaris* sp. (G1-G5), dos quais os genótipos G2, G4 e G5 contêm posições nucleotídicas ambíguas. Estas posições ambíguas foram interpretadas pelos autores como indicativo de eventos de hibridização ou cruzamento entre diferentes genótipos. Nós acreditamos que cada um destes genótipos representam de fato dois diferentes genótipos caracterizados em um mesmo indivíduo. Conseqüentemente, isto sugere variabilidade intra-indivíduo da região *ITS1* de *Ascaris* sp., a qual não foi detectada porque a análise de clones das amostras não foi realizada. Pecson et al. (2006) realizaram um PCR em tempo real para quantificar ovos viáveis de *Ascaris* sp. baseado em sequências de *ITS1*. Neste experimento, os autores usaram abordagens de clonagem e sequenciamento nucleotídico, no qual, interessante, um clone revelou um genótipo humano em ovos coletados exclusivamente de intestino de porco. Interpretamos este achado como uma evidência indireta de variabilidade intra-indivíduo (ou intra-populacional, uma vez que mais de um ovo pode ter sido usado), a qual foi observada somente porque as amostras foram clonadas. Portanto, análises da região *ITS1* de *Ascaris* sp. sem análise de clones revelam somente uma cópia de *ITS1*, possivelmente a cópia mais frequente, ou, ainda, cópias com posições nucleotídicas ambíguas, levando assim à supressão de informação e/ou a classificações erradas dos genótipos, e, conseqüentemente, da estruturação genética das populações de *Ascaris* sp.

Baseado na abordagem de PCR-RFLP, Anderson (2001) mostrou dois diferentes perfis de *ITS* em indivíduos de *Ascaris* sp. da Guatemala, sugerindo hibridização. A variabilidade intra-indivíduo de *ITS1* de *Ascaris* sp. detectada no presente estudo mostrou múltiplos

genótipos/haplótipos em cada amostra, sendo que as amostras vieram de regiões distantes geograficamente e com contextos históricos e sócio-ambientais distintos. Embora em circunstâncias diferentes, hibridizações de genótipos entre *Ascaris* sp. de humanos e suínos são eventos plausíveis em ambas as regiões brasileiras estudadas. Na cidade do Rio de Janeiro, a criação de porcos é um hábito comum, principalmente nas áreas com contexto de urbanização descontrolada, condições econômicas desfavoráveis e precário saneamento básico, tais como as comunidades carentes de onde provém a maioria das amostras deste estudo. Portanto, hibridização e infecção cruzada entre *Ascaris* sp. de origem humana e suína nestas regiões são eventos possíveis. Atualmente a criação de porcos no município de Santa Isabel do Rio Negro é rara. Esta cidade está localizada no alto Rio Negro, em uma região coberta pela floresta amazônica. A população tem ascendência indígena, as quais foram demograficamente concentradas e aculturadas, aderindo ao estilo de vida ocidental em um processo guiado pelas missões Salesianas (Carvalho-Costa et al. 2007). Missionários europeus chegaram à região aproximadamente um século atrás e lá permaneceram até a década de 70. Durante esta época, criação de porcos domésticos foi relatada, e assim, por um breve período, a associação entre humanos e porcos foi estabelecida (Silva 2007). Contudo, tem sido relatado para algumas comunidades indígenas, que no passado, houve uma relação mais intensa entre a espécie humana e porcos selvagens, como *Pecari tajacu* (L.) e *Tayassu pecari*, Link 1795 (chamados “caititu” e “queixada”, respectivamente) (Silva 2007). Os porcos selvagens foram e têm sido usados principalmente como alimento e no passado eram “adotados” como animais de estimação e até mesmo amamentados (Silva 2007). Ovos de ascarídeos têm sido encontrados em *Pecari tajacu* no estado do Piauí, Brasil e em *Tayassu pecari* na Amazônia peruana e no estado de Santa Catarina, Brasil (Brandão 2007, Carlos et al. 2008, Regolin et al. 2009), embora não tenham sido identificados em nível de espécie.

A região *ITS* é um dos marcadores mais comuns usados para discriminar espécies de nematóides, principalmente por ser uma região muito variável (Gasser e Newton 2000). Porém, não tem sido eficiente para discriminar *A. lumbricoides* de *A. suum*, possivelmente por serem espécies estreitamente relacionadas. Ishiwata et al. (2004) observaram que a distância genética entre estas espécies não é clara, com estimativas de 0,005 e 0,000 de similaridade para regiões *ITS1* e *ITS2*, respectivamente. Outros autores também apontam uma alta similaridade da região *ITS* de *A. suum* e *A. lumbricoides* (Zhu et al. 1999, Anderson 2001, Peng et al. 2003). Existe um intenso debate em torno da origem da infecção por *Ascaris* sp., se esta se originou antes ou depois da domesticação do porco que ocorreu por volta de 10.000 anos atrás (Loreille e Bouchet 2003). Estudos que têm usado alvos mitocondriais para estudar a epidemiologia molecular de *Ascaris* sp. têm sugerido que há particular afiliação de haplótipos pelo hospedeiro humano ou suíno (Peng et al. 2005). No entanto, um haplótipo comum a ambas as espécies foi encontrado. Sendo assim, a epidemiologia molecular de *Ascaris* spp. ainda não esclareceu se este parasito se originou na espécie humana ou suína, ou mesmo, o potencial zoonótico desta infecção, havendo a necessidade de estudos genéticos adicionais.

Esta pesquisa mostrou a variabilidade intra-indivíduo de *ITS1* em *Ascaris* sp. de origem humana do Brasil, sugerindo que o uso desta região como marcador molecular para definir e caracterizar genótipos de *Ascaris* sp. de origem humana e suína requer reconsideração.

5.2 A caracterização genética dos genes mitocondriais *cox1* e *nad1* de *Ascaris* sp. isolados de humanos e suínos do Brasil mostraram haplótipos comuns a ambos hospedeiros

Vilas et al. (2005) compararam o uso da região *ITS* com os genes mitocondriais *nad1* e *cox1* de espécies estreitamente relacionadas de trematódeos e cestóides. Estes autores mostraram que os genes mitocondriais têm maior sensibilidade em distinguir e/ou revelar espécies com origem recente. Este é o caso das espécies de *Ascaris* sp. de origem humana e suína. Como apontado anteriormente, esta divergência teria ocorrido à época da domesticação do porco a qual ocorreu somente por volta de 10.000 AP (Loreille e Bouchet 2003).

Embora tenha sido proposto o uso da região *ITS1* para discriminar *Ascaris* sp. de origem humana e suína, a divergência nucleotídica entre eles é muito baixa e a região *ITS2* é idêntica (Zhu et al. 1999, Peng et al. 2003, Ishiwata et al. 2004). Adicionalmente, uma alta variabilidade intra-individual da região *ITS1* de *Ascaris* sp. no Brasil foi detectada, o que demonstra os perigos de usar esta região como marcador molecular para este parasito (Leles et al. 2010a). A análise genética mostrou que a divergência nucleotídica da região *ITS1* de *Ascaris* sp. calculada para todas as sequências nucleotídicas disponíveis no Genbank (02/2010) foi de $d=0,009$ ($SD=0,003$), valor este menor que os calculados para os genes mitocondriais avaliados neste estudo, *cox1* ($d=0,018$) e *nad1* ($d=0,0022$). Esta variabilidade genética e distribuição dos haplótipos observados para os marcadores mitocondriais contribuem para um melhor entendimento da epidemiologia molecular de *Ascaris* spp. Contudo, a divergência entre haplótipos mitocondriais do hospedeiro humano e suíno é muito baixa ($d=0.002$ para *cox1*) ou ausente (para *nad1*). A estreita divergência genética observada entre os hospedeiros humano e suíno sugerem que análises espécie-específica devem ser feitas baseadas em estudos de mais genes mitocondriais. Por outro lado, considerando as regiões

geográficas brasileiras, ambos os genes revelaram diversidade genética distinta dos haplótipos de *Ascaris* sp., sendo maior na região norte do que a sudeste.

Para ambos os genes observamos que os haplótipos mais prevalentes no Brasil para *cox1* P3=H14 e *nad1* H12=P17 estão espalhados nas regiões norte e sudeste. Estes resultados mostram que, a despeito da distância e contextos sócio-ambientais e históricos completamente distintos, estas barreiras têm sido transpostas por este parasito no Brasil.

Em ambas as regiões brasileiras é ou foi comum uma estreita relação entre humanos e porcos domésticos ou selvagens. As amostras do Rio de Janeiro, como mencionado anteriormente, vêm de áreas de comunidades carentes, onde é comum a criação de porcos em condições precárias de higiene (Figura 22). Recentemente, foi proposta a existência de um suposto ciclo zoonótico de *Giardia duodenalis* envolvendo humanos e cães nesta região (Volotão et al. 2007), mostrando o potencial zoonótico da região para outras infecções intestinais, envolvendo também outros animais e seus parasitos.



Figura 22: Ministro do Meio Ambiente Carlos Minc apreendendo porcos na favela Rio das Pedras-RJ.
Foto: Hipólito Pereira/Agência O Globo 31/07/2009

Nos estados de Minas Gerais e Espírito Santo é comum a criação de porcos em pequenos sítios em estruturas como, chiqueiros e/ou pocilgas, também por muitas vezes criados em condições precárias de saneamento, onde há estreita relação entre humanos e porcos (Figura 23).



Figura 23: Pequeno sítio no sul de Minas Gerais, mostrando a proximidade da casa e o Chiqueiro.
Foto: Daniela Leles

Já em Santa Isabel do Rio Negro, atualmente, não há criação de porcos domésticos. No entanto, esta população tem ascendência indígena e no passado houve intensa relação com porcos selvagens e mesmo porcos domésticos à época da permanência das missões católicas na região, conforme mencionado na sessão anterior (Figura 24). Os genes mostraram uma diversidade genética de natureza específica entre as regiões brasileiras, sendo significativamente maior na região norte, o que poderia ser explicado não somente pelo papel do porco doméstico como também dos porcos selvagens na transmissão da ascaríase na região amazônica.



Figura 24: Índia Guajá amamentado filhote de porco “queixada”.
Foto: Pisco del Gaiso/Folha Imagem 1992.

A análise da árvore genética também mostrou que para ambos os genes mitocondriais, em geral os haplótipos de *Ascaris* sp. do Brasil agruparam com haplótipos de *Ascaris* sp. de baixa prevalência na China. O cenário mais relevante desta infecção no Brasil referente ao gene *cox1* é que o haplótipo P3, que foi encontrado exclusivamente em porcos na China, foi mais prevalente em humanos no Brasil e adicionalmente também encontrado em uma amostra suína. Isto é uma evidência de transmissão cruzada deste haplótipo de humano para porcos ou vice-versa, na região estudada. O mesmo foi observado na análise do gene *nad1*, onde o novo haplótipo mais prevalente em humanos no Brasil (H12=P17) também foi encontrado em uma amostra de suíno. Esta é a primeira vez que é detectado um haplótipo comum a ambos hospedeiros para este gene. Neste trabalho, a designação do *cox1* haplótipo (P3=H14) e *nad1* haplótipo (H12=P17) por si só são um indicativo da sua presença em ambos hospedeiros, e a

despeito do pequeno número de amostras de *Ascaris* sp. de suíno, evidenciamos um fluxo gênico entre estas espécies no Brasil.

5.3 Diagnóstico molecular de *Trichuris* sp.

O fato do gene 18S rDNA de *T. trichiura* ter amplificado somente de DNA extraído de ovos isolados, mostrou que a abordagem de extração de DNA de fezes previamente aplicada para *E. vermicularis* e *A. lumbricoides* (Iñiguez et al. 2002, Leles et al. 2009) não se mostrou eficiente em recuperar DNA de *Trichuris* sp. O fato de não ter-se obtido resultados positivos quando foi usada a região *ITS1*, poderia ser explicado pelo fato das sequências de *ITS1* do gênero *Trichuris* sp. serem extremamente variáveis, ao contrário do gene 18S rDNA, que é mais conservado. Como mostrado na tabela 14, *T. trichiura* apresenta somente 87% e 81% de similaridade com *T. suis* nas regiões *ITS1* e *ITS2*, respectivamente; e não apresentam nenhuma similaridade significativa com todas as demais espécies do gênero disponíveis no Genbank: *T. skrjabine*, *T. arvicolae*, *T. leporis*, *T. ovis*, *T. vulpis* e *T. muris*. Ao que tudo indica *T. trichiura* tem uma origem filogenética, ou em outras palavras, originou-se na espécie humana a partir de um ancestral comum com os antropóides filogeneticamente mais próximos (Confalonieri 1988). Ainda hoje, a maioria dos grandes primatas não humanos albergam este helminto. Contudo, vale ressaltar que até pouco tempo acreditava-se que a espécie de *Trichuris* de origem humana (*T. trichiura*) e a de origem suína (*T. suis*), assim como ainda se supõe para *A. lumbricoides* e *A. suum*, pudessem ser espécies estreitamente relacionadas, tendo a sua divergência ocorrido à época da domesticação do porco, a qual ocorreu apenas há aproximadamente 10.000 anos (Confalonieri 1988, Loreille e Bouchet 2003). Por isso, talvez

se tenha encontrado alguma similaridade entre as sequências de *ITS* apenas entre as espécies *T. trichiura* e *T. suis*.

Somente recentemente, Cutillas et al. (2009) revelaram as primeiras sequências de *ITS* para *T. trichiura*, as quais apresentam uma divergência entre si de 1%. A metodologia empregada se mostrou um tanto quanto laboriosa. A extração de DNA foi a partir de ovos isolados (75-100), vermes adultos e de larvas desenvolvidas de ovos em cultura. Adicionalmente, as amostras foram provenientes de chimpanzé e de um único local, um zoológico da Espanha.

5.4 Paleoepidemiologia molecular de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp.

Quanto ao ensaio molecular da PCR

Ascaris sp.

Leles et al. (2008), em estudo prévio, haviam apontado para um subdiagnóstico da infecção por *Ascaris* sp. na América do Sul. Os autores usaram como alvo molecular o gene *cytb* e averiguaram a presença do parasito em três sítios arqueológicos brasileiros e um chileno. O fato de, no atual estudo, outros alvos moleculares terem amplificado amostras provenientes dos sítios avaliados no trabalho supracitado corroboram a presença do parasito, dando mais robustez aos resultados da pesquisa anterior. A detecção do parasito em outros sítios arqueológicos sul americanos, com base em resultados positivos para vários alvos moleculares para *Ascaris* sp., que incluem outras localidades brasileiras como Pedra Furada – PI e Boqueirão Soberbo-MG, e até mesmo outro país, como o sítio arqueológico Nombre de Jesus na Argentina, comprovam a circulação de *Ascaris* sp. no continente, proporcionando uma perspectiva paleoepidemiológica ao estudo. O fato de nem sempre os três alvos

moleculares usados terem sido detectados ao mesmo tempo na mesma amostra, indiretamente aponta para uma conservação diferencial do aDNA nas amostras.

Alguns dos haplótipos definidos para o gene *cytb* foram específicos para cada sítio arqueológico europeu estudado, Lübeck, na Alemanha e Waralversijde, na Bélgica. Contudo, os outros haplótipos definidos foram comuns aos sítios arqueológicos europeus e sul americanos. Já para o gene *nad1* foi observada uma maior especificidade regional, pois muitos dos haplótipos definidos foram encontrados em sítios arqueológicos únicos, como Walraversijde, na Bélgica, Tulán, no Chile e Nombre de Jesus, na Argentina. Quanto às amostras provenientes do Brasil, embora não se tenha encontrado uma especificidade por sítio arqueológico, pode-se observar uma especificidade regional, uma vez que os haplótipos definidos foram comuns à região sudeste, tendo sido identificados em dois sítios arqueológicos de Minas Gerais, Gruta do Gentio II e Boqueirão Soberbo; e da região nordeste, Sítio do Meio e Pedra Furada, no Piauí. Embora, deva-se ressaltar que um dos haplótipos definidos foi encontrado tanto no continente europeu quanto sul americano, tendo sido encontrado na Bélgica, Chile e no Brasil, tanto na região sudeste quanto nordeste.

O fato de se encontrar haplótipos comuns ao continente europeu e sul-americano para dois alvos moleculares, os genes *nad1* e *cytb*, mostra que alguns destes haplótipos já haviam se espalhado há pelo menos 8.000 anos, datação da amostra mais antiga em que este haplótipo foi identificado na América do Sul (Leles et al. 2008). Contudo, o fato de se encontrar haplótipos específicos para cada sítio arqueológico, indiretamente indica que estes tiveram tempo para diferenciar-se e/ou estabelecer-se em localidades específicas.

O encontro de haplótipos do gene *nad1* específicos para o sítio arqueológico de Tulán, no Chile, indiretamente corroboram o estudo de Iñiguez et al. (2006) que caracterizaram molecularmente *Enterobius vermiculares* em coprólitos provenientes deste mesmo sítio

arqueológico, os quais apresentavam mutações nucleotídicas encontradas somente em amostras deste sítio.

Curiosamente, as amostras do sítio arqueológico Nombre de Jesus mostram uma especificidade ainda maior em relação aos demais sítios da América do Sul, pois os novos haplótipos definidos para este sítio não foram encontrados em nenhum outro sítio arqueológico. As amostras provenientes deste sítio datam da época da colonização e os artefatos encontrados junto aos sepultamentos os identificaram como colonizadores espanhóis (Fugassa et al. 2006). Com base nestes dados, torna-se difícil afirmar se a infecção foi adquirida no continente americano ou trazida da Europa, época em que as condições de saneamento eram precárias e sendo o período da Idade Média o mais rico em achados paleoparasitológicos para os parasitos *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. (Bouchet et al. 2003, Gonçalves et al. 2003). Contudo, é interessante ressaltar que o número de ovos encontrados nestas amostras é extremamente pequeno, 5,1 ovos/g de fezes (Fugassa et al. 2006), se comparado ao material proveniente da Europa, em época correlata. Conclui-se com os dados da microscopia óptica e o fato de não ter sido encontrado um haplótipo comum a ambos continentes, mas somente específicos para o sítio Nombre de Jesus, que possivelmente a infecção tenha sido adquirida no continente americano.

Interessantemente foi o fato de se encontrar no Brasil haplótipos do gene *nad1* específicos por região, sudeste e nordeste. Para a região nordeste, embora os sítios arqueológicos datem de períodos diferentes, todos se encontram no Parque Nacional Serra da Capivara, não distantes geograficamente. O sítio Boqueirão da Pedra Furada tem sua importância arqueológica principalmente por apresentar atividades humanas desde o Pleistoceno, onde se encontram as evidências mais antigas da presença do homem nas Américas (Parenti 1996) Embora ainda se contestem estas datas, fato é que este sítio

arqueológico, além de ter sido abrigo para grupos caçadores-coletores em diversos períodos da pré-história, foi usado como centro cerimonial (Guidon et al. 2002). É de se supor que recebessem grupos vindos de localidades próximas e juntamente com eles os parasitos albergados pelos mesmos. Sendo assim, considerando-se que estes grupos interagiram por milhares de anos, é possível que determinados haplótipos ou “linhagens” de parasitos tivessem se estabelecido na região.

Já, na região sudeste, o haplótipo do gene *nad1* comum a esta região geográfica foi encontrado nos sítios arqueológicos Boqueirão Soberbo e Gruta do Gentio II, que são sítios próximos entre si, que se sobrepõe temporalmente, 3.610 a 1.385 AP. Pinturas rupestres sugerem que o sítio Boqueirão Soberbo foi um sítio amplamente visitado e utilizado ao longo de toda sua ocupação, podendo inclusive ter sido usado como um “centro” visitado por todas as populações locais, com o objetivo de executar várias atividades, dentre elas arte rupestre (Oliveira 2007). Portanto, seria plausível que os povos que habitavam estes antigos sítios arqueológicos se relacionassem e que determinada linhagem de parasito ou haplótipo tenha se dispersado nestas populações e/ou região, assim como o que se supõe para a região nordeste. Estes resultados são reforçados pelo fato de não se ter observado uma relação entre os haplótipos do gene *nad1* encontrados na Lapa Pequena, ou, em outras palavras, um haplótipo comum aos sítios Boqueirão Soberbo e Gruta do Gentio II com o sítio Lapa Pequena, o qual é um sítio arqueológico de ocupação mais antiga, de pelo menos 7.000 anos.

Trichuris sp.

A amostra moderna de *Trichuris* sp. do Brasil mostrou cinco polimorfismos de sequência no gene 18S rDNA quando comparado à sequência de *T. trichiura* disponível no GenBank (número de acesso DQ118536). Nenhuma das amostras arqueológicas gerou os produtos esperados para este alvo molecular, incluindo as amostras arqueológicas européias

usadas como controles positivos. Isto provavelmente se deve a variabilidade genética desta região, a qual, se também presente nas amostras arqueológicas, prejudicaria a hibridação dos oligonucleotídeos. Não se pode deixar de descartar o fato das sequências antigas do parasito diferir das modernas, fato que também prejudicaria a hibridação do oligonucleotídeos. Estes resultados apontam que outras metodologias extrações de DNA específicas para este parasito, assim como outras condições de PCR, precisam ser avaliadas. Contudo, recentemente, Oh et al. (2010) relataram o primeiro diagnóstico molecular de *Trichuris* sp. em material arqueológico, proveniente da Coreia. Os autores utilizaram o mesmo alvo molecular aqui avaliado, o gene 18S rDNA. No entanto, deve-se ressaltar que a amostra provém de uma tumba da Idade Média, construída durante a Dinastia Joseon (1392-1910), época de achados com alta quantidade de ovos. Deve-se também supor que as amostras estivessem em bom estado de conservação, pois os autores reforçam que a tumba estava coberta por uma grossa mistura de solo, aparentemente impermeável. Sendo assim, pode ser que uma condição anóxica tivesse prevalecido dentro da tumba e conseqüentemente o grau de degradação do DNA fosse menor que os normalmente observados em material arqueológico. Adicionalmente, as sequências nucleotídicas do parasito determinadas no material não mostraram variabilidade nucleotídica. Talvez todos os fatores supracitados tenham favorecido o sucesso no diagnóstico paleoparasitológico molecular de *Trichuris* sp. pelos autores.

Comparando-se os ensaios moleculares: PCR e hibridação

O diagnóstico molecular tanto para *Ascaris* sp. quanto para *Trichuris* sp. foi mais sensível ao ensaio molecular em que foi usada a hibridação de ácidos nucleicos. Para *Ascaris* sp. obteve-se resultados positivos mais do que três vezes o conseguido com a PCR, e para *Trichuris* sp. obteve-se 17 resultados positivos até então negativos para PCR. Deve-se destacar que estes são os primeiros resultados positivos para *T. trichiura* pelo diagnóstico molecular na

América do Sul. Assim como para PCR, pela hibridação a positividade maior para *Ascaris* sp. foi obtida usando-se o gene *nad1*. O fato de neste ensaio molecular também não se ter conseguido emissão de sinal para os três alvos moleculares em mesmas amostras, reforçam os resultados da PCR e a hipótese de estar havendo uma conservação diferencial do aDNA. Resultados distintos entre PCR e hibridação eram esperados, levando-se em conta a relação inversa entre sensibilidade e especificidade das abordagens usadas.

Os resultados moleculares da PCR e hibridação confirmaram o diagnóstico pela microscopia óptica de *Trichuris* sp. em uma amostra do sítio arqueológico Barreirinho-MG e também de dois ascarídeos na Gruta do Gentio II-MG, como sendo de *Ascaris* sp., ambos os sítios localizados no Brasil. Confirmou também os achados de *Ascaris* sp. nas amostras de Nombre de Jesus, na Argentina; e na Europa achados de *Ascaris* sp. no homem de Gallera e em duas amostras da Espanha. De fato, os resultados da PCR e hibridação mostram que tanto para *Ascaris* sp. quanto para *Trichuris* sp. está havendo subdiagnóstico, uma vez que amostras negativas ao microscópio óptico tanto para *Trichuris* sp. quanto para *Ascaris* sp. foram positivas pelo diagnóstico molecular. Contudo, amostras positivas para estes parasitos ao microscópio óptico foram negativas pelo diagnóstico molecular. Estes resultados mostram o importância do diagnóstico pela microscopia óptica, e que o ideal é sempre a aplicação das duas metodologias

Os resultados, apontam sobretudo para a ocorrência de uma forte associação *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. também na América do Sul, não só no período pré-colombiano como também no colonial. No Brasil, exceto pelos sítios do Meio-PI e Lapa Pequena-MG, a associação *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. foi observada em todos os sítios arqueológicos. Esta associação foi demonstrada também nos sítios Tulán e Tilliviche, no Chile, e Nombre de Jesús, na Argentina.

Os resultados da pesquisa mostram não somente a associação em um plano espaço-temporal, ou seja, presente no sítio arqueológico e/ou região em uma determinada época, mas ao se diagnosticar molecularmente *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. na mesma amostras, pode-se falar em coinfeção de indivíduos, sendo esta considerável, como aponta este estudo. Exceto pelo sítio arqueológico Tilliviche, no Chile, em todos os demais sítios foi observado que os indivíduos estavam coinfectados com *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. Como os sítios arqueológicos sul-americanos compreendem datações e grupos culturais distintos, que perpassam a época de grupos caçadores-coletores, horticultores, ceramistas, caçadores pescadores, dentre outros; questões como, modo de subsistência, tamanho populacional dos grupos e a dinâmica com que ocupavam seu espaço, são questões fundamentais para se entender a dinâmica destas parasitoses no passado. Seria, portanto, prematuro fazer suposições quanto a prevalências e/ou taxas de infecções nestes povos. Estudos posteriores devem ser realizados na tentativa de correlacionar todas as questões supracitadas com prevalências e cargas parasitárias no passado.

Os dados desta pesquisa fornecem também um aporte ao conhecimento das parasitoses no período colonial brasileiro, período este onde o material é escasso, e, conseqüentemente, de resultados pouco expressivos para as parasitoses intestinais. Porém, os resultados positivos para *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. somente pela técnica de hibridação para o material do período colonial se devem às características do sítio. A recuperação deste material só foi possível em virtude da restauração feita na igreja Nossa Senhora do Carmo (antiga Capela Imperial e Catedral do Rio de Janeiro) como parte das comemorações dos 200 anos da vinda da família real para o Brasil, donde provém sua importância histórica. Atualmente esta igreja se localiza na Praça XV, no centro da cidade do Rio de Janeiro. Em suas primeiras edificações que se

iniciaram em 1589, é possível observar a proximidade do mar (Figura 25) (Caldeira et al. 1997).



Figura 25. Esquema da evolução das edificações e acontecimentos históricos ocorridos na Igreja Nossa Senhora do Carmo. **A:** primeira edificação. **B:** Consagração de Dom Pedro I como imperador do Brasil. **C:** uma de suas últimas edificações em um contexto já urbanizado. **D:** conformação atual da Igreja na Praça XV, centro do Rio de Janeiro-RJ.

Fonte: <http://pt.wikipedia.org>

Durante as escavações o material recuperado do subsolo, tanto os ossos quanto os sedimentos, estavam em geral muito úmidos ou mesmo encharcados (Figura 26).



Figura 26. Um dos sepultamentos escavados na Igreja Nossa Senhora do Carmo em 2008, mostrando ossos e sedimentos na altura do lençol freático.

Foto: Alena Mayo Iñiguez

Estas condições pouco favoráveis à preservação do material provavelmente são a causa da baixa concentração e a má qualidade de aDNA recuperada neste sítio arqueológico. Vale ressaltar que com este material foi possível a recuperação de DNA mitocondrial humano pela técnica de PCR e a classificação de haplogrupos e haplótipos (Iñiguez et al. 2009). Porém, a detecção de DNA humano neste material era esperada. Mesmo que este estivesse comprometido, certamente estaria em maior concentração tanto nos ossos quanto nos sedimentos. O mesmo já não seria esperado para os parasitos, se os indivíduos não estivessem infectados ou tivesse carga parasitária baixa. Ainda que as amostras tenham sido coletadas segundo as técnicas alternativas de coleta para parasitos intestinais, as quais recomendam que sedimentos sejam removidos da região da pelve e forames do sacro, para uma maior recuperação de parasitos intestinais (Jones 1988, Reinhard et al. 1992), todas as amostras foram negativas ao microscópio óptico para *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. Este fato conduz à hipótese da baixa concentração e qualidade de DNA, o que também foi observado pela

espectrometria (2,2 a 4,5 ng/ μ l). Resultados similares foram obtidos em outra pesquisa que trabalhou com material deste sítio, com o objetivo de investigar a presença de *Mycobacterium tuberculosis*, mostrando-se negativos para PCR e positivos para hibridação desta micobactéria (Iñiguez et al. 2009).

Neste estudo apresentamos também os primeiros resultados positivos para parasitos intestinais em um sítio arqueológico do tipo sambaqui no Brasil, Cubatão I-SC. Sambaquis são definidos pela arqueologia como montículos de conchas construídos pelos primeiros ocupantes do litoral brasileiro antes da chegada dos primeiros europeus (Gaspar 2000). No sambaqui trabalhamos com amostras de solo, as quais podem ser consideradas amostras ambientais e, portanto, conter uma infinidade de microrganismos. A identificação com base na sequência nucleotídica de *Pellioiditis marina* é plausível, uma vez que estes nematóides são metazoários bentônicos abundantes em ambiente marinho, ambiente o qual os sambaquis estiveram expostos. A identificação com base na sequência proteica de *Caenorhabditis elegans*, também é possível por se tratar de um nematóide de vida livre que está presente no solo. Questões referentes à preservação do material de estudo parecem ser preponderantes para a não recuperação de parasitos nos sambaquis. Este aspecto é reforçado, principalmente, por não se encontrar ovos de parasitos, especialmente os de casca resistente como *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp., mesmo na camada mais superficial, onde até recentemente antes da exploração do sítio, animais certamente estiveram. Alguns artigos relacionam diferentes concentrações de amônia, pH e temperatura a quebra de ovos de *Ascaris* sp. (Nordin et al. 2009, Pecson et al. 2005 e 2007). Neste sambaqui grande quantidade de ossos de peixes foi encontrada, e, como se sabe, o material excretado por esses animais é principalmente a amônia. Sendo assim, há que se pensar que grandes concentrações desse elemento estivessem presentes no sítio, se não

atualmente, na época contemporânea à ocupação do sítio. Foi feita uma análise desse elemento no solo coletado deste sítio. Porém, este elemento é muito volátil e instável, o que acarreta muitas mudanças nas suas concentrações ao longo do tempo, não permitindo no momento maiores conclusões. Devido à alta umidade, foi cogitada a hipótese da ação de fungos nematófagos à época de ocupação do sítio, ou mesmo que pudessem estar presentes atualmente. Porém, pelo menos numa análise inicial, sua presença nos tempos atuais não foi confirmada, uma vez que nenhuma espécie de fungo cresceu quando usada a técnica de espalhamento de solo. Como os esporos destes fungos, que são as estruturas que se preservariam no material arqueológico, não foram pesquisados, a hipótese de que fungos nematófagos estivessem presentes no material, quer à época de ocupação do sítio ou mesmo em períodos subsequentes, mas ainda assim mais antigos que os tempos atuais, não pode ser descartada. Assim, as questões acima supracitadas podem ser responsáveis pela baixa concentração de DNA recuperada deste material. Contudo, o fato dos resultados da hibridação terem dado positivo para ambos os parasitos *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. para todas as amostras deste sítio e para todos os alvos moleculares sugerem que esta técnica molecular é mais apropriada para o estudo deste material e conseqüentemente de sambaquis do que a PCR. O fato dos sepultamentos analisados no estudo encontram-se distantes e, portanto, uma possível contaminação entre sepultamentos não ser plausível, asseguram as observações feitas acima.

A propósito dos resultados positivos obtidos usando vários alvos moleculares para o diagnóstico de *Ascaris* sp., e também para *Trichuris* sp., os quais compreenderam várias amostras e vários sítios arqueológicos sul americanos, definitivamente, mudam o cenário paleoepidemiológico até então conhecido para estas infecções.

5.5 Mudanças epidemiológicas nas infecções por *Ascaris* e *Trichuris*: uma história evolutiva contada pelos achados arqueológicos

Como já mencionado nesta pesquisa, *Ascaris lumbricoides* é um parasito de distribuição cosmopolita e, dentre os parasitos intestinais humanos, é o mais prevalente na população mundial (Crompton 1999), formando com *Trichuris trichiura* uma das associações parasitárias mais encontradas atualmente (Rey 2008). Provavelmente pelo mecanismo de transmissão e metabolismo semelhante, ocupação de nichos muito próximos fora do hospedeiro, grande quantidade de ovos eliminados e ainda a resistência de seus ovos, assim como nos tempos atuais pôde-se observar pelos trabalhos de Gonçalves et al. (2003) e Bouchet et al. (2003) que *A. lumbricoides* e *T. trichiura* também são os parasitos mais frequentemente encontrados em material arqueológico.

Porém, como já mencionado, na América do Sul, o encontro de ovos de *A. lumbricoides* tem sido muito raro. Recentemente o uso de técnicas de biologia molecular apontou para um sub-diagnóstico de *Ascaris* sp. na América do Sul pré-Colombiana. Atualmente a infecção por *A. lumbricoides* é predominante, ao contrário do observado no material arqueológico, quando predominam achados de *T. trichiura*. Isto parece contraditório, em virtude do número de ovos eliminados por cada parasito (200 mil e 20 mil por dia e por fêmea, para *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, respectivamente). Ao se reverem os achados destes parasitos em material arqueológico, discutem-se os fatores que poderiam ser responsáveis por este paradoxo como (1) alteração por fungos nematófagos, (2) uso de plantas medicinais, (3) mudanças no número de ovos eliminados e aspectos ecológicos parasito-hospedeiro e (4) aspectos ambientais e tafonômicos (Leles et al. 2010c, Anexo V).

Como observado na tabela 18 na sessão de resultados, achados de *Trichuris* sp. têm sido muito comuns em material arqueológico na América do Sul pré-colombiana, mas não de *Ascaris* sp. Ao levar em conta a forte associação entre *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, Leles et al. (2008, Anexo IV) usaram como pista no rastreamento de *Ascaris* sp, amostras da América do Sul positivas para *T. trichiura* e negativas para *Ascaris* sp. Com o uso das técnicas de diagnóstico molecular, não só o artigo supracitado, mas também os resultados desta pesquisa comprovaram a existência de *Ascaris* sp. nestas e em outras amostras. O diagnóstico molecular tem comprovado a existência de *Ascaris* sp. em material arqueológico da América do Sul negativos pela microscopia ótica e apontam para um sub-diagnóstico de *Ascaris* sp. Sendo assim, o mesmo poderia estar ocorrendo em amostras provenientes de outras partes do mundo. Então, porque os ovos de *Ascaris* sp. não são encontrados nestas amostras? A seguir, discutiremos quatro aspectos que consideramos possam estar influenciando os resultados até então observados.

(1) Ação de fungos nematófagos

O “controle biológico” tem sido apregoado como forma de controle das helmintíases, principalmente nas espécies animais onde a resistência a anti-helmínticos vem crescendo (Larsen 1999, Mota et al. 2003). Fungos nematófagos comportam-se como antagonistas naturais de nematóides e, até o momento, foram catalogadas mais de 150 espécies, divididas em três grupos: predadores de nematóides, endoparasitos e oportunistas parasitos de ovos. Muitos gêneros como: *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Manascroporium* têm demonstrado eficácia no controle de diversas parasitoses (Mota et al. 2003). Estes fungos estão distribuídos em todo o mundo e em todos os tipos de clima (Gray 1987). Braga et al. (2007) comprovaram a atividade ovicida do fungo *Verticillium chlamydosporium* sobre *Ascaris lumbricoides*, assim

como Araújo e col. (2008b) do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre ovos de *Ascaris suum*. No Brasil gêneros de fungos nematófagos têm sido encontrados atualmente em regiões próximas aos sítios arqueológicos como Arinas (Ribeiro et al. 1999), próximo a Unaí, onde fica o sítio arqueológico Gruta do Gentio II; Janaúba e Porteirinha (Ribeiro et al. 2003), próximas à cidade de Varzelândia, onde fica o sítio arqueológico Boqueirão Soberbo; e Montes Claros, onde fica o sítio arqueológico Lapa Pequena. Estes achados demonstram que tais fungos também poderiam estar presentes em épocas passadas. Porém, poucos dos artigos avaliados fizeram menção à análise de fungos. Fugassa et al. (2006) mencionam a presença de esporos e hifas de fungos em sedimento retirado da região pélvica de material do século XVI e Reinhard et al. (1988) descrevem ataque de fungos a ambos os ovos de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. em sedimentos de latrinas. Ainda que essa não seja uma linha de pesquisa muito difundida na paleoparasitologia, essa abordagem poderia explicar a baixa quantidade de ovos encontrada em alguns sítios arqueológicos, mas nos parece que não explicaria os achados negativos de um destes parasitos quando o outro está presente, a não ser que estejam aí embutidas questões acerca de uma resistência diferencial da casca dos ovos de *Ascaris* e *Trichuris* que permitam uma maior eficácia na destruição de um ou outro parasito.

(2) Uso de plantas medicinais e redução no nível da infecção

Não há dúvidas de que o povo pré-histórico das Américas tinha uma extensa farmacopéia baseada nas plantas medicinais nativas (Reinhard et al. 1985, Chaves e Reinhard 2006, Moerman 2009). Análises palinológicas revelaram que três gêneros de plantas: *Anacardium*, *Borreria*, e *Terminalia* foram usadas para tratar infecções ou sintomas de infecções parasitárias no nordeste do Brasil há 8.500 - 7.000 anos (Chaves and Reinhard 2006). Análises de coprólitos com datação aproximada de 9.000 anos do Platô do Colorado sugeriram que plantas anti-helmínticas faziam parte da dieta local (Reinhard et al. 1985). Um

códice (manuscrito antigo) Asteca ilustra o uso de plantas anti-helmínticas até a colonização espanhola (Montellano 1975). Estes exemplos ilustram não só a disponibilidade “material”, mas também um difundido conhecimento da “medicina” na pré-história. Alguns artigos discutem a ação dos medicamentos anti-helmínticos naturais (Reinhard 2004) ou sintéticos serem mais eficazes no combate a *Ascaris* sp. do que *Trichuris* sp. (Muchiri et al. 2001, Legesse et al. 2002, Saathoff et al. 2004, Zani et al. 2004). Keiser e Utzinger (2008) fizeram uma revisão sistemática e meta – análise, avaliando a eficácia de quatro dos medicamentos mais usados no combate às helmintíases, mostrando que doses únicas são muito eficazes contra *Ascaris lumbricoides* e insatisfatórias contra *Trichuris trichiura*.

Chenopodium sp., planta medicinal com ação vermífuga, foi mencionada em cinco artigos analisados e em alguns destes apontada como possível explicação para a ausência de *Ascaris* sp. ou baixa quantidade de ovos de um e/ou outro parasito (Greig 1981, Hall et al. 1983, Reinhard et al. 1987, Reinhard, Domellier-Espejo et al. 1998). Grãos de pólen de plantas nematófagas também foram mencionados por Evans et al. (1996) na África; e pólen de *Chenopodium* sp e *Bauhinia* sp, outra planta com ação vermífuga, também tem sido encontrado em alguns coprólitos da América do Sul (Chaves e Renault-Miskovsky 1996, Chaves e Reinhard 2006). Estas mesmas observações foram feitas no sítio histórico de Albany, em Nova York. As latrinas das casas de classe alta, onde os indivíduos tinham acesso a vermífugos mostraram uma redução de *A. lumbricoides* em relação aos indivíduos de classe mais pobre. Porém, os números de ovos *T. trichiura* são comparáveis para ambas as classes econômicas.

T. trichiura é adaptado ao intestino, prende-se à mucosa pela extremidade anterior. Já *A. lumbricoides* vive livre no intestino, se mantendo nele por esforço muscular incessante contra o fluxo intestinal (Rey 2008). Sendo assim, pode-se supor que, não estando aderido ao

intestino como *T. trichiura*, *A. lumbricoides*, seria mais suscetível aos efeitos dos anti-helmínticos, cujo efeito, em geral, causa paralisia muscular.

Quando se compara a possibilidade de *T. trichiura* e *A. lumbricoides* serem eliminados do hospedeiro, *A. lumbricoides* é menos resistente a todos os tratamentos, como a ingestão pelo hospedeiro de alto conteúdo de fibras ou de plantas medicinais vermífugas. Nos coprólitos da América do Norte geralmente são encontradas grandes quantidades de fibras insolúveis (Informação pessoal, Dr. Karl Reinhard, Universidade de Nebraska). Estas fibras, em alta quantidade, poderiam contribuir para a eliminação de vermes adultos de *A. lumbricoides*.

Estas evidências etnográficas e arqueológicas, se somadas à resistência diferencial de *T. trichiura* e *A. lumbricoides* a anti-helmínticos, são muito relevantes no esclarecimento desta enigmática ausência de ovos de *Ascaris* sp. no Novo Mundo, aonde, mesmo com um sistema sanitário não estabelecido, estes cuidados básicos seriam suficientes para manter a infecção por *Ascaris* sp. em um nível mínimo, e até mesmo *Trichuris* sp., uma vez que, mesmo presente, a quantidade de ovos encontrada é sempre muito baixa. O mesmo já não seria verdadeiro para o Velho Mundo, principalmente na Idade Média, período onde já havia um adensamento populacional considerável e conhecido por condições sócio-econômicas e de saúde coletiva extremamente deficientes.

Ainda hoje estas observações parecem verdadeiras. Em comunidades ribeirinhas da Amazônia, como no município de Santa Isabel do Rio Negro, que são constantemente monitoradas e tratadas para helmintíases, tem se observado uma diminuição na prevalência para *A. lumbricoides*, mas o mesmo não é verdadeiro para *T. trichiura*. Ou seja, em populações mais próximas de um ambiente natural e com algum tipo de tratamento, tanto

Ascaris sp. quanto *Trichuris* sp. se mantêm. No entanto, o perfil observado se parece com o que tem sido constatado na pré-história.

(3) Diferenças no número de ovos e ecologia destes parasitos

Embora a associação de *Ascaris* sp.-*Trichuris* sp. em humanos tenha surgido há muito tempo, a associação datada mais antiga é o achado do sítio Kruger Cave, na África do Sul, há 10.000 anos (Evans et al. 2006). Pode-se dizer que esta associação tem sido um “sucesso” evolutivo na sua interação com seu hospedeiro humano. Existem duas espécies de parasitos muito próximas à dos humanos que infectam o porco, *Ascaris suum* e *Trichuris suis*. Como já mencionado, há um interessante debate acerca da origem da infecção humana por *A. lumbricoides*, se esta se originou antes ou depois da domesticação do porco. Em outras palavras, se *A. lumbricoides* emergiu como uma espécie nova em humanos, adquirida depois da domesticação de *Sus scrofa*, ou se a espécie do parasito de humanos foi transferida aos porcos (Loreille e Bouchet 2003). A primeira hipótese nos leva a pensar que a infecção humana apareceu aproximadamente há 10.000 anos. A segunda hipótese nos diz que *A. suum* apareceu como consequência da domesticação do porco, e todos os *Ascaris* sp., previamente encontrados nos achados arqueológicos, seriam de *A. lumbricoides*. A segunda hipótese é apoiada pelo achado de ovos de *Ascaris* sp. que datam de 30.000 anos, em uma caverna na França onde nenhum resto de porco doméstico ou selvagem foi identificado. Os autores concluíram que as amostras provavelmente eram de *A. lumbricoides* (Bouchet et al. 1996). Isto significaria que *A. lumbricoides* evoluíram primeiro e eram ancestrais a *A. suum*.

Análises do gene ribossomal 18S mostram que a ordem Trichocephalida surgiu primeiro que a Ascaridida (Blaxter et al. 1998, Dorris et al. 1999). Sendo assim, *T. trichiura*, em uma escala evolutiva com bases em dados genéticos, é ancestral com relação à *A. lumbricoides*. Apesar de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. humanos poderem ter origens filogenéticas

(adquirido de primatas não humanos), a maioria dos achados em primatas não humanos se refere a *Trichuris* sp. somente, ou quando associado a *Ascaris* sp., *Trichuris* sp. é mais prevalente, inclusive em populações naturais (Hennessy et al. 1994, Kenezovich 1998, Munene et al. 1998, Muriuki et al. 1998, Gotoh 2000, Gotoh et al. 2001, Hahn et al. 2003, Mutani et al. 2003, Gillespie et al. 2004, Legesse e Erko 2004, Jones-Engel et al. 2004, Chapman et al. 2005, Gillespie et al. 2005, Kalema-Zizusoka et al. 2005, Weyher et al. 2006, Levecke et al. 2007, Reichard et al. 2007, Bezjian et al. 2008, Córdon et al. 2008, Gillespie e Chapinan 2008, Lim et al. 2008, Teichoreb 2009). Pode se dizer que estas observações indiretamente apontam para que *Trichuris* sp. seja melhor adaptado a primatas não humanos e conseqüentemente a humanos do que *Ascaris* sp. Assim, o maior número de achados de *Trichuris* sp. em primatas não humanos, somados aos dados da evolução do gene 18S, parecem corroborar que esta espécie está realmente adaptada à espécie humana há mais tempo do que *Ascaris* sp.

Estudos integrados de epidemiologia e ecologia mostram que não necessariamente longas relações parasito-hospedeiro evoluam para uma relação de “benignidade”, entenda-se benignidade expressa em termos reprodutivos. Às vezes o aumento da virulência é expresso em uma reprodução aumentada, e isto já foi observado em microparasitos (Galvani 2003). Sendo assim, extrapolando-se estas observações para macroparasitos, seria possível que no passado *Trichuris* sp. eliminasse mais ovos que *Ascaris* sp. ou este teria começado a produzir mais ovos que *Trichuris* sp. ao longo do tempo?

Sabe-se que o número de ovos eliminados por dia por estes parasitos dependem de numerosos fatores, os quais, frequentemente, não podem ser recuperados do material arqueológico. Porém, *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. são os parasitos intestinais melhor representados no material arqueológico, e o mais próximo do que se pode ter de uma

perspectiva paleoepidemiológica. Seria muita coincidência achar o mesmo padrão de distribuição de ovos em quase todas as amostras. Os dados são incontestáveis quanto ao maior número de ovos de *T. trichiura* em relação a *A. lumbricoides* nos achados arqueológicos. Vinte e seis artigos mencionaram número de ovos, e ovos de *T. trichiura* foram mais abundantes na maioria deles. As relações do número de achados que mencionam mais ovos de *T. trichiura* comparado a *A. lumbricoides* são as seguintes: Europa 20:3; África 1:0; Ásia 2:1; América do Norte 5:3; América do Sul 1:0.

Sabe-se que em infecções intensas uma fêmea de *T. trichiura* elimina 20.000 ovos por dia (Maldonado 1956), enquanto uma fêmea de *A. lumbricoides* pode eliminar até 200.000 ovos por dia (Brown e Cort 1927). Logo, *A. lumbricoides* eliminam dez vezes mais ovos que *T. trichiura*. Já na década de 50, Taylor argumentara em favor de suas amostras serem realmente antigas, pelo fato de atualmente mais ovos de *Ascaris* sp. serem encontrados em fezes suínas do que *Trichuris* sp., enquanto o observado por ele em suas amostras eram maior número de ovos de *Trichuris* sp., ou seja, as amostras antigas teriam um perfil diferente das modernas quanto ao número de ovos destes dois parasitos (Taylor 1955). Porém, o que aparentemente é incongruente, dado o número de ovos eliminados por cada parasito, é a maior quantidade de ovos encontrada não ser de *Ascaris* sp., mas sim de *Trichuris* sp. no material arqueológico.

A diferença no número de ovos observada no material arqueológico não parece ser uma questão puramente metodológica, uma vez que embora os ovos degradem no material arqueológico, ainda assim são identificáveis. Portanto, podemos também explorar algumas questões inerentes à “ecologia” destes parasitos. Se *Trichuris* sp. tivesse maior número de fêmeas que *Ascaris* sp. dentro do hospedeiro, o resultado final poderia ser de mais ovos de *Trichuris* sp. eliminados. Esta questão pode ser entendida diante de uma perspectiva de

espaço, em função da diferença de tamanho dos dois parasitos. Sendo *Trichuris* sp. bem menor que *Ascaris* sp., mais exemplares daquele poderiam estar presentes, mesmo ocupando nichos diferentes dentro do hospedeiro. Outra abordagem poderia ser explorada no sentido da competição entre espécies ou, neste caso, principalmente intra - espécies. Mecanismos densidade-dependente estão presentes em populações parasitárias e são reconhecidos como importantes fatores impeditivos do aumento exponencial de populações parasitárias. Esta regulação pode refletir diretamente na taxa de produção dos ovos ou indiretamente através da diminuição do crescimento, atraso na maturação e/ou redução do ciclo de vida. Mecanismos de densidade dependente foram detectados em *A. lumbricoides* (Shotak & Scott 1993). Embora menos provável, não se pode deixar de considerar uma competição entre espécies. Se analisada a partir dos tempos modernos, esta hipótese seria pouco plausível, pois embora ambos parasitos habitem o intestino, ocupam nichos relativamente distantes para competirem diretamente por alimento ou espaço. No entanto, será possível supor que, no passado, no início da relação *Ascaris* sp. - *Trichuris* sp. no hospedeiro, ambos competissem diretamente por espaço e alimento? Poulin (2007) pontua que a não interação e/ou competição direta de alguns parasitos por espaço e/ou alimento podem ser reflexo de cenários de intensa competição no passado. Diante dessa perspectiva, o parasito mais desfavorecido naquele dado momento teria procurado outras vias e até mesmo outro nicho, neste caso, mais provavelmente, *Ascaris* sp. Se for verdadeiro que *Trichuris* sp. estivesse mais bem adaptado à espécie humana, é possível que *Ascaris* sp., desfavorecido naquele dado período de adaptação, tenha, como estratégia de sobrevivência, diminuído sua fecundidade; conseqüentemente, as idéias expostas acima sobre o número de fêmeas e ovos eliminados seria verdadeira. A hipótese de mais fêmeas de *Trichuris* sp. estarem presentes e conseqüentemente maior número de ovos terem sido

eliminados em relação à *Ascaris* sp., no passado, já havia sido levantada para o sítio Pearl Street na América do Norte (Reinhard 2004).

(4) Influência do ambiente e de aspectos tafonômicos

Finalmente, o aspecto que acreditamos ser preponderante, é que a possibilidade de diferenças preservacionais em ovos de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. reflita efeitos pós-deposicionais cruciais para o entendimento da paleodistribuição destes parasitos. Fouant et al. (1982) discutem a possibilidade do clima “seco” ser o responsável pela baixa quantidade de ovos de *Trichuris* sp. encontrados na amostra por eles analisada, já que este exigiria uma passagem em solo úmido, e um clima muito seco inibiria o embrionamento, e conseqüentemente, a transmissão do parasito. O clima seco também poderia justificar a baixa quantidade de ovos de *Ascaris* sp. encontrada em alguns sítios arqueológicos. Esse fator poderia expressar ainda a baixa quantidade de ovos de *Trichuris* sp. encontrados em outros sítios da América do Sul onde o principal fator formador do coprólito é a dessecação; condições de clima seco eram vigentes em épocas passadas nesses sítios. Kobayashi et al. (1984) fizeram experimentações em solos intencionalmente contaminados com *A. suum* em diferentes condições de temperaturas e avaliaram a recuperação dos ovos quanto à degeneração e embrionamento. Foi observado que, no nível mais superficial do solo submetido à forte luz solar, quase 100% dos ovos degeneraram e conseqüentemente não embrionaram. Larsen & Roepstorff (1999) colocaram fezes suínas infectadas com *A. suum* e *T. suis* em grama a 2 cm abaixo da superfície do solo, e avaliaram a recuperação dos ovos sob várias condições de temperatura. Os autores mostraram que a porcentagem de desaparecimento dos ovos de *A. suum* é maior que a de *T. suis* e que esta é ainda significativamente superior nos meses ensolarados. É possível que o mesmo tenha ocorrido no passado, tanto com fezes suínas quanto humanas. Seria válido fazer um experimento da

mesma natureza em fezes humanas, mas em condições extremas de temperatura, a fim de aproximar as condições formadoras dos coprólitos, principalmente os da América do Sul.

Hall et al. (1983), após suas preparações palinológicas, observaram que a quantidade de ovos de *Trichuris* sp. diminuiu e os de *Ascaris* sp. praticamente desapareceram. Parece-nos que a observação dos autores apontam para uma quebra diferencial dos ovos de ambos os parasitos. É possível que isso não seja verdadeiro somente em preparações palinológicas, ou durante algumas das preparações para análises de parasitos, mas sim durante a própria formação dos coprólitos. Os fatores ambientais já discutidos podem estar potencializando e/ou sobrepondo-se ao tafonômico, já que além de influenciar negativamente o embrionamento, estaria provocando a degeneração dos ovos, e como apontado por Larsen & Roeptorff (1999), esta seria maior para os ovos de *A.suum* comparados aos de *T. suis*. A maioria dos artigos tem relatado boa preservação para ambos os ovos de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp., ou quando relatam danificações, geralmente se referem à falta da casca mamilonada de *Ascaris* sp. e as rolhas polares ou *plugs* de *Trichuris* sp., o que não interfere na contagem dos ovos, uma vez que ainda assim são identificáveis. Adicionalmente, Taylor (1955) e Szidat (1944) reforçam a extraordinária preservação dos ovos de *Trichuris* sp., assim como Andrews (1976) relata ser comum observar fragmentos da casca de *Ascaris* sp. em material arqueológico, Bathurst (2005) também relata ter encontrado muitos ovos de *Ascaris* sp. quebrados, e Fugassa et al. (2006) encontraram fragmentos da casca de ovo de *Ascaris* sp. (Figura 27). Particularmente os materiais por nós analisados no laboratório, como os provenientes dos sítios arqueológicos de Walraversijde, na Bélgica, e Lübeck, na Alemanha, corroboram as observações feitas pelos autores.

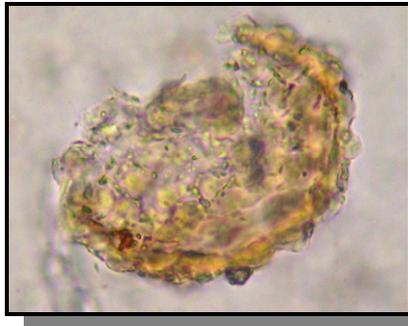


Figura 27: Ovo quebrado de *Ascaris* sp. em material da Patagônia (XVI).
Fonte: Fugassa et al. 2006.

É importante lembrar que os efeitos citados acima se aplicam principalmente a sítios arqueológicos de ambiente aberto. No entanto, muitos dos achados se referem a latrinas ou mesmo coprólitos encontrados em cavernas e/ou corpos mumificados que estão em ambientes fechados. Portanto, este fator não deve ser considerado universal, assim como os outros também não podem ser excluídos.

Outros aspectos

Aspectos como o tamanho das populações pré-históricas, podem também, estar envolvidos na paleodistribuição de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. As populações pré-históricas atingiram diferentes tamanhos e estiveram organizadas e distribuídas de forma distinta ao longo do tempo e das diferentes localidades de território americano. Entre os grupos nômades de caçadores-coletores e horticultores sedentários, as parasitoses se comportaram de maneira diferente (Reinhard et al. 1987). No entanto, os parasitos analisados aqui têm o mesmo ciclo de transmissão e habitam nichos próximos, fora do hospedeiro. Portanto, este fato por si também não explicaria a diferença no número de ovos. Ácaros, demais microrganismos coprofágicos, outros artrópodes, ou qualquer microrganismo que possa alterar a preservação orgânica também devem ter afetado a preservação dos ovos destes parasitos. No entanto, a menos que tais microrganismos tenham predileção por um ou outro parasito, tais fatos explicariam a paleodistribuição diferencial destes dois parasitos.

Interações entre espécies podem ser positivas, ou seja, uma se beneficiar da outra. Tchuem Tchuente et al. (2003) encontraram interação sinérgica entre *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp., mostrando que indivíduos com alta carga parasitária para um dos parasitos tinham uma probabilidade maior de ter alta carga parasitária para outro também. Se isto for verdadeiro, a paleodistribuição de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. poderia ser parcialmente explicada. Na América do Sul, mesmo as amostras positivas para *T. trichiura* apresentam baixa quantidade de ovos (Ferreira et al. 1982, Araújo et al. 1984, Ferreira et al. 1989, Gonçalves et al. 2003). Se extrapolarmos tais achados em termos de carga parasitária, isto explicaria a baixíssima quantidade de achados de *Ascaris* sp. na América do Sul. Já no Velho Mundo, vemos um quadro oposto, especialmente na Idade Média, onde muitos ovos de ambos os parasitos são encontrados nas amostras. Novamente isto explicaria o baixo número de ovos encontrados na América do Sul, mas não a ausência de um quando o outro está presente. Porém, dados imunológicos apontam para uma associação negativa entre *A. lumbricoides* e *T. trichiura*, onde uma prejudicaria a outra (Benk 2008, Bradley e Jackson 2008), o que poderia explicar a predominância de uma espécie em relação à outra nos achados arqueológicos.

Características genéticas do hospedeiro de susceptibilidade à infecção por *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp., também devem ser consideradas. Williams-Blangero et al. (1999, 2002, 2008a e 2008b) evidenciaram que há fatores genéticos envolvidos na susceptibilidade às infecções por *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. Neşjum et al. (2009) estudando a interação *A. suum* - *T. suis* demonstraram forte componente genético envolvido na resistência à infecção por estes parasitos em porcos. As evidências apontam que associações positivas e negativas, bem como componentes genéticos e imunológicos de susceptibilidade e resistência às infecções por *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp., possam também ter operado no passado e contribuído para a paleodistribuição observada. No entanto, tais fatores precisam ser melhor estudados.

Outro dado que poderia ser muito esclarecedor seria mencionar a existência de ovos inférteis, e quantificá-los, quando estes forem observados no material. Particularmente para *Ascaris* sp. ovos inférteis tem morfologia bem distinta, sendo relativamente fáceis de serem identificados. Constatada a infertilidade dos ovos, prosseguir-se-ia com a caracterização molecular destes ovos. Peng et al. (2003) estudaram os genótipos da região *ITS1* de *Ascaris* sp. em fezes de origem humana da China que continham grande quantidade de ovos inférteis e sugeriram que estes pertenciam ao genótipo mais prevalente em suínos. Ou seja, em outras palavras, a população humana estaria infectada com o parasito de suíno ou com subpopulações de *Ascaris* sp. pouco adaptadas à espécie humana, sugerindo que estas ainda estariam em processo de adaptação. Informações dessa natureza seriam extremamente valiosas para a paleoparasitologia, principalmente no que tange aos achados da Idade Média, onde o contato entre as espécies humanas e suínas, assim como adensamento populacional e precárias condições de saneamento básico se acentuaram.

Em suma, embora a associação parasitária levantada em material arqueológico ocorra, basicamente, no plano espaço-temporal, já que são poucos os achados que podem ser atribuídos ao mesmo indivíduo, os aspectos apontados são igualmente relevantes. Esta revisão também mostrou que pesquisas multidisciplinares são essenciais e que informações sobre achados de plantas medicinais, fungos nematófagos, ovos inférteis, aspectos ambientais e tafonômicos, assim como quantidade de ovos devam ser igualmente avaliados no material. Análises estatísticas devem ser feitas quando possível, não só para verificar alterações na morfologia dos ovos (Araújo 1988, Confalonieri et al. 1988), mas principalmente para avaliar diferenças na resistência/fragilidade na casca dos ovos quando submetidos a diferentes condições ambientais, a fim de averiguar a quebra diferencial destes ovos.

Todos os fatores citados devem ter contribuído para a paleodistribuição observada para *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp., porém parece que os fatores tafonômicos e plantas medicinais tiveram maior influência. No entanto, ovos de *T. trichiura* foram observados em maior número também em ambientes onde altas temperaturas não prevaleceram no passado. Portanto, a menos que *A. lumbricoides* quebre dez vezes mais que *T. trichiura* (considerando o número de ovos eliminados por cada uma destas espécies), uma mudança na produção de ovos destes parasitos ao longo do tempo não pode ser descartada. Como já mencionado, estudos de epidemiologia e ecologia de microparasitos têm mostrado que relações de longa duração parasito-hospedeiro não necessariamente “enfraqueçam” com o passar do tempo. Às vezes a virulência e patogenicidade se tornam aumentadas, e este aumento é expresso em um maior potencial reprodutivo (Galvani 2003).

O comportamento de parasitos e seus hospedeiros mudam ao longo do tempo. Um exemplo foi estudado entre os índios Surui da Amazônia. Recentemente, as infecções por *A. lumbricoides* e *T. trichiura* foram negativas, enquanto a prevalência para *Hymenolepis nana* foi de mais de 20%. Estas prevalências foram inversas há dez anos (Palhano-Silva et al. 2009). Ausência ou baixa prevalência para *A. lumbricoides* e *T. trichiura* foram também observadas entre índios Yanomami, e inferências pré-históricas foram feitas refletindo cenários antigos (Confalonieri et al. 1991). Assim, sítios pré-históricos bem datados que compreendam amplo espectro de tempo devem ser estudados quanto ao aumento/diminuição de ovos de determinados parasitos ao longo do tempo.

Pensamos ainda que a abordagem paleoparasitológica possa estar começando a romper outras fronteiras, e os dados levantados possam ser um indicativo de algumas das estratégias evolutivas usadas por esses dois parasitos ao longo do tempo. O que antes eram suposições teóricas podem estar, na verdade, “impressas” nos achados paleoparasitológicos.

6 CONCLUSÕES

6.1 Avaliando a variabilidade intra-indivíduo de *Ascaris* sp.

Artigo 1: Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Iñiguez AM (2009). Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new Brazilian *Ascaris* sp. genotype. *Vet Parasitol* 163: 167-170.

Artigo 2: Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Iñiguez AM (2010). *ITS1* intra-individual variability of *Ascaris* isolates from Brazil. *Parasitol Int* 59: 93-96.

- A alta variabilidade intra-indivíduo na região *ITS1* de *Ascaris* sp. de origem humana, no Brasil, indica que o uso deste alvo molecular para diferenciar espécies próximas como *Ascaris suum* e *Ascaris lumbricoides* não é recomendado.

6.2 Caracterização dos genes mitocondriais *nad1* e *cox1* de *Ascaris* sp. do Brasil.

Artigo 3: Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Rodrigues MLA, Dias AS, Bóia MN, Carvalho-Costa FA, Research group (Adriano G. Silva, Carlos José C. Moreira, Lauren H. Jaeger, Joanna G. Valverde, Patrícia P. Martins, Viviane F. Meneses), Iñiguez AM (2010). Mitochondrial genetic characterization of human and pig *Ascaris* spp. isolates from Brazil showed common haplotypes in both hosts. Submetido em 2010 a *Plos neglected tropical diseases*.

- O fato dos haplótipos mais prevalentes no Brasil terem sido encontrados em ambas as regiões, norte e sudeste, mostra que, a despeito da distância e contextos sócio-ambientais distintos, essas barreiras têm sido transpostas.

- Embora os haplótipos mais prevalentes no Brasil agrupem com haplótipos de baixa prevalência na China, o fato de dois haplótipos, H9=P9 e H14=P3, previamente caracterizados na China terem sido encontrados no Brasil mostra uma relação entre a epidemiologia molecular do Brasil e da China.
- A alta similaridade entre muitas das sequências nucleotídicas humanas e suínas tanto do Brasil quanto as da China demonstra que outros genes mitocondriais precisam ser avaliados a fim de melhor caracterizar estas espécies.
- A presença dos haplótipos do gene *cox1* e *nad1* mais prevalentes no Brasil, tanto em suínos quanto em humanos, demonstra a infecção cruzada dos haplótipos nestes hospedeiros e conseqüentemente a necessidade de um acompanhamento destas populações para ascaríase.

6.3 Diagnóstico molecular de *Trichuris* sp.

- O sucesso da extração de DNA de ovos isolados demonstrado pela amplificação do gene 18S rDNA indica que os resultados negativos obtidos para região *ITS1* seriam devidos à variabilidade encontrada neste alvo.

6.4 Diagnóstico molecular de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. em material arqueológico

Artigo 4: Leles D, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP, Iñiguez AM (2008). Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Colombian South América times. Mem Inst Oswaldo Cruz 103: 106-108.

- O diagnóstico molecular mostrou que a infecção por *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. pode ter sido mais prevalente na América do Sul que a detectada pela microscopia óptica.

- A discrepância na amplificação da PCR assim como da hibridação dos 3 alvos moleculares para *Ascaris* sp. pode indicar uma conservação diferencial do DNA.
- A maioria dos haplótipos de *Ascaris* sp. mostra relação com a origem geográfica, assim como possíveis interações locais entre os povos, as quais são corroborados por dados arqueológicos.
- Os achados de haplótipos antigos de *Ascaris* sp. comuns ao continente sul americano e europeu demonstram a circulação deste parasito em ambos continentes há pelo menos 8.800 anos.
- A infecção por *T. trichiura* está sendo sub-diagnosticada no material arqueológico sul americano já que amostras negativas pela microscopia óptica foram positivas pela abordagem molecular.
- A associação *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. também ocorreu na América do Sul já em tempos pré-colombianos.
- Este foi o primeiro registro de parasitos intestinais nos antigos habitantes do litoral brasileiro, mostrando que os povos habitantes dos sambaquis também tiveram contato com infecções intestinais.
- A análise paleogenética aponta para uma pobre preservação dos ovos de *Ascaris* sp. nos sítios arqueológicos sul americanos.

6.5 Avaliando o paradoxo *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. no material arqueológico

Artigo 5: Leles D, Reinhard K, Fugassa M, Ferreira LF, Iniguez AM, Araújo A. (2010). A parasitological paradox: Why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas?. J Archaeol Sci 37: 1510-1520.

- Experimentos em material moderno têm demonstrado maior frequência de quebra de ovos de *Ascaris* sp. comparado a *Trichuris* sp. Supõe-se que o mesmo tenha ocorrido no passado e que o fator tafonômico seja o principal responsável pela paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp., distinta da epidemiologia moderna.
- *Ascaris* sp. são mais facilmente eliminados do hospedeiro pela ação de medicamentos do que *Trichuris* sp., o que explicaria em parte a paleodistribuição observada pelo consumo de plantas vermífugas.
- Como mais ovos de *Trichuris* sp. são encontrados em sítios arqueológicos sujeitos a condições ambientes diversas, plantas medicinais e principalmente fatores tafonômicos não devem ser os únicos responsáveis pela paleodistribuição observada. Portanto, uma mudança na produção de ovos destes parasitos ao longo do tempo não pode ser descartada.

7 ASPECTOS ÉTICOS

Conforme estabelecido atualmente por esta Instituição, projetos que não usem direta e/ou indiretamente material humano não mais precisam ser submetidos a parecer do comitê de ética. Contudo, achamos importante fazer as seguintes considerações.

Material fecal é examinado rotineiramente em instituições de saúde. O material usado nesta pesquisa se destinou única e exclusivamente à extração de DNA do parasito e não do hospedeiro humano e/ou suíno. As amostras fecais usadas nesta pesquisa, procedentes da cidade do Rio de Janeiro – RJ, são as mesmas usadas na dissertação de mestrado defendida nesta instituição e, portanto à época com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer N^o. 03/06, CAAE: 0003.0.031.000.6). As amostras provenientes da cidade de Santa Isabel do Rio Negro - AM são parte de outro projeto intitulado: “Estudo das condições de saúde da população de Santa Isabel do Rio Negro incluindo intervenção para tratamento em massa das helmintíases intestinais” coordenado por Dr. Neves MB e Dr. Costa-Carvalho FA do Instituto Oswaldo Cruz, aprovado pelo comitê de ética (parecer N^o. CAAE 0011.0.009.000-03).

O material arqueológico usado nesta pesquisa faz parte da coleção do laboratório de paleoparasitologia da ENSP-FIOCRUZ que tem sido constantemente usado por pesquisadores e estudantes de diversas instituições e gerado importantes contribuições em várias áreas do conhecimento. Procuramos não usar o material completamente e preservamos o quanto foi possível.

Figuras e fotos que necessitavam de permissão para sua utilização foram autorizadas para publicação nesta tese.

8 REFERÊNCIAS

1. Altamirano-Enciso AJ, Marzochi MCA, Moreira JS, Schubach AO, Marzochi KBF (2003). Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. *Hist Cienc Saude-Manguinhos* 10(3):853-882.
2. Anderson TJC (2001). The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends Parasitol* 17:183-188.
3. Anderson TJC, Romero-Abal M, Jaenike J (1993). Genetic structure and epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in Guatemala. *Parasitology* 107: 319-34.
4. Andrews JRH (1976). *Ascaris* egg in coprolite material. *The New Zeland Medical Journal* 89:274.
5. Araújo A, Confalonieri U, Ferreira LF (1984). Encontro de ovos de Trichostrongylidae e *Trichuris trichiura* em corpo mumificado do período colonial brasileiro. *Rev Centr Cienc Biol Saúde* 1:11-16.
6. Araújo A (1988). Dessecação experimental de fezes contendo ovos de ancilostomídeos. In *Paleoparasitologia no Brasil* (ed Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U), pp.111-112. Editora PEC/ENSP, Rio de Janeiro.
7. Araújo A, Jansen AM, Bouchet F, Reinhard K, Ferreira LF (2003). Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl 1):5-11.
8. Araújo A, Reinhard K, Ferreira LF, Gardner SL (2008a). Parasites as probes for prehistoric human migrations? *Trends Parasitol* 24(3):112-115.
9. Araújo JV, Braga FR, Silva AR, Araújo JM e Tavela AO (2008b). In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. *Parasitol Res* 102:787-790.
10. Aspöck H, Flamm H, Picher O (1973). Darmparasiten in menschlichen exkrementen aus prähistorischen Salzbergwerken der Hallstatt-Kultur (800–350 v. Chr.). *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A* 223, 549-558.
11. Aspöck H, Auer H, Picher O (1996). *Trichuris trichiura* eggs in the neolithic glacier mummy from the Alps. *Parasitol. Today* 12:255-256.
12. Bathurst RR (2005). Archaeological evidence of intestinal parasites from coastal shell middens. *J Archaeol Sci* 32:115-123.

13. Beard D (1986). The infirmary of Bermondsey priory. *The London Archaeologist* 5:186-191.
14. Behnke JM (2008). Structure in parasite component communities in wild rodents: predictability, stability, associations and interactions...or pure randomness? *Parasitology* 135:751-766.
15. Bezjian M, Gillespie T, Chapman CA, Greiner EC (2008). Coprologic evidence of gastrointestinal helminthes of forest Baboons, *Papio anubis*, in Kibale National Park, Uganda. *J. Wildl. Dis.* 44:878-887.
16. Blaxter ML, De Ley P, Gareys JR et al. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematode. *Nature* 392:71-75.
17. Boersema JH, Jansen J (1975). Helminth infections in medieval Utrecht. *Trop Geo Med* 27:441.
18. Bouchet F (1991). Étude parasitologique des chantiers archéologiques de Beauvais (Oise). *Rev Archéol Picardie* 34: 293-294.
19. Bouchet F (1993). Apport de la parasitologie sur les chantiers archéologiques – l'exemple de la ville de Paris. *Mem Group Archeol Seine-et-Marne* 1:55-61.
20. Bouchet F (1995). Recovery of helminth eggs from archaeological excavations of the Grand Louvre (Paris, France). *J Parasitol* 81:785-787.
21. Bouchet F, Audoin F, Léger N, Marchais R, Baucheron F, Munoz Lacasta, J (1989). Etude parasitologique des coprolites et des sédiments de trois ensembles clos de la rue de Lutèce (Ile de la Cité) à Paris. *Archeom* 13:13-21.
22. Bouchet F, Eryvynck A, Raveschot P (1991). Rijk, maar proper parasitologisch onderzoek van een put uit de Schepenhuisstraat. *Stadsarcheologie* 14:463-466.
23. Bouchet F, Petrequin P, Paicheler JC, Dommelier S (1995). Première approche paléoparasitologique du site néolithique de Chalain (Jura, France). *Bull Soc Path Ex* 88:265-268.
24. Bouchet F, Paicheler JC (1995). Paléoparasitologie: presumption d'un cas de bilharziose au XVe siècle à Montbéliard (Doubs, France). *CR Acad Sci Paris* 318:811-814.
25. Bouchet F, Baffier D, Girard M, Morel P, Paicheler JC, David F (1996). Paléoparasitologie en contexte pléistocène: premières observations à la Grande Grotte d'Arcysur-Cure (Yonne), France. *CR Acad Sci Paris* 319:147-151.
26. Bouchet F, Bentrard S, Paicheler JC (1998). Enquête épidémiologique sur les helminthiases à la cour de Louis XIV. *Mini-Synthese Med Sci* 14:463-466.

27. Bouchet F, West D, Lefèvre C, Corbett D (2001). Identification of parasitoses in a child burial from Adak Island (Central Aleutian Islands, Alaska). *CR Acad Sci. Paris* 324:123-127.
28. Bouchet F, Harter S, Le Bailly M (2003). The state of the art of paleoparasitological research in the old world. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(Suppl 1):95-101.
29. Bradley JB and Jackson JA (2008). Measuring immune system variation to help understand host-pathogen community dynamics. *Parasitology* 135:807-823.
30. Braga FRJ, Araújo V, Campos AK, Carvalho RO, Silva AR, Tavela AO, Maciel AS (2007). In vitro observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monascrosporium thaumasium* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). *Rev Soc Bras Med Trop* 40:356-358.
31. Brandão ML (2007). Helminhos de mamíferos da região do Parque Nacional Serra da Capivara, sudeste do Piauí: diversidade e influências antrópicas. [MS Tesis: ENSP-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil].
32. Brown HW, Cort WM (1927). The egg production of *Ascaris lumbricoides*. *J Parasitol* 14:88-90.
33. Caldeira J, Carvalho F, Marcondes C, de Paula SG (1997). Viagem pela História do Brasil. São Paulo. Companhia das Letras.
34. Callen O e Camaron TWM (1960). A prehistoric diet as revealed in coprolites. *The New Scientist* 8:35-40.
35. Carlos N, Tantaleán M, Leguía VG, Paloma Alcázar P, Donadi R (2008). Frecuencia de helmintos en huanganas silvestres (*Tayassu pecari*, Link 1795) residentes en áreas protegidas del departamento de Madre de Dios Perú. *Neotrop Helminthol* 2:48-53.
36. Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bóia MN (2007). *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 49:147-53.
37. Chapman CA, Gillespie TR, Speirs ML (2005). Parasite prevalence and richness in sympatric colobines: effects of host density. *Am J Primatol* 67:259-266.
38. Chaves S e Renault-Miskovsky J (1996). Paléoethnologie, paléoenvironnement et paléoclimatologie du Piauí, Brésil: apport de l'étude pollinique de coprolithes humains recueillis dans le gisement préhistorique de Pedra Furada. *CR Acad Sci Paris* 322: 1053-1060.

39. Chaves SAM e Reinhard KJ (2006). Critical analysis of coprolite evidence of medicinal plant use, Piauí, Brazil. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* 237:110-118.
40. Cheng TO (1984). Glimpses of the past from the recently unearthed ancient corpses in China. *Int Med* 101:714-715.
41. Cockburn A, Barraco RA, Reyman TA, Peck WH (1975). Autopsy of an Egyptian mummy. *Science* 187:1155-1160.
42. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Sanson-Himmels G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruyse J (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 136:3-4.
43. Confalonieri (1988). Paleopidemiologia de *T. trichiura* na América. In *Paleoparasitologia no Brasil* (ed. Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U.), pp.120-137. Editora PEC/ENSP, Rio de Janeiro.
44. Confalonieri, U., Filho, B.R., Ferreira, L.F, Araújo, A. (1988). The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. In *Paleoparasitologia no Brasil* (ed. Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U.), pp.76-78. Editora PEC/ENSP, Rio de Janeiro.
45. Confalonieri U, Ferreira LF, Araujo, A. (1991). Intestinal helminths in lowland South American Indians: some evolutionary interpretations. *Human Biology* 63:865-875.
46. Córdon PG., Hitos Prados A, Romero D, Sánchez Moreno M, Pontes A, Osuna A, Rosales MJ (2008). Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden “Peña Escrita” (Almuñecar, Spain). *Vet Parasitol* 156:302-309.
47. Costa-Macedo LM, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Oliveira LM, Vianna MSR (1998). Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública* 14:851-5.
48. Crompton DW (1999). How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol* 5:397-403.
49. Criscione CD, Anderson JD, Raby K, Sudimack D, Subedi J, Rai DR, Upadhayay RP, Jha B, Williams-Blangero S, Anderson TJ (2007a). Microsatellite markers for the human nematode parasite *Ascaris lumbricoides*: development and assessment of utility. *J Parasitol* 93(3):704-8.
50. Criscione CD, Anderson JD, Sudimack D, Peng W, Jha B, Williams-Blangero S, Anderson TJ (2007b). Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proc Biol Sci*, 274(1626):2669-77.
51. Cutillas C, Oliveros R, Rojas M, Guevara DC (2002). Determination of *Trichuris muris* from murid hosts and *T. arvicolae* (Nematoda) from arvicolid rodents by

- amplification and sequencing of the ITS1–5.8S-ITS2 segment of the ribosomal DNA. *Parasitol Res* 88:574-582.
52. Cutillas C, Oliveros R, Rojas M, Guevara DC (2004). Determination of *Trichuris skrjabini* by sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of the ribosomal DNA: comparative molecular study of different species of trichurids. *J Parasitol* 90:648-652.
 53. Cutillas C, Rojas M, Ariza C (2007). Molecular identification of *Trichuris vulpis* and *Trichuris suis* isolated from different hosts. *Parasitol Res* 100:383-389.
 54. Cutillas C, Callejóna R, Rojas M, Tewes B, Ubeda JM, Ariza C, Guevara DC (2009). *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica* 111:299-307.
 55. Dark P (2004). New evidence for the antiquity of the intestinal parasite *Trichuris* (whipworm) in Europe. *Antiquity* 78:676-681.
 56. Daszak P et al. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 78:103-116.
 57. Dittmar K e Steyn M (2004). Paleoparasitological analysis of coprolites from K2, an Iron Age archaeological site in South África: the first finding of *Dicrocoelium* sp. eggs. *J. Parasitol.* 90:171-173.
 58. Dommelier-Espejo S, Bentrard S, Paicheler JC, Pétrequin P, Bouchet F (1998). Parasitoses Liées à L'Alimentation Chez Les Populations Néolithiques Du Lac De Chalain (Jura, France). *Anthropozool* 27:41-49.
 59. Dommelier-Espejo S (2001). Contribution à L'étude Paléoparasitologique des Sites Néolithiques em Environnement Lacustre dans les Domaines Jurassien et Péri-alpin. Ph.D. thesis. Université de Reims, Reims.
 60. Dorris M, De Ley P, Blaxter ML (1999). Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitol Today* 15 (5): 188-193.
 61. Drancourt M e Raoult D (2005). Paleomicrobiology: current issues and perspectives. *Nature* 3:23-35.
 62. Duddington CL (1955). Notes on the technique of handling predaceous fungi. *Trans Brit Mycol Soc* 38:97-103.
 63. Eckert KA, Hahn NE, Genz AK, Dawn M, Stuart MD, Averbek GA, Stromberg BE, Markowitz Hal (2006). Coprological surveys of *Alouatta pigra* at two sites in Belize. *Int J of Primatol* 27:227-238.
 64. Ellis BR and Wilcox BA (2009). The ecological dimensions of vector-borne disease research and control. *Cad Saúde Pública* 25(suppl 1):155-167.

65. Evans AC, Markus MB, Mason RJ, Steel R (1996). Late stoneage coprolite reveals evidence of prehistoric parasitism. *SAMJ* 86:274-275.
66. Faulkner CT, Patton S, Johnson SS (1989). Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, van Buren County, Tennessee. *J Parasitol* 75:461-463.
67. Faulkner CT, Cowie SE, Martin PE, Martin SR, Mayes CS, Patton S (2000). Archeological evidence of parasitic infection from the 19th century company town of Fayette, Michigan. *J Parasitol* 86:846-849.
68. Fernandes A, Ferreira LF, Gonçalves MLC, Bouchet F, Klein CH, Iguchi T, Sianto L., Araújo A (2005). Intestinal parasite analysis in organic sediments collected from a 16th-century Belgian archeological site. *Cad Saude Publica* 21:329-332.
69. Fernandes A, Iñiguez AM, Lima VS, Souza SM, Ferreira LF, Vicente AC, Jansen AM (2008). Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(5):514-6.
70. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri UEC (1979). Subsídios para a paleoparasitologia do Brasil. I. Parasitos encontrados em coprólitos no município de Unai, MG, pp.56. In: IV Congresso Brasileiro de Parasitologia. Campinas.
71. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U (1980). The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Trans R Soc Trop Med* 74:798-800.
72. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U (1982). Untitled note. *Paleopathol. News* 38:5.
73. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U (1983). The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. *Trans R Soc Trop Med* 77:65-67.
74. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Lima JMD (1989). *Trichuris* eggs in human coprolites from archeological site of Furna do Estrago, Brejo da Madre de Deus, Pernambuco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84:581.
75. Ferreira LF, Araújo A, Duarte AN (1993). Nematode larvae in fossilized animal coprolites from lower and middle Pleistocene sites, central Italy. *J Parasitol* 79(3):440-442.
76. Fisher CL, Reinhard KJ, Kirk M, DiVirgilio J (2007). Privies and parasites: the archaeology of health conditions in Albany, New York. *Hist Archaeol* 41:172-197.
77. Fouant MM, Allison M, Gerszten E, Focacci G (1982). Parasitos intestinales entre los indigenas precolombinos. *Rev Chungara* 9:285-299.

78. Fries CR, Beidleman DK, Custer JF (1990). Analysis of parasites from 19th century privy contexts, Wilmington, Delaware. *North Am Archaeol* 11:17-27.
79. Fry GF (1974). Ovum and parasite examination of Salt Cave paleofeces. In: Watson, P.J. (Ed.), *Archaeology of the Mammoth Cave Are*. Academic Press., New York, p. 61.
80. Fugassa MH, Araujo A, Guichón RA (2006). Quantitative paleoparasitology applied to archaeological sediments. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(Suppl. 2):29-33.
81. Fugassa M, Barberena R (2006). Cuevas y zoonosis antiguas: paleoparasitología del sitio Orejas de Burro 1 (Santa Cruz, Argentina). *Magallania, Chile* 34:57-62.
82. Fugassa MH, Guichón RA (2006). Nuevos aportes a la paleoparasitología del sitio arqueológico “Nombre de Jesús” (S.XVI), Cabo Virgenes, Argentina. *Rev Arg Antropol Biol* 8:73-83.
83. Fugassa MH, Sardella NH, Guichón RA, Denegri GM, Araújo A (2007). Paleoparasitological analysis applied to skeletal sediments of meridional Patagonian collections. *J Archaeol Sci* 35:1408-1411.
84. Galvani AP (2003). Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol* 18:132-139.
85. Gárate I, Suyo B, Delgado M, Solís H, Castellanos P (2005). Hallazgo de nematode y huevos de *Ascaris* sp. en coprolitos de la momia “Shamana Alada”, Cerrillos, Ica, Peru. *Bol Chil Parasitol* 60 (T2):325.
86. Gaspar MD (2000). *Sambaqui: arqueologia do litoral brasileiro*. Rio de Janeiro: Jorge Zahar. 100p.
87. Gasser RB, Newton SE. Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects (2000). *Int J Parasitol* 30:509-34.
88. Gasser RB, Stevenson LA, Chilton NB, Nansen P, Bucknell DG, Beveridge I (1996). Species markers for equine strongyles detected in intergenic spacer rDNA by PCR-RFLP. *Mol Cell Prob* 10:371-378.
89. Gillespie TR, Greiner EC, Chapman CA (2004). Gastrointestinal parasites of the Guenons of western Uganda. *J Parasitol* 90:1356-1360.
90. Gillespie TR, Greiner EC, Chapman CA (2005). Gastrointestinal parasites of the Colubus monkeys of Uganda. *J Parasitol* 91:569-573.
91. Gillespie TR, Chapman CA (2008). Forest fragmentation, the decline of an endangered primate, and changes in host-parasite interactions relative to an unfragmented forest. *Am J Primatol* 70:222-230.

92. Gonçalves MLC, Araújo A, Ferreira LF (2003). Human Intestinal Parasites in the Past: New Findings and a Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1):103-118.
93. Gray NF (1987). Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biol Rev* 62:245-304.
94. Greig J (1981). The investigation of a medieval Barrel-latrine from Worcester. *J Archaeol Sci* 8:265-282.
95. Greig J (1982). Garderobes, sewers, cesspits and latrines. *Curr Archaeol* 85:49-52.
96. Golenberg EM, Bickel A, Weihs P (1996). Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res* 24:5026-5033.
97. Gotoh S (2000). Regional differences in the infection of wild Japanese Macaques by gastrointestinal helminth parasites. *Primates* 41:291-298.
98. Gotoh S, Takenaka O, Watanabe K, Hamada Y, Kawamoto Y, Watanabe T, Suryobroto B, Sajuthi D (2001). Hematological values and parasite fauna in free-ranging *Macaca hecki* and the *M. hecki*/*M. tonkeana* hybrid group of Sulawesi Island, Indonesia. *Primates* 42:27-34.
99. Guanabarinus LT, Araújo C, Guanabarinae K (2001). Notas para uma história da medicina no Brasil. *Armazém das Letras: Manguinhos, Rio de Janeiro*.
100. Guidon N et al. (2002). Notas sobre a pré-história do Parque Nacional Serra da Capivara. *FUNDHAMENTOS* 1(2):106-141.
101. Hahn NE, Proulx D, Muruthi PM., Alberts S, Altmann J (2003). Gastrointestinal parasites in free-ranging Kenyan Baboons (*Papio cynocephalus* and *P. anubis*). *Int J Primatology* 24:271-279.
102. Hall AR, Jones AKG e Kenward HK (1983). Cereal Bran and Human Faecal Remains from Archaeological Deposits - Some Preliminary Observations. In *Site, Environment and Economy* (ed. Proudfoot, B.), pp. 85-104. BAR International Series, Oxford 173.
103. Han ET, Guk SM, Kim JL, Jeong HJ, Kim SN, Chai JY (2003). Detection of parasite eggs from archaeological excavations in the Republic of Korea. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1):123-126.

104. Harter S, Le Bailly M, Janot F, Bouchet F (2003). First paleoparasitological study of an embalming rejects jar found in Saqqara, Egypt. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1):119-121.
105. Harter S, Mort F, Vigne JD, Guilaine J, Brun A, Bouchet F (2005). Premières données parasitologiques sur les populations humaines pré céramiques chypriotes (VIIIe et VIIe millé naires av. J.-C. *Paléorient* 31:43-54.
106. Helbaek H (1958). Grauballemandens sidste måltid. *Kuml* pp.83-116.
107. Hennessy A, Phippard AF, Harewood WJ, Horam CJ, Horvath JS (1994). Helminthic infestation complicated by intussusception in baboons (*Papio hamadryas*). *Lab Anim* 28:270-273.
108. Herrmann B (1985). Parasitologisch-epidemiologische Auswertungen Mittelalterlicher Kloaken. *Z Archäol Mittelalters* 13:131-161.
109. Herrmann B e Schulz U (1986). Parasitologische Untersuchungen eines Spätmittelalterlich-Frühneuzeitlichen Kloakeninhaltes aus der Fronerei auf dem Schranken in Lübeck. *Lübecker Schri. Archäol Kultur* 12:167-172.
110. Hevly RH, Kelly RE., Anderson GA, Olsen SJ (1979). Comparative effects of climate change, cultural impact, and volcanism in the paleoecology of Flagstaff, Arizona, A.D. 900–1300. In: Sheets, P., Grayson, D. (Eds.), *Volcanic Activity and Human History*. Academic Press, New York, pp. 487-523.
111. Hidalgo-Argüelo MR, Baños ND, Grandes JF, Marcos EP (2003). Parasitological analysis of Leonese Royalty from Collegiate-Basilica of ST. Isidoro, León (Spain): helminths, protozoa, and mites. *J Parasitol* 89:738-743.
112. Hope K, Goldsmith ML, Graczyk T (2004). Parasitic health of olive baboons in Bwindi Impenetrable National Park, Uganda. *Vet Parasitol* 122:165-70.
113. Horne PD, Tuck JA (1996). Archaeoparasitology at a 17th century colonial site in Newfoundland. *J Parasitol* 82:512-515.
114. Hu M e Gasser B. Mitochondrial genomes of parasitic nematodes - progress and perspectives. *Trends Parasitol* 2006; 22 (2):69- 84.
115. Iñiguez AM, Vicente ACP, Araújo A, Ferreira LF, Reinhard K (2002). *Enterobius vermicularis*: specific detection by amplification of an internal region of 5S ribosomal RNA intergenic spacer and transplicing leader RNA analysis. *E. vermicularis*: specific detection by PCR and SL1 RNA analysis. *Exp Parasitol* 102:218-222.
116. Iñiguez AM, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP (2003). Analysis of Ancient DNA from Coprolites: a Perspective with Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(Suppl. D):63-65.

117. Iñiguez AM, Reinhard K, Carvalho Gonçalves ML, Ferreira LF, Araújo A, Paulo Vicente AC, (2006). SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int J Parasitol* 36(13):1419-25.
118. Iñiguez AM, Leles D, Lima VS, Araújo A, Vicente ACP, Silva LPR, Dias OF (2009). Análisis de AND mitochondrial humano de restos arqueológicos de la Catedral Metropolitana de Rio de Janeiro, Brasil (XVII-XIX). In: Anais III Paleopathology Association Meeting in South America (PAMinsa III), Necochea, Argentina, p.36
119. Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K, Horii Y, Tsuchiya K, Nawa Y (2004). Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol Res* 92:50-2.
120. Kalema-Zikusoka G, Rothman EJM, Fox MT (2005). Intestinal parasites and bacteria of mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Bwindi impenetrable National Park, Uganda. *Primates* 46:59-63.
121. Kato K (1960). A correct application of the tick-smear technic with cellophane paper cover. *A Pamphlet* 1-9.
122. Katz N, Chaves A, Pellegrino J (1972). A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop* 14:397-400.
123. Keiser J e Utzinger J (2008). Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 299:1937-1948.
124. Knezevich M (1998). Geophagy as a therapeutic mediator of endoparasitism in a free-ranging group of Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). *Am J Primatol* 44:71-82.
125. KNM-Kwangju National Museum (1997). Shinchang-dong wetland site I. Report on the research of antiquities of the Kwangju National Museum. *Kwangju Natl. Museum* 33:159-66.
126. Kobayashi A, Katakura K, Hamada A (1984). The fate of *Ascaris* eggs applied to the soil under various conditions. Sixth APCO Parasitologist Meeting, Nepal. p.15-17.
127. Jansen Jr. J e Over HJ (1962). Het voorkomen van parasieten in terpmateriaal uit Noordwest Duitsland. *Tijdschr. Diergeneesk* 87:1377-1379.
128. Jansen Jr. J e Over HJ (1966). Observations on helminth infections in a roman armycamp. In: Paper Presented at 1st International Congress of Parasitology, Roma-Italy, p. 791.
129. Jones AKG (1982). Human parasite remains: prospects for a quantitative approach. In: Hall, A.R., Kenward, H.K. (Eds.), *Environmental Archaeology in the Urban Context*. The Council for British Archaeology, pp. 66-77.

130. Jones AKG (1984). Intestinal parasite ova from archaeological deposits: evidence of widespread faecal contamination in Viking age York. In: Paper Presented at Paleopathology 5th European Members Meeting, Siena-Italy.
131. Jones AKG (1986). Parasitological investigations on Lindow man. In: Stead, I.M., Bourke, J.B., Brothwell, D. (Eds.), Lindow Man the Body in the Bog. British Museum Publications, pp. 136-139.
132. Jones AKC (1988). Collecting samples from human remains: the perspective of an environmental archaeologist. Arch-Form Newsl 2:8-11.
133. Jones AKG, Hutchinson AR, Nicholson C (1988). The worms of Roman horses and other finds of intestinal parasite eggs from unpromising deposits. Antiquity 62:275-276.
134. Jones-Engel L, Engel GA, Schillaci MA, Kyes K, Froehlich JY, Paputungan M, Kyes RC (2004). Prevalence of enteric parasites in pet Macaques in Sulawesi, Indonesia. Am J Primatol 62:71-82.
135. Larsen M (1999). Biological control of helminthes. Int J Parasitol 29:139-146.
136. Larsen MN e Roepstorff A (1999). Seasonal variation in development and survival of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* eggs on pastures. Parasitology 119:209-220.
137. Le Bailly M, Gonçalves MLC, Lefèvre C, Roper DC, Pye JW, Araújo A, Bouchet F (2006). Parasitism in Kansas in the 1800s – a glimpse to the past through the analysis of grave sediments from Meadowlark cemetery. Mem Inst Oswaldo Cruz 101 (Suppl. 2):53-56.
138. Legesse M, Erko B, Medhin G (2002). Efficacy of albendazole and mebendazole in the treatment of *Ascaris* and *Trichuris* infections. Ethiop Med J 40:335-343.
139. Leles D (2004). Paleoparasitologia de *Trichuris trichiura*: revisão e novos aportes nessa área do conhecimento. Monografia de especialização apresentada a Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro.
140. Leles D (2007). Diagnóstico paleoparasitológico molecular de *Ascaris lumbricoides* (Linnaeu. 1758). Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
141. Leles D, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP, Iñiguez AM (2008). Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Colombian South América times. Mem Inst Oswaldo Cruz 103:106-108.

142. Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Iñiguez AM (2009). Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new Brazilian *Ascaris* sp. genotype. *Vet Parasitol* 163: 167-170.
143. Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Iñiguez AM (2010a). ITS1 intra-individual variability of *Ascaris* isolates from Brazil. *Parasitol Int* 59: 93-96.
144. Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Rodrigues MLA, Dias AS, Research group (Adriano G. Silva, Carlos José C. Moreira, Lauren H. Jaegera, Joanna G. Valverde, Patrícia P. Martins, Viviane F. Meneses, Márcio N. Bóia, Filipe A.C. Costa Filipe Anibal), Iñiguez AM (2010b). Mitochondrial Genetic characterization of human and swine *Ascaris* sp. isolates from Brazil showed common haplotypes in both hosts. Submetido em março de 2010 a *Plos neglected tropical diseases*.
145. Leles D, Reinhard K, Fugassa M, Ferreira LF, Iniguez AM, Araújo A. (2010c). A parasitological paradox: Why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas?. *J Archaeol Sci* 37:1510-1520.
146. Legendre JP, Mariel J, Rieb JP (1986). Contribution à l'Étude de l'État Sanitaire de la Population Strasbourgeoise à la Fin du Moyen-Age. *Archéologie et Médecine*. APDCA, Juan-les-Pins.
147. Legesse M e Erko B (2004). Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Tropica* 90:231-236.
148. Levecke B, Dorny P, Geurden T, Vercammen F, Vercruyse J (2007). Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Vet Parasitol* 148: 236-246.
149. Liangbiao C, Tao H (1981). Scanning electron microscopic view of parasites worm ova in an ancient corpse. *Acta Acad Sinicae* 3:64-65.
150. Lim YAL, Ngui R, Shukri J, Rohela M, Mat Naim HR (2008). Intestinal parasites in various animals at a zoo in Malaysia. *Vet Parasitol* 157:154-159.
151. Lima VS, Iniguez AM, Otsuki K, Fernando Ferreira L, Araújo A, Vicente AC, Jansen AM (2008). Chagas disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 14(6):1001-2.
152. Loreille O, Roumat E, Verneau O, Bouchet F, Hänni C (2001). Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *Int J Parasitol* 31:1101-1106.
153. Loreille O e Bouchet F (2003). Evolution of ascariasis in human and pigs: a multi-disciplinary approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(suppl.1):39-46.

154. Lukes J, Horak A, Scholz T (2005). Helminth genome projects: all or nothing. *Trends Parasitol* 21(6):265-266.
155. Lutz A (1919). O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11:121-155.
156. Maldonado JF (1956). An evaluation of the standardized direct smear for egg counting in parasitological work. *Am J Trop Med Hyg* 5:888-892.
157. Martinson E, Reinhard KJ, Buikstra JE, Cruz KD (2003). Pathoecology of Chiribaya parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1):195-205.
158. Matsui A, Kanehara M, Kanehara M (2003). Paleoparasitology in Japan – discovery of toilet features. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1):127-136.
159. Mitchell PD e Stern E (2000). Parasitic intestinal helminth ova from the latrines of the 13th century crusader hospital of St John in Acre, Israel. In: Paper Presented at Paleopathology Association 13th Biennial European Members Meeting, Chieti, pp. 21-22.
160. Moerman DE (2009). *Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary*. Timber Press, Portland.
161. Montellano OB (1975). Empirical Aztec medicine. *Science* 188:215-220.
162. Moore DP (1981). Life seen from a medieval latrine. *Nature* 294:644.
163. Mota MA, Campos AK, Araújo JV (2003). Controle biológico de helmintos parasitos de animais: estágio atual e perspectivas futuras. *Pesq Vet Bras* 23 (3):93-100.
164. Muchiri EM, Thiong'o FW, Magnussen P, Ouma JH (2001). A comparative study of different albendazole and mebendazole regimens for the treatment of intestinal infections in school children of Usigu Division, western Kenya. *J Parasitol* 87:413-418.
165. Munene E, Otsyula M, Mbaabu DA, Mutahi WT, Muriuki SM, Muchemi M (1998). Helminth and protozoan gastrointestinal tract parasites in captive and wild-trapped African non-human primates. *Vet Parasitol* 78:195-201.
166. Muriuki SMK, Murugu RK, Munene E, Karere GM, Chai DC (1998). Some gastrointestinal parasites of zoonotic (public health) importance commonly observed in old world non-human primates in Kenya. *Acta Tropica* 71:73-82.
167. Mutani A, Rhynd K, Brown G (2003). A preliminary investigation on the gastrointestinal helminthes of the Barbados green monkey, *Cercopithecus aethiops sabaues*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 45:193-195.

168. Nansen P e Jørgensen RJ (1977). Fund af parasitæg i arkæologisk materiale fra det vikingetidige Ribe. Nord Vet-Med 29:263-266.
169. Nejsum P, Parker EDJr., Frydenberg J, Roepstorff A, Boes J, Haque R, Astrup I, Prag J, Skov Sørensen UB (2005). *Ascariasis* is a Zoonosis in Denmark. J Clin Microbiol 43:1142-1148.
170. Nejsum P, Roepstorff A, Jørgensen CB, Fredholm M, Göring HH, Anderson TJ, Thamsborg SM (2009). High heritability for *Ascaris* and *Trichuris* infection levels in pigs. Heredity 102:357-364.
171. Nordin A, Nyberg K, Vinnerås B. Inactivation of *Ascaris* eggs in source-separated urine and feces by ammonia at ambient temperatures (2009). Appl Environ Microbiol 75(3):662-7.
172. Oh et al. 2010. Extraction, amplification, and sequencing of ancient DNA from *Trichuris trichiura* sediments. J Archaeol Sci 37:1269-1273.
173. O’Lorcain P e Holland CV (2000). The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. Parasitology 121:51-71.
174. Okimoto R, Macfarlane JL, Clary DO, Wolstenholme DR. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. Genetics 1992; 130(3): 471-498.
175. Orellana HNC (2008). Paleogenética de populações pré-colombianas da Bolívia: análises do mtDNA humano e infecções por *Trypanosoma cruzi* e vírus linfotrópico das células T humana (HTLV). Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
176. Pääbo S (1990). Amplifyng ancient DNA. In Pääbo S. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Califórnia: Academic Press, 1990.
177. Palhano-Silva C, Araujo A, Lourenço AEP, Bastos O, Santos RV, Coimbra Jr CE (2009) Intestinal parasitic infection in the Suruí Indians, Brazilian Amazon. Interciencia 34:1-6.
178. Parenti F (1996). Problemática da Pré-história do Pleistoceno superior no nordeste do Brasil: o abrigo da Pedra Furada em seu contexto regional. FUNDHAMENTOS 1(1):16-53.
179. Papagrigorakis et al.. (2006). DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. Int J Parasitol 10:206-214.
180. Patrucco R, Tello R, Bonavia D (1983). Parasitological studies of coprolites of prehispanic Peruvian populations. Curr Anthropol 24:393–394.

181. Pau D, Perez Tort G, Petetta L, Coronel D. Hallazgo de huevos de *Ascaris* ssp. en sedimentos arqueológicos contenido sen la cavidad pélvica-estomacal de restos humanos. In: Resúmenes tomo II Boletín Chileno de Parasitología y de Parasitología al día. Buenos Aires; 2005. p.327.
182. Pecson BM, Nelson KL. Inactivation of *Ascaris suum* eggs by ammonia (2005). *Environ Sci Technol* 39(20):7909-14.
183. Pecson BM, Barrios JA, Johnson DR, Nelson KL. A real-time PCR method for quantifying viable *Ascaris* eggs using the first internally transcribed spacer region of ribosomal DNA (2006). *Appl Environ Microbiol* 72:7864-72.
184. Pecson BM, Barrios JA, Jiménez BE, Nelson KL (2007). The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge. *Water Res* 41(13):2893-902.
185. Peng W, Yuan K, Zhou X, Hu M, EL-Osta, YG, Gasser RB (2003). Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Electrophoresis* 24:2308-2315.
186. Peng W, Yuan K, Hu M, Zhou X, Gasser RB (2005). Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic regions of China. *Electrophoresis* 26:4317-4326.
187. Peng W, Yuan K, Hu M, Gasser RB (2007). Recent insights into the epidemiology and genetics of *Ascaris* in China using molecular tools. *Parasitology* 134:325-330.
188. Pessoa SB, Barreto MP (1948). *Leishmaniose tegumentar americana*. Rio de Janeiro: Ministério da Educação e Cultura; Serviço de Documentação. 527 p.
189. Pike AW (1967). The recovery of parasite eggs from ancient cesspit and latrine deposits: an approach to the study of early parasite infections. In: Brothwell, D., Sandison, A.T. (Eds.), *Diseases in Antiquity*. CC Thomas, Springfield, pp. 184-188.
190. Pike AW (1968). Recovery of helminth eggs from archaeological excavations, and their possible usefulness in providing evidence for the purpose of an occupation. *Nature* 219:303-304.
191. Pike AW (1975). Parasite eggs. In: Platt, C., Coleman-Smith, R. (Eds.), *Excavations in Medieval Southampton*. Leicester University Press, Leicester, pp. 347-348.
192. Pizzi T e Schenone H (1954). Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. *Bol Chil Parasitol* 9:73-75.

193. Poinar G e Boucot AJ (2006). Evidence of intestinal parasites of dinosaurs. *Parasitology* 133:245-249.
194. Poulin R (2007). *Evolutionary Ecology of Parasites*. Princenton University Press, United Kingdom, 332 p.
195. Quilès F, Balandier JY, Capizzi-Banas S (2006). In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris* eggs. *Anal Bioanal Chem* 386: 249-255.
196. Regolin AL, Oliveira CHS, Carvalho-Pinto CJ (2009). Primeira ocorrência de *Ascaris suum* em queixada (*Tayassu pecari*: Tayassuidae), Santa Catarina, Brasil. *Revista Patologia Tropical* v38(supl 2):1092.
197. Reichard MV, Wolf RF, Carey DW, Garrett JJ, Briscoe HA (2007). Efficacy of fenbendazole and milbemycin oxime for treating baboons (*Papio cynocephalus anubis*) infected with *Trichuris trichiura*. *J. Am. Assoc. for Lab. Anim Sci* 46:42-45.
198. Reinhard KJ, Ambler JR, McGuffie M (1985). Diet and parasitism at Dust Devil Cave. *Amer Antiq* 50:819-824.
199. Reinhard KJ, Mrozowski SA, Orloski KA (1986). Privies, pollen, parasites and seeds: a biological nexus in historic archaeology. *Masca J* 4:31-36.
200. Reinhard KJ, Hevly RH, Anderson GA (1987). Helminth remains from prehistoric Indian coprolites on the Colorado Plateau. *J Parasitol* 73:630-639.
201. Reinhard KJ, Confalonieri U, Herrmann B, Ferreira LF, Araújo A (1988). Recovery of parasite remains form coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. In: Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U. (Eds.), *Paleoparasitologia No Brasil*. Editora PEC/ENSP, Rio de Janeiro, pp. 83-108.
202. Reinhard KJ (1990). Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82:145-163.
203. Reinhard K, Gein PR, Callahan MM, Hevly RH (1992). Discovery of colon contents in skeletonized burial soil sampling for dietary remains. *J Archaeol Sci* 19:697-705.
204. Reinhard KJ (2004). Archaeoparasitological analysis of sediments from the Pearl Street Excavations. In *Pearl Street Reconstruction Part I: Archaeological Mitigation Report, Pearl Street from Madison avenue to Pine Street, City of Albany, Albany County, New York*. New York Division of Research and Collection, Cultural Resources Survey Program. pp. 93-97.
205. Reinhard KJ, Araújo A, Sianto L, Costello JG, Swope K (2008). Chinese Liver Flukes in Latrine Sediments From Wong Nim's Property, San Bernardino, Califórnia: Archaeoparasitology of the Caltrans District Headquarters. *J Parasitol* 94:300-303.

206. Rey L (2008). Parasitologia. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
207. Ribeiro RCF, Ferraz S, Mizobutsi EH, Menezes M (1999). Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematóides em diversas regiões brasileiras. Nematol Brasileira 23:40-47.
208. Ribeiro RCF, Rodríguez TTMS, Xavier AA, Gomes LISG (2003). Ocorrência de fungos predadores de nematóides sob solos de bananais, no norte de Minas Gerais. Unimontes Científica 5:1-8.
209. Rocha GC, Harter-Lailheugue S, Le Bailly M, Araújo A, Ferreira LF, Serra-Freire NM, Bouchet F (2006). Paleoparasitological remains revealed by seven historic contexts from place d'Armes, Namur, Belgium. Mem Inst Oswaldo Cruz 101 (Suppl. 2):43-52.
210. Roever-Bonnet H, Rijpstra C, van Renesse MA, Peen CH (1979). Helminth eggs and gregarines from coprolites from the excavations at Swifterbant. Helinium 19:7-12.
211. Rouffignac C (1987). Mediaeval man and his worms. Biologist 34:187-190.
212. Rousset, JJ, Heron C, Metrot P (1996). Helminthoses humaines chez les Gaulois. Hist Sci Med 30:41-46.
213. Ruffer MA (1910). Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the Twentieth Dynasty (1250-1000 BC). Brit Med J 1:16.
214. Saathoff E, Olsen A, Kvalsvig JD, Appleton CC (2004). Patterns of geohelminth infection impact of albendazole treatment and re-infection after treatment in schoolchildren from rural KwaZulu-Natal/South-Africa. BMC Infect. Dis 13:4-27.
215. Sabroza PC, Toledo LM, Osanai, CH (1992). A organização do espaço e os processos endêmico-epidêmicos. In: Saúde, ambiente e desenvolvimento (v.II), Rio de Janeiro: Hucitec-Abrasco.
216. Sabroza PC e Walter-Toews, D (2001). Doenças emergentes, sintomas locais e globalização. Cad Saúde Pública 17 (Supp.):4-5.
217. Santoro C, Vinton SD, Reinhard KJ (2003). Inca expansion and parasitism in the Lluta Valley: preliminary data. Mem Inst Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1):161-163.
218. Scott ME (2008). *Ascaris lumbricoides*: A Review of its epidemiology and relationship to other infections. Ann Nestlé 66:7-22.
219. Šebela L, Vojtková L, Vojtek J (1990). Intestinal parasites in man of old Bronze Age. Athropologie 2:105-107.

220. Seo M, Guk SM, Kim J, Chai JY, Bok GD, Park SS, Oh CS, Kim MJ, Yi YS, Shin MH, Kang IU, Shin DH (2007). Paleoparasitological report on the stool from a Medieval child mummy in Yangju, Korea. *J Parasitol* 93:598-592.
221. Shin DH, Chai JY, Park EA, Lee W, Lee H, Lee JS, Choi YM, Koh BJ, Park JB, Oh CS, Bok GD, Kim WL, Lee E, Lee EJ, Seo M (2008). Finding ancient parasite larvae in the sample from a male living in the late 17th century Korea. *J Parasitol* 95(3):768-771.
222. Shostak AW e Scott ME (1993). Detection of density-dependent growth and fecundity of helminths in natural infections. *Parasitology* 106:527-539.
223. Sianto L, Chame M, Silva CSP, Gonçalves MLC, Reinhard K, Fugassa M, Araújo A (2009). Animal helminths in human archaeological remains: a review of zoonoses in the past. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 51(3):119-130.
224. Silva AL (2007). Comida de gente: preferências e tabus alimentares entre os ribeirinhos do Médio Rio Negro (Amazonas, Brasil). *Rev Antropol* 50:125-79.
225. Simões CCS (2002). Perfis de saúde e de mortalidade no Brasil: uma análise de seus condicionantes em grupos populacionais específicos. Brasília: Editora OPAS.
226. Stephenson LS, Holland CV, Cooper ES (2000). The public health significance of *Trichuris trichiura*. *Parasitology* 121 Suppl:S73-95.
227. Specht KW (1963). Eine interessante Erdprobe aus einer Abortgrube im Römerkastell Künzing. *Saalburg-Jahrbuch* 21:90-94.
228. Stuart MD, Greenspan LL, Glander KE, Clarke MR (1990). A coprological survey of parasites of wild mantled howling monkeys, *Alouatta palliata palliata*. *J Wildl Dis* 26: 547-9.
229. Su TC (1987). A scanning electron microscopic study on the parasite eggs in an ancient corpse from a tomb of Chu Dynasty, the Warring State, in Jiangling County, Hubei Province. *J Tongji Med Univ* 63:4.
230. Szidat L (1944). Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor- und Frühgeschichtlichen Moorleichen. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 13:265-274.
231. Ujvari SC (2008). A História da Humanidade contada pelos vírus. Contexto: São Paulo. 202p
232. Taylor EL (1955). Parasitic helminths in medieval remains. *The Vet Rec* 67:218-228.
233. Tchuem Tchuente LA, Behnke J M, Gilbert FS, Southgate VR, Vercruyse J (2003). Polyparasitism with *Schistosoma haematobium* and soil-transmitted helminth

- infections among school children in Loum, Cameroon. *Tropical Medicine and International Health* 8: 975-986.
234. Teichroeb JA, Kutz SJ, Parkar, Thompson ARC, Sicotte P (2009). Ecology of the gastrointestinal parasites of *Colobus vellerosus* at Boabeng-Fiema, Ghana: possible anthroponotic transmission. *Am J Phys Anthropol* 140(3):498-507.
 235. Vilas R, Criscione CD, Blouin MS (2005). A comparison between mitochondrial DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic species of platyhelminth parasites. *Parasitology* 131:839-846.
 236. Volotão VAC, Costa-Macedo LM, Haddad FSM, Brandão A, Peralta JM, Fernandes O (2007). Genotyping of *Giardia duodenalis* from human and animal samples from Brazil using β -giardin gene: A phylogenetic analysis. *Acta Tropica* 102:10-19.
 237. Wei O (1973). Internal organs of a 2100-year-old female corpse. *Lancet* 7839:1198.
 238. Weyher AH, Ross C, Semple S (2006). Gastrointestinal parasites in crop raiding and wild foraging *Papio anubis* in Nigeria. *Int J Primatology* 27:1519-1534.
 239. Williams-Blangero S, Subedi J, Upadhyay RP, Manral DB, Rai DR, Jha B, Robinson ES, Blangero J (1999). Genetic analysis of susceptibility to infection with *Ascaris lumbricoides*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60:921-926.
 240. Williams-Blangero S, McGarvey ST, Subedi J, Wiest PM, Upadhyay RP, Rai DR, Jha B, Olds GR, Guanling W, Blangero J (2002). Genetic component to susceptibility to *Trichuris trichiura*: evidence from two Asian populations. *Genetic Epidemiology* 22:254-264.
 241. Williams-Blangero S, VandeBerg JL, Subedi J, Jha B, Correa-Oliveira, Blangero J (2008a). Localization of multiple quantitative trait loci influencing susceptibility to infection with *Ascaris lumbricoides*. *The Journal Infectious Diseases* 197:66-71.
 242. Williams-Blangero S, VandeBerg JL, Subedi J, Jha B, Dyer T, Blangero J (2008b). Two quantitative trait loci influence whipworm (*Trichuris trichiura*) infection in a Nepalese population. *The Journal Infectious Diseases* 197:1198-1203.
 243. Wilson A, Rackham DJ (1976). Parasite eggs. In: *The Archaeology of York: The Past Environment of York, the Environment Evidence from the Church Street Sewer System*. Council for British Archaeology, London, pp. 32-33.
 244. Witenberg G (1961). Human parasites in archaeological findings. *Bull Isr Expl Soc* 25:86.
 245. Yang W, Song G, Teng R (1984). Parasitologische Untersuchung einer alten Leiche aus der Chu-Dynastie der Streitenden Reiche aus dem Mazhuan-Grab Nr. 1, Kreis Jiangling, Provinz Hubei. *Acta Acad Med Wuhan*: 23-27.

246. Zani LC, Favre TC, Pieri OS, Barbosa CS (2004). Impact of antihelminthic treatment on infection by *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and hookworms in Covas, a rural community of Pernambuco, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 46:63-67.
247. Zhu X, Chilton NB, Jacobs D E, Boes J, Gasser RB (1999). Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA Sequences. *Int J Parasitol* 29:469-478.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)