

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA (ENSP/FIOCRUZ)  
Programa de Pós-Graduação de Epidemiologia em Saúde Pública

Dissertação de Mestrado

Análise Paleogenética de Treponemas em Remanescentes Humanos do  
Período Histórico Brasileiro (Séculos XVII ao XIX)

Aluna: Lucélia Guedes Ribeiro da Silva  
Orientadora: Dra. Alena Mayo Iñiguez

Rio de Janeiro, fevereiro de 2014

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA (ENSP/FIOCRUZ)  
Programa de Pós-Graduação de Epidemiologia em Saúde Pública

Dissertação de Mestrado

Análise Paleogenética de Treponemas em Remanescentes Humanos do Período  
Histórico Brasileiro (Séculos XVII ao XIX)

por

Lucélia Guedes Ribeiro da Silva

Orientadora: Dra. Alena Mayo Iñiguez

Dissertação de Mestrado  
Acadêmico apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação da  
Escola Nacional de Saúde Pública  
Sérgio Arouca, como requisito  
para obtenção do título de  
Mestre em Epidemiologia em  
Saúde Pública

Rio de Janeiro, fevereiro de 2014

Ao meu Deus por esta vitória, pois vem dele toda a minha motivação e capacidade. Aos meus pais e irmãos por todo amor e força em momentos difíceis. Ao meu esposo, que sempre me estimulou a seguir em frente e olhar para o alvo.

## Agradecimentos

À Deus pela sua misericórdia e compaixão em me dar este tão maravilhoso presente. A ti Senhor toda honra e glória. Agradeço por ter guiado meus passos.

À minha orientadora Dra. Alena pela amizade, paciência e profissionalismo. Sua presença na minha vida acadêmica foi essencial, pois contribuiu de forma exemplar para o meu crescimento profissional.

Ao Programa de Epidemiologia em Saúde Pública (ENSP-FIOCRUZ) por contribuir para a minha formação acadêmica.

A todos os professores da ENSP por se dedicarem as aulas preocupando-se em trazer o melhor ensino para os futuros epidemiologistas.

À Dra. Ana Maria Jansen e a toda equipe do LABTRIP por nos receberem carinhosamente em seu laboratório, acreditando em nosso trabalho.

À amiga Lauren Jaeger pela amizade sincera e paciência nos ensinamentos que contribuíram para uma relação harmoniosa e agradável durante todo o período deste trabalho.

À Dra. Ana Caryna Cabral pelo auxílio em levantamento de dados parasitológicos no Hospital Universitário Pedro Ernesto.

À equipe do laboratório do Centro de Saúde Germano Sinval Faria ENSP-FIOCRUZ, Dayse Figueira de Oliveira, Riany da Silva Silveira e Karina pela cooperação no trabalho de levantamento de dados parasitológicos e fornecimento de amostras de soro.

Às Instituições financiadoras desta pesquisa e concessão de bolsa de estudos FAPERJ e CAPES, respectivamente.

À minha família pelo apoio e por acreditar no meu sonho. Vocês são muito importantes pra mim.

## Resumo

**Objetivos:** Verificar a presença de treponematoses através da análise paleogenética em remanescentes humanos dos séculos XVII ao XIX da cidade do Rio de Janeiro. Avaliar o diagnóstico molecular de *Treponema pallidum* em soros de indivíduos positivos para sífilis, assim como determinar o perfil parasitológico destes pacientes. **Metodologia:** A análise paleogenética de *Treponemas* foi aplicada em 48 indivíduos provenientes dos sítios arqueológicos Igreja Nossa Senhora do Carmo (INSC) e Cemitério da Praça XV (CPXV), datados dos séculos XVII ao XIX. Material ósseo, constituído principalmente de fragmentos de crânio, foi selecionado para a análise paleogenética que seguiu estritamente os procedimentos de estudos de aDNA. Foi realizada extração de aDNA seguida de hibridização de aDNA em membrana de nylon pelo método de Dot Blot, incluindo controles negativos (DNA humano) e positivos (DNA de cepas referências de *T. pallidum*, Nichols (*T. p. ssp. pallidum*) e CDC2 (*T. p. ssp. pertenue*). Aplicou-se a técnica molecular para detectar a presença de *Treponemas* com 3 alvos moleculares para *T. pallidum*, 47KDa, DNA Pol A e 15KDa. A eficiência de detecção molecular de *T. pallidum* foi previamente avaliada pela técnica de PCR em cepas referências Nichols e CDC2, e em 18 amostras de soro de pacientes com sífilis atendidos em Unidades de Saúde do Rio de Janeiro. O diagnóstico molecular de treponematoses em soros foi avaliado pela técnica de PCR e adicionalmente, registros de pacientes com sífilis foram analisados para avaliar o perfil parasitológico dos mesmos. **Resultados:** Na análise paleogenética, foi detectada a infecção por *Treponema* sp. em 7/22 (31,8%) dos indivíduos do sítio arqueológico INSC, 4 (18%), 5 (22,7%) e 12 (54,5%) para os alvos 47KDa, DNA Pol A e 15KDa, respectivamente. No sítio arqueológico CPXV, a positividade para *Treponema* foi observada em 8/26 (30,7%) indivíduos, 8 (30,7%), 3 (11,5%) e 2 (7%) para os alvos 47KDa, DNA Pol A e 15 KDa, respectivamente. Todos os controles de hibridização, negativos e positivos, demonstraram os resultados esperados. A avaliação da detecção molecular em soros de pacientes com sífilis revelou positividade em 12/18 (66,6%), com 8 (44,4%), 5 (27,7%) e 4 (22,2%) indivíduos positivos para os alvos 47KDa, DNA Pol A e 15KDa, respectivamente. A análise do perfil parasitológico de indivíduos com sífilis não pode ser conduzida pela ausência ou escassez de solicitações para os soropositivos. Em pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto, 6/62 (9,6%) exibiram pedidos de pesquisa parasitológica no período de 2008-2013, e 3 (50%), 2 (33,3%) e 1 (16,6%) foram positivos para *Giardia lamblia*, *Strongyloides stercoralis* e *Ascaris lumbricoides*, respectivamente. No Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria apenas 1/50 (2%) apresentou pedido para exame parasitológico, sendo positivo para *Iodamoeba bustchilli*. **Conclusões:** A infecção por *T. pallidum* foi detectada em indivíduos do período histórico da cidade do Rio de Janeiro. A prevalência da infecção por *T. pallidum* foi similar em ambos os sítios arqueológicos independentemente das diferentes etnias e níveis socioeconômicos distintos característicos das populações enterradas nos dois sítios do estudo. A técnica de hibridização de aDNA com os 3 alvos moleculares mostrou ser eficiente na detecção de treponematoze em material ósseo. Os alvos moleculares aplicados são sensíveis para detectar DNA de *T. pallidum* em pacientes com titulação sorológica até 1:8 e em soros fracamente reatores. A frequência de pedido de pesquisa parasitológica varia de 2 a 10%. **Palavras-chave:** treponematoze, paleogenética, DNA antigo, sífilis, *Treponema pallidum*, hibridização.

## Abstract

**Objectives:** To check the presence of Treponematoses in human remains of centuries XVII to XIX from the Rio de Janeiro city. To determine the parasitological profile of individuals with syphilis, and to evaluate the molecular diagnosis of *T. pallidum* in serum. **Methodology:** The paleogenetic analysis of *Treponemas* was applied in 48 samples of the Nossa Senhora do Carmo Church (INSC) and Cemetery Praça XV (CPXV) archaeological sites, dating of the XVII to XIX centuries, in order to detect the presence of Treponematoses. Was performed aDNA extraction followed of aDNA hybridization in nylon membrane by Dot Blot method., including negative (Human DNA) and positive (*T. pallidum* DNA of references strains, Nichols (*T. p. ssp. pallidum*) and CDC2 (*T. p. ssp. pertenue*) controls. The molecular technique was applied to detect the presence of *Treponemas* using 3 molecular targets for *T. pallidum*, 47KDa, DNA Pol A e 15KDa. The efficiency of molecular detection of *T. pallidum* was previously assessed by PCR in the references strains, Nichols and CDC2, and in 18 serum samples from patients with syphilis from Units of Health in Rio de Janeiro. The molecular diagnosis of treponematoses in serum was evaluated by PCR technique and additionally, medical records of patients with syphilis were analyzed to assess their parasitological profile. **Results:** In paleogenetic analysis, we detected the infection by *Treponema* sp. on 7/22 (31.8%) of individuals from INSC archaeological site, 4 (18%), 5 (22.7%) and 12 (54.5%) for targets 47KDa, DNA Pol A and 15KDa, respectively. The archaeological site CPXV the positivity treponematoses was observed in 8/26 (30.7%) individuals, 8(30.7%), 3 (11.5%) and 2 (7%) for the targets 47KDa, DNA Pol A and 15 KDa, respectively. All the hybridization controls, negative and positives, demonstrated the expected results. Regarding the evaluation of the molecular detection in sera from patients with syphilis, 12/18 (66.6%) were positive, with 8 (44.4%), 5 (27.7%) and 4 (22.2%) individuals positive for 47KDa, DNA Pol A and 15KDa targets, respectively. The PCR technique was effective for detection of *T. pallium* in serum, even in samples reactors weakly in serology. The analysis of the parasitological profile of individuals with syphilis could not be conducted by the absence or insufficiency of medical requests for parasitological test. In patients from the Pedro Ernesto Hospital, 6/62 (9.6%) had request for parasitological test in the period from 2008-2013, with 3 (31.2%), 2 (20.8%) and 1 (10.4%) positive for *Giardia lamblia*, *Strongyloides stercoralis* and *Ascaris lumbricoides*, respectively. At the Center for School Health Germano Sinval Faria, only 1/50 (2%) filed a request for parasitological examination, being positive for *Iodamoeba bustchilli*. **Conclusions:** Infection by *T. pallidum* was detected in individuals of the historical period from the Rio de Janeiro city. The prevalence of infection by *T. pallidum* was similar in both archaeological sites, regardless of different ethnicities and socioeconomic levels, which were characteristic of the populations buried in the two sites of study. The technique of aDNA hybridization with 3 molecular targets proved to be efficient in detecting treponematoses in bone material. The molecular targets applied are sensitive to detected DNA of *T. pallidum* in patients with serological titer under 1:8 and in reactors weakly serum. The frequency of request for parasitological examination ranges from 2 to 10%. **Key Words:** treponematoses, paleogenetic, ancient DNA, *Treponema pallidum*, hybridization.

## Sumário

	Páginas
1- Introdução	1
1.1- Hipóteses para a origem da sífilis	1
1.2- Detecção de aDNA de <i>T. pallidum</i>	3
1.3- Diagnóstico diferencial entre treponematoses	3
1.4- Sífilis e coinfeções	4
2- Revisão Bibliográfica	5
2.1- A paleogenética e suas aplicações	5
2.2- O agente <i>Treponema pallidum</i>	7
2.3- Estrutura Genômica de <i>Treponema pallidum</i>	9
2.4- Doenças associadas à <i>Treponema pallidum</i>	10
2.5- Sítios Arqueológicos do estudo	13
2.5.1- Igreja Nossa Senhora do Carmo da Antiga Sé (INSC)	13
2.5.2- Cemitério Praça XV (CPXV)	15
3- Justificativa	17
4- Objetivos	18
4.1- Objetivo Geral	18
4.1- Objetivos específicos	18
5- Metodologia	19
5.1- Análise molecular e parasitológica de pacientes atendidos em Unidades de Saúde do Rio de Janeiro	19
5.1.1- Avaliação do diagnóstico molecular de <i>T. pallidum</i> em soros	19
5.1.2- Perfil parasitológico	20
5.2- Análise paleogenética	21
5.2.1- Coleta paleogenética	21
5.2.2- Sítios arqueológicos	21
5.2.2.1- Sítios arqueológico Igreja Nossa Senhora do Carmo	21
5.2.2.2- Sítio arqueológico Cemitério Praça XV	22

5.2.3- Procedimentos para pesquisa com aDNA	25
5.2.4- Extração de aDNA	25
5.2.5- Reação em Cadeia da Polimerase	26
5.2.6- Sequenciamento nucleotídico e análise das sequências	28
5.2.7- Ensaio de Hibridização de aDNA	28
6- Resultados	30
6.1- Padronização da PCR	30
6.2- Avaliação da detecção molecular de <i>T. pallidum</i> por PCR	36
6.3- Perfil parasitológico de pacientes com indicação clínica de sífilis e/ou soropositivos	40
6.4- Análise paleogenética	40
6.4.1- Extração e dosagem de aDNA	40
6.4.2- Ensaio de Hibridização de aDNA	42
7- Discussão	51
7.1- Análise parasitológica	59
7.2- Análise da detecção molecular de <i>T. pallidum</i> em soros	61
8- Conclusões	62
9- Aspectos Éticos	63
10-Referências Bibliográficas	64
Anexos	

## LISTA DE FIGURAS, GRÁFICOS E TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Amostras de soro selecionadas para avaliação do diagnóstico molecular de Sífilis	20
<b>Tabela 2:</b> Amostras do estudo correspondentes ao sítio Arqueológico INSC	23
<b>Tabela 3:</b> Amostras analisadas do sítio arqueológico CPXV	24
<b>Tabela 4:</b> Primers utilizados para diagnóstico molecular de <i>Treponema</i> sp. e genotipagem das subespécies de <i>T.pallidum</i>	27
<b>Tabela 5:</b> Resultado da detecção molecular para os alvos 47KDa, DNA Pol A e 15KDa em amostras de soro de pacientes soropositivos	37
<b>Tabela 6:</b> Resultados de hibridização de aDNA em amostras humanas do sítio arqueológico INSC	44
<b>Tabela 7:</b> Resultados de hibridização de aDNA em amostras humanas do sítio arqueológico CPXV	45
<b>Figura 1:</b> Coleta Paleogenética de amostras de restos humanos e análise do contexto arqueológico durante a primeira etapa da escavação da Igreja Nossa Senhora do Carmo (2007)	22
<b>Figura 2:</b> Resultado da eletroforese em agarose 3% do PCR para o gene 47 KDa de <i>T. pallidum</i> sp.	31
<b>Figura 3:</b> Resultado da eletroforese em agarose 3% do PCR para o gene DNA Pol A de <i>T. pallidum</i> sp.	31
<b>Figura 4:</b> Resultado da eletroforese em agarose 3% do PCR para o gene 15KDa de <i>T. pallidum</i> sp.	32
<b>Figura 5:</b> Alinhamento de sequências do alvo molecular 47KDa	33
<b>Figura 6:</b> Alinhamento de sequências do alvo molecular DNA Pol A	34
<b>Figura 7:</b> Alinhamento de sequências do alvo molecular 15KDa	35
<b>Figura 8:</b> Resultado da eletroforese em agarose 3% da PCR para o gene 47KDa de amostras de soro de pacientes	38

<b>Figura 9:</b> Resultado da eletroforese em agarose 3% da PCR para o gene DNA Pol A de amostras de soro de pacientes	38
<b>Figura 10:</b> Resultado da eletroforese em agarose 3% da PCR para o gene 15KDa de amostras de soro de pacientes	38
<b>Figura 11:</b> Alinhamento de amostras de soro	39
<b>Figura 12:</b> Diagramas representativos das membranas de hibridização de aDNA	46
<b>Figura 13:</b> Resultado e representação esquemática de hibridização de aDNA com amostras de remanescentes humanos dos sítios arqueológicos	47
<b>Figura 14:</b> Mapa da distribuição geográfica de bejel e pinta	55
<b>Gráfico 1:</b> Concentrações de aDNA das amostras do sítio arqueológico INSC	41
<b>Gráfico 2:</b> Concentrações de aDNA das amostras do sítio arqueológico CPXV	41
<b>Gráfico 3:</b> Absorbâncias das amostras do sítio arqueológico INSC	42
<b>Gráfico 4:</b> Absorbâncias das amostras do sítio arqueológico CPXV	42

## ABREVIATURAS/SIGLAS

<b>ssp.</b>	Subespécie
<b>sp</b>	espécie
<b>AP</b>	Antes do presente
<b>BP</b>	Before Present
<b>AD</b>	Ano Domini
<b>aDNA</b>	DNA antigo
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>pPCR</b>	Produto de PCR
<b>pb</b>	Pares de base
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>IAB</b>	Instituto de Arqueologia Brasileira
<b>VDRL</b>	Venereal Disease Research Laboratory
<b>TPHA</b>	Treponema Pallidum Haemagglutination assay
<b>KDa</b>	Kilodaltons
<b>mg</b>	miligramas
<b>g</b>	gramas
<b>ORFS</b>	Open Reading Frame = Fases de leitura aberta
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphis</i> = polimorfismo de base única
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Lenght Polimofism = polimorfismo baseado no tamanho do fragmento de restrição
<b>INSC</b>	Igreja Nossa Senhora do Carmo
<b>CPXV</b>	Cemitério Praça XV

## 1- Introdução

### 1.1- Hipóteses para a origem da sífilis

As treponematoses são um grupo de quatro doenças humanas causadas por membros do gênero *Treponema*. A sífilis, causada por *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, a boubá, por *Treponema pallidum* ssp. *pertenue*, a bejel, por *Treponema pallidum* ssp. *endemicum* e a pinta pela espécie *Treponema carateum* (Murray PR *et al.* 2006). A sífilis foi epidemiologicamente relatada pela primeira vez em 1495, e sua origem ainda permanece incerta, assim como sua relação com as outras treponematoses humanas (Harper KN *et al.* 2008). A controversa vem de três hipóteses sobre a origem da sífilis: a Colombiana, que sugere que a doença emergiu nas Américas e, posteriormente, levada à Europa pelos exploradores europeus (Crosby AWJR 1969); a Pré-Colombiana, que sugere que a sífilis e outras treponematoses existiram por todo o Velho Mundo antes do período da grande epidemia, mas foram erroneamente diagnosticadas como outras doenças, principalmente com a hanseníase (Hackett CJ 1963); e por último, a Unitária, que sugere a existência de uma única treponematose que se manifesta de acordo com diferentes condições climáticas e geográficas, e também com diferentes estágios de desenvolvimento cultural de cada população (Hudson E 1965). Assim, elas sempre estariam distribuídas por todo o mundo de maneira uniforme (Hudson E 1965).

Devido às relações filogenéticas muito próximas entre as subespécies de *Treponemas* sugere-se que elas originaram-se de um ancestral comum. Segundo alguns autores, *T. p.* ssp. *pertenue* teria surgido no *Homo erectus* na África Equatorial, sob a forma de boubá e foi sendo transmitida através do contato social e se espalhando pelo mundo por intermédio das migrações humanas. Teria atingindo a Ásia e a América do Norte, onde evoluiu para *T. p.* ssp. *endemicum* (bejel) e posteriormente para *T. p.* ssp. *pallidum* (sífilis) (Jel M *et al.* 2000; Perine PL *et al.* 1984; Rothschild BM e Rothschild C 1994; Rothschild C e Rothschild BM 2000). Em estudo realizado por De Melo F *et al.* (2010), a integração de dados paleopatológicos e filogenéticos foram corroboradas com as hipóteses sobre a origem da sífilis. Com base na localização geográfica de todas as evidências paleopatológicas de treponematoses pré-colombianas e a análise de 21 regiões do

genoma de diferentes linhagens de *T. pallidum*, obtidas a partir de Harper KN *et al.* (2008), foram estimadas as taxas evolutivas para as três hipóteses: 1) Treponematoses acompanharam a evolução humana desde *Homo erectus*; 2) Elas teriam surgido na Europa de uma cepa menos virulenta levada pelos marinheiros de Colombo quando retornaram das Américas; 3) A sífilis venérea teria emergido nas Américas entre 16.500 e 5.000 anos AP. O estudo mostrou que, a taxa evolutiva observada em *T. p. ssp. pallidum* é mais plausível com a hipótese Colombiana. Portanto, considerando a data da entrada do homem nas Américas foi posterior a 16.500 anos AP, e o mais antigo e aceitável registro de sífilis venérea no Novo Mundo, 5.000 anos AP, os resultados foram mais congruentes com a origem da doença nas Américas. Entretanto, os prováveis casos de sífilis venérea pré-colombiana fora das Américas não podem ser explicados (Cole G e Waldron T 2003), desta maneira a origem geográfica da sífilis continua indefinida (De Melo F *et al.* 2010).

Durante o século XIX muitos médicos ainda discutiam acerca da origem da sífilis. Em 1844 Sigaud relata: "A sífilis faz grandes devastações entre as populações nômades, e embora alguns observadores pensem que ela se difundiu principalmente após a conquista dos portugueses, verificou-se que a doença já existia entre os indígenas que ainda não tinham tido contato com os europeus" (*apud* Araújo OS 1928). Ribeiro de Sampaio em 1775 diz ter encontrado tribos indígenas com sintomas evidentes do mal venéreo (*apud* Araújo OS 1928). Contradizendo, McNeill WH (1996) comenta: "No que respeita à origem da sífilis (...) para a América do Sul ela foi levada pelos portugueses, ocasião em que houve disseminação entre os habitantes que entraram em contato com os colonizadores, sobretudo entre as populações litorâneas. Os habitantes do interior ficaram por longo tempo completamente indene".

Estudos de recuperação de aDNA de *T. pallidum* confirmam a presença da infecção em amostras ósseas, encontradas na Ilha de Páscoa, Chile, com evidências paleopatológicas (Kolman C *et al.* 1999). A datação da amostra, 240±50 anos AP (TO-7540), é consistente com a exposição à sífilis venérea durante uma das viagens europeias de 1700s. O debate sobre a origem da sífilis venérea se focaliza sobre seu caráter endêmico ou não no Novo Mundo antes do contato europeu.

## 1.2 – Detecção de aDNA de *T. pallidum*

A detecção e caracterização molecular de *T. pallidum* em populações de contextos históricos e de origens diferentes podem dar a resposta para a reconstrução da história evolutiva da sífilis. Montiel R *et al.* (2012) apresentaram resultados de recuperação de aDNA de *T. p. ssp. pallidum* em amostras ósseas de remanescentes neonatos recuperados a partir da cripta de "La Ermita de la Soledad" (séculos XVI-XVII), Província de Huelva, na Espanha. A detecção de aDNA foi realizada através da aplicação de PCR utilizando diferentes alvos moleculares. Segundo os autores, o principal fator para o sucesso da detecção foi o estudo de indivíduos neonatos com sinais de sífilis congênita como fonte de pesquisa para aDNA (Montiel R *et al.* 2012). Entretanto, existem alguns estudos que mostram a dificuldade de se recuperar aDNA de *T. pallidum* em remanescentes humanos. Bowman AS e Brown TA (2005) sugerem que aDNA de *T. pallidum* não é preservado em ossos humanos, e portanto, não pode ser utilizado em estudos que abordem a sífilis venérea. Barnes I e Thomas MG (2006) e Von Hunnius *et al.* (2007) relatam insucesso após aplicarem técnicas moleculares em amostras arqueológicas.

## 1.3 – Diagnóstico diferencial entre treponematoses

Estudos têm sido realizados a fim de se padronizar um diagnóstico diferencial entre as treponematoses em material ósseo, porque há semelhança entre as lesões causadas por elas (Kolman C *et al.* 1999; Centurion-Lara *et al.* 2000, 2006; Fillipini J 2012). As análises biológicas, microbiológicas, imunológicas, e até mesmo moleculares, algumas vezes falham na distinção entre *T. p. ssp. pallidum*, *T. p. ssp. pertenue* e *T. p. ssp. endemicum*, devido a suas semelhanças na morfologia e composição antigênica (Von Hunnius *et al.* 2007; Cejková D *et al.* 2012; Grin EI 1956). Investimentos em análises do genoma ainda parecem ser a melhor escolha para estabelecer as diferenças genéticas entre estas subespécies. Cejková *et al.* 2012 realizaram uma análise de genomas completos das subespécies *pallidum*, *pertenue* e *endemicum* de *T. pallidum*, e revelaram uma similaridade de mais de 99% entre elas.

#### 1.4 – Sífilis e coinfeções

Diversos estudos tem relatado coinfeções de sífilis com outras DSTs (Tornatore M *et al.* 2012; Schuelter-Trevisol F *et al.* 2011; Kassu A *et al.*, 2004). Estes resultados são explicados pelo fato de serem doenças que compartilham as mesmas rotas de infecção, como a transmissão sexual, a vertical, o uso de drogas intravenosas e transfusão sanguínea (Chen J *et al.* 2011). Em particular no caso da AIDS tem sido crescente o número de relatos de casos de coinfeções com *T. p. ssp pallidum*, o que representa um sério problema de saúde pública, pois na falta de diagnóstico e tratamento corretos, acarreta em graves efeitos para o indivíduo infectado, principalmente em consideração ao estágio da doença a que ele se encontra, o que pode agravar a sua situação. Por isso há necessidade do reconhecimento precoce da sífilis assim como de outras coinfeções (Oliveira FL *et al.* 2011). No entanto, no que diz respeito à coinfeção de sífilis com parasitoses intestinais, há ausência de dados. Jennings E (1912) relata achados de protozoários em amostras de cancro duro e de sangue de indivíduo supostamente com sífilis. A escassez de trabalhos neste tema impossibilita o conhecimento do perfil de indivíduos com este tipo de infecção concomitante e a associação de fatores que estejam epidemiologicamente relacionados a esse desfecho. Seja através da análise de amostras arqueológicas ou modernas o delineamento de perfis parasitológicos das populações é um indicador de condições de saúde e higiene de uma população.

O propósito desta pesquisa foi investigar a circulação de *Treponema pallidum*, através da análise paleogenética, em remanescentes humanos de sítios arqueológicos da cidade do Rio de Janeiro datados dos séculos XVII-XIX, para proporcionar informação básica sobre paleoepidemiologia da sífilis e outras treponematoses na cidade. Em uma análise inicial, o estudo também se propôs avaliar o diagnóstico molecular de *T. pallidum* em amostras de soros de pacientes atendidos em Unidades de Saúde do Rio de Janeiro, assim como determinar o perfil parasitológico dos mesmos para comparar ao perfil paleoparasitológico já traçado em indivíduos dos sítios arqueológicos deste estudo.

## 2- Revisão Bibliográfica

### 2.1- A paleogenética e suas aplicações

“O termo aDNA refere-se a qualquer vestígio ou traço de DNA proveniente de um organismo morto ou partes deste, assim como DNA extracorpóreo” (Herrmann B e Hummel S 1994 *apud* Iñiguez AM 2011). A recuperação de aDNA em amostras arqueológicas têm sido uma ferramenta útil na investigação de origem, dispersão e evolução de doenças presentes em populações ancestrais, assim como no entendimento dos processos de povoamento, tendo assim grande importância em pesquisas paleogenéticas (Iñiguez AM. 2011). Esta ciência tem como princípio a recuperação e análise de DNA presente em materiais arqueológicos (Iñiguez AM, 2011). O primeiro sucesso de recuperação de aDNA foi a partir de um fragmento de músculo seco de equídeo sul-africano, da espécie *Equus quagga*, extinto em 1883, onde foi realizada análise paleogenética através da detecção de um fragmento de 229 pb de mtDNA (Higuchi R *et al.* 1984). O primeiro relato de recuperação de aDNA humano refere-se a uma múmia egípcia datada de 2.400 anos AP (Pääbo S. 1985). Estes estudos demonstraram pela primeira vez que o aDNA pode ser preservado em restos fossilizados e recuperado quando submetidos às técnicas moleculares. Outros estudos tem utilizado a paleogenética como instrumento para demonstrar a presença de infecções em populações do passado pela detecção e recuperação de aDNA, assim como para o conhecimento da composição genética dos povos ancestrais. Guhl *et al* (1999) demonstraram a presença de aDNA de *Trypanosoma cruzi* em restos humanos mumificados, sem evidências patológicas da Doença de Chagas, isolados em áreas costeiras do Deserto do Atacama. Os autores concluíram que, há 4.000 anos, populações pré-históricas do Sul do Peru e Norte do Chile tinham tripanosomíase americana. Este cenário reflete a antiguidade da doença e sua presença nas Américas. Ribeiro-dos-Santos AKC *et al.* (1996) observaram que indivíduos de sítios arqueológicos do continente Sul-Americano apresentaram haplótipos ameríndios que até então só tinham sido encontrados em populações asiáticas. Isto sugere que a reduzida variabilidade genética dos ameríndios é produto do “efeito gargalo” ocorrido durante a migração humana da Ásia para a América, contribuindo também a dizimação dos povos indígenas causada pela colonização europeia no século XVI.

A sífilis também tem sido demonstrada em populações ancestrais através da recuperação de aDNA de *T. p. ssp. pallidum* em amostras arqueológicas. Como mencionado anteriormente, Kolman C *et al.* (1999) detectaram material genético da bactéria em múmia isolada a partir da Ilha de Páscoa, Chile, datada de 200 AP. O diagnóstico paleogenético confirmou o resultado obtido através da purificação de imunoglobulina que reagiu fortemente com antígeno de *T. p. ssp. pallidum*. Assim como os resultados de Montiel R *et al.* (2012), que apresentaram resultados de recuperação de aDNA de *T. p. ssp. pallidum* em remanescentes neonatos com sinais de sífilis congênita. No entanto, existe uma grande dificuldade de obtenção do aDNA, devido as ações tafonômicas que afetam mais *Treponemas* devido à ausência ou escassez de lipopolissacarídeos na membrana da bactéria, os quais são conhecidos por agirem como uma barreira física que impede a ação de componentes líticos. Ações tafonômicas referem-se à ecologia da decomposição bem como o entendimento de seus processos, incluindo dispersão, erosão, soterramento, exposição e preservação de um organismo morto (Efremov JA 1940).

Um dos materiais mais utilizados em pesquisas paleogenéticas é o material ósseo, devido a uma maior proteção biológica e, conseqüentemente, a possibilidade de uma maior recuperação de aDNA. O tecido ósseo é formado pelos osteoblastos, osteócitos, osteoclastos, e por um material intercelular calcificado, chamado de matriz óssea. Osteoblastos estão envolvidos no processo de formação óssea e permitem a remodelação e reparo em áreas lesionadas, apresentando importante atividade na formação de proteínas, principalmente o colágeno. Tais células dão origem a osteócitos, que são células achatadas residentes na matriz óssea e são armazenadores de cálcio. Os osteoclastos, por sua vez, são células multinucleadas especializadas cujo principal papel é a reabsorção óssea, participando em processos de regeneração do tecido após sofrerem fraturas. A matriz óssea consiste em uma parte inorgânica constituída por hidroxiapatita, e uma fração orgânica, formada principalmente por colágeno, proteínas não-colágenas e glicoproteínas (Campos PF *et al.* 2012; Junqueira LC e Carneiro J 2004). Os ossos são revestidos de membranas conjuntivas internas e externas, sendo elas o endóstio e o perióstio, respectivamente (Junqueira LC e Carneiro J 2004). O dano ao tecido ósseo inicia-se logo após a morte do indivíduo, o que posteriormente leva a um processo de degradação do DNA (Bell LS *et al.* 1996; Rizzi E *et al.* 2012).

Embora alguns autores discutam que a adsorção do DNA à hidroxiapatita e ao colágeno seja o fator principal para a preservação da molécula após a degradação do tecido ósseo, a completa compreensão da relação entre o DNA e o osso ainda é desconhecida (Campos PF *et al.* 2012; Gotherstrom *et al.* 2002; Montiel R *et al.* 2012). A degradação do DNA, após a morte do organismo, inicia-se através da ação de bactérias, fungos e insetos, e também por enzimas endógenas, tais como nucleases. Devido a esses fatores, existem grandes dificuldades de recuperação do material genético em amostras arqueológicas (Pääbo S 1991; Pääbo S *et al.* 2004). Também se sabe que em ambientes temperados ou de *permafrost*, assim como, o tipo de iluminação e pH, preservam melhor os materiais arqueológicos (Iñiguez AM 2011). Por último, as condições e tempo de preservação depois da escavação e coleta são fatores primordiais na preservação do aDNA (Pruvost M *et al.* 2007). Pruvost M *et al.* (2007) demonstraram que amostras arqueológicas escavadas recentemente, com datação mais antiga e sem terem passado por processo como lavagem e escovação tem maior conservação de aDNA em relação à amostras com datação mais recente, mas que foram limpas e estocadas em coleções museológicas. Entretanto, as técnicas moleculares, como a hibridização de DNA e da PCR, vêm sendo adaptadas a este tipo de material (Horn S 2012; Jaeger LH *et al.* 2012; Pääbo S 1991; Aufderheide AC *et al.* 2004). Estudos liderados pelo Dr. Svante Pääbo foram os pioneiros a descrever padronizações na técnica de PCR para ser utilizada em material arqueológico, tendo em vista a degradação e baixas concentrações de aDNA (Pääbo S *et al.* 1988; Pääbo S 2004). Para ambas as técnicas são requeridas modificações de protocolos que garantam a detecção do material genético ancestral (Iñiguez AM 2011).

## **2.2- O agente *Treponema pallidum***

A bactéria do gênero *Treponema* pertence à Ordem Spirochetales, Família Spiroquetaceae. Duas importantes espécies compõem este grupo: *T. pallidum* e *T. carateum*. A primeira subdivide-se em três subespécies: *pallidum*, *pertenue* e *endemicum* (Skerman VBD *et al.* 1980).

Espiroquetas apresentam um formato espiralado, onde é observado um endoflagelo ou um filamento axial, responsável pelos movimentos de rotação e

flexão (Fraser CJ *et al.* 1998). Este parasito humano obrigatório apresenta um tamanho que varia de 0,09 a 0,5 µm por 5 a 20 µm e divide-se transversalmente a cada 30 horas (Holt SC 1978). Seu cultivo tem sido realizado em células epiteliais de coelhos para obtenção de cepas a serem utilizadas em experimentos laboratoriais (Ho EL e Lukehart SA 2011). As cepas Nichols (*T. p. ssp pallidum*) e CDC2 (*T. p. ssp pertenue*) foram isoladas em 1912 e 1980 (Nichols HJ 1914; Liska SL *et al.* 1982), e completamente sequenciadas em 1998 e 2012, respectivamente (Fraser CJ *et al.* 1998; Cejková D *et al.* 2012). Fraser CJ *et al.* (1998) e Radolf JD *et al.* (1989) observaram ausência de capacidade metabólica e de fatores de virulência, assim como escassez de proteínas em sua membrana externa. Comparações entre *T. carateum* e três subespécies de *T. pallidum* sugerem uma grande semelhança morfológica e antigênica (Antal G *et al.* 2002). Estudos de reassociação de saturação de DNA demonstraram que, *T. p. ssp. pallidum* e *T. p. ssp. pertenue* apresentam mais de 90% de similaridade em sua composição genômica, além da semelhança que apresentam em sua morfologia, composição de proteínas e características fisiológicas (Miao R e Fieldsteel AH 1980). Cameron CE *et al.* (1999) demonstraram que a proteína glicerol fosfodiéster fosfodiesterase, de importante papel antigênico, é idêntica em 12 cepas de 5 espécies de *Treponemas* patogênicas. Análises de genomas completos das subespécies de *T. pallidum*, *pallidum* e *pertenue*, as quais não podem ser distinguidas morfológicamente, apontaram para uma identidade de 99,8% no genoma (Cejková D *et al.* 2012). No entanto, para a espécie *T. carateum*, pouco se sabe acerca de suas características morfológicas e genéticas, devido a sua multiplicação apenas em primatas, sem isolado conhecido, o que dificulta os estudos com esta espécie (Antal G *et al.* 2002). Com base na análise de genomas completos, um estudo recente demonstrou que a cepa Fribourg-Blanc isolada de babuínos (*Papio cynocephalus*) da África Oriental em 1966, pertence à *T. pallidum ssp. pertenue*. Isto aponta para o fato de que os primatas não-humanos podem se comportar como reservatórios desta subespécie, o que pode complicar os esforços para a erradicação da boubá (Zobaníková M *et al.* 2013).

### 2.3- Estrutura Genômica de *Treponema pallidum*

A bactéria *Treponema pallidum* não pode ser cultivada *in vitro*, logo o sequenciamento de genoma completo é uma importante ferramenta para tipagem molecular, identificação de fatores de virulência e desenvolvimento de vacinas. O genoma da *Treponema pallidum* ssp. *pallidum*, cepa Nichols, apresenta um genoma circular, com tamanho aproximadamente 1000 Kb (Kilobases), considerado o menor dentre os procariotos. Ele representa aproximadamente 1/4 do tamanho do genoma da *Escherichia coli* (Smajs D *et al.* 2012). *Treponema pallidum* possui cerca de 50% de conteúdo G+C, tem 1041 ORFs com uma média de tamanho de 1023 pb, representando 92,9% do genoma total. Dentre essas ORFs, presume-se que 55% sejam responsáveis pelas funções biológicas da bactéria, 17% codificam proteínas hipotéticas que são compartilhadas com outras bactérias e 28% são de novos genes (Fraser CJ *et al.* 1998).

As diferenças observadas entre as manifestações clínicas causadas pelas subespécies de *T. pallidum*, provavelmente são um reflexo da pouca diferença genética que há entre elas (Cejková D *et al.* 2012). Alguns genes têm sido estudados a fim de discriminar as subespécies. Noordhoek GT *et al.* (1989) encontraram apenas um SNP entre as subespécies *pertenue* e *pallidum*, ao comparar o gene *TpF1*. Assim como Centurion-Lara A *et al.* (1998) identificaram um único SNP no gene *tp15* usando a técnica de RFLP o qual permite uma diferenciação entre *T. pallidum* e as outras espécies e subespécies. Utilizando a mesma técnica, Cameron CE *et al.* (1999) identificaram diferenças entre os genes *gpd* e *tp92* entre subespécies de *T. pallidum* e a *T. paraluisuniculi*. Oito anos mais tarde, o mesmo autor descreve assinaturas genéticas no gene *tpnC*, que discriminam as subespécies *pallidum* e *endemicum*. A análise filogenética conduzida por Harper KN *et al.* (2002) demonstraram as subespécies de *Treponema* em clusters distintos com base em 21 regiões do genoma. No entanto, os autores discutem que poucos SNPs foram observados, e por isso, o nível de resolução da árvore filogenética é relativamente pobre. Centurion-Lara *et al.* (2006) apresentaram assinaturas genéticas específicas no gene *tpnI* que diferenciam *T. p. ssp endemicum* de *T. p. ssp pallidum* e *T. p. ssp. pertenue* das demais, e no gene *tpnC* diferenças entre *T. p. ssp. pallidum* e *T. p. ssp. pertenue*. Os autores sugerem que os poucos polimorfismos encontrados podem ser utilizados para a diferenciação entre as

subespécies. No entanto, o baixo número de cepas da subespécie *endemicum* utilizadas nos estudos não podem confirmar os resultados. Mikalová L *et al.* (2010) observaram uma diferença de apenas 0,36% a 0,37% em 6 regiões dos genomas de *T. p. ssp. pallidum* e *T. p. ssp. pertenue*, indicando uma alta similaridade entre as subespécies. Ainda corroboram que provavelmente as pequenas diferenças entre os genomas estejam relacionadas às diferentes manifestações clínicas. Stamm LV *et al.* (1998) mostraram diferenças nucleotídicas no gene *trpJ* entre as cepas Nichols (*T. p. ssp. pallidum*) e Gauthier (*T. p. ssp. pertenue*), e afirmam que este pode ser considerado um marcador genético para distinguir subespécies. Porém, Antal G *et al.* (2002) encontraram uma sequência do gene *trpJ* de um isolado de *T. p. ssp. pallidum* idêntica a da cepa Gauthier (*T. p. ssp. pertenue*), consequentemente este gene não seria um marcador espécie-específico adequado como apontado anteriormente.

#### **2.4- Doenças associadas à *Treponema pallidum***

- Pinta (*T. carateum*): também conhecida como “mal del pinta” ou caratê, causa distintas lesões cutâneas despigmentadas, e é transmitida frequentemente em crianças através do contato direto. Práticas de tatuagem e escarificações também são mencionadas como formas de transmissão (Powell ML e Cook DC 2005). Pressupõe-se que a espécie humana é o único reservatório do microrganismo, e as manifestações clínicas que aparecem são quase exclusivamente cutâneas com observações de manchas escuras pelo corpo (Talhari S *et al.* 1975). A infecção se inicia quando a bactéria entra por uma abertura cutânea e se dissemina por via sanguínea e sistema linfático (Powell ML e Cook DC 2005). Não há evidências de que esta treponematose cause lesões ósseas, ao contrário das outras (De Melo F *et al.* 2010). A pinta é considerada a treponematose com maior facilidade de transmissão, entretanto, um portador não tratado pode viver por muitos anos com a doença, ao contrário da sífilis venérea e a endêmica (Powell ML e Cook DC 2005). Localiza-se nas populações pobres de algumas zonas áridas e semiáridas das Américas Central, Norte (México) e Sul (Venezuela, Equador, Colômbia, Peru e Brasil) (Antal G *et al.* 2002; Hackett CJ 1963). No Brasil ela é observada predominantemente no Estado do Amazonas (Talhari S *et al.* 1975).

- Boubá (*T. p. ssp. pertenue*): foi descoberta em 1905 por Castellani (Castellani A 1905). Esta é a treponematose endêmica mais prevalente entre populações rurais de florestas tropicais, onde há altos índices de precipitação e umidade. Acomete principalmente comunidades pobres, populosas e com péssimas condições de higiene (Antal G *et al.* 2002; Hackett CJ 1963). Atualmente encontra-se em algumas áreas isoladas da África e Ásia (Narain JP 2011). Assim como a pinta, esta doença também pode ser transmitida em crianças através do contato direto com superfícies que apresentem lesões infecciosas, nos membros, tronco ou face (Antal G *et al.* 2002; Powell ML e Cook DC 2005). Wicher K *et al.* (2000) relataram através de um modelo experimental em cobaia a falta da passagem transplacentária da *T. p. ssp. pertenue*. As características clínicas da boubá são a presença de lesões primárias nas mucosas e úlceras cutâneas. Em estágios tardios causa lesões ósseas graves. A alteração mais marcante no osso é a *tíbia em sabre*, onde é desenvolvido um processo de espessamento ósseo, em particular na superfície anterior e medial da tíbia (De Melo F *et al.* 2010). Geralmente esta treponematose tende a ser menos virulenta em relação à sífilis, provavelmente devido às características genômicas (Smajs D *et al.* 2012).

- Bejel (*T. p. ssp. endemicum*) também chamada de sífilis endêmica é prevalente em comunidades rurais subdesenvolvidas, caracterizadas por ausência de saneamento básico, e poder econômico e nível educacional baixos, assemelhando-se à boubá e à pinta nestes aspectos. Seu modo de transmissão também é pelo contato direto com as lesões cutâneas e pelo compartilhamento de objetos de uso pessoal. Desta maneira, quando um membro da família é acometido pela doença, esta atinge rapidamente os outros membros, principalmente os mais próximos. A transmissão do microrganismo é mais frequente em crianças de até 15 anos de idade (Antal G *et al.* 2002; Grin EI 1956). Os sintomas apresentam-se na forma de inflamações e de destruição de tecidos, incluindo ossos, porém apenas em estágios avançados. A doença está presente em áreas de climas secos, quentes e temperados, em comunidades rurais ou semiurbanas. Sua distribuição geográfica cabe aos territórios do Norte e Sudeste da Europa, Rússia, Mongólia, Oriente Médio, Leste do Mediterrâneo, África do Sul e algumas populações nômades e seminômades do Norte da África (Antal G *et al.* 2002).

– Sífilis venérea e congênita (*T. p. ssp. pallidum*): esta subespécie foi descoberta pelo bacteriologista Fritz Schaudinn no ano de 1905, sendo associada à doença que tinha sido denominada por Girolamo Fracastoro em seu poema intitulado como “Syphilis sive morbus gallicus”, escrito em 1530 (Thyresson N 1995). A sífilis apresenta uma distribuição mundial com cerca de 12 milhões de novos casos por ano (OMS 2008). Admite-se que seja uma doença prevalente em populações urbanas, e não há correlação que mostre a preferência para manifestação da doença em determinadas condições climáticas (Hackett CJ 1963; Meyer C *et al.* 2002). Há uma grande discrepância nos índices de mortalidade entre as regiões brasileiras, possivelmente devido às diferenças na disponibilidade de serviços de saúde e na apuração das notificações (Hackett CJ 1963; Lima BGC 2002). Entre 1998 e 2003 observaram-se constantes notificações de casos de sífilis congênita, e após este período foi observada uma estabilização. A região Sudeste notificou cerca de 50% dos casos do país em 2006, o que pode ser um reflexo dos esforços em detectar e registrar a doença. Nas outras regiões a incidência foi de 28% para o Nordeste, 7,8% para o Centro-Oeste, 6,9% para o Norte e 6,8% para o Sul (MS 2006).

A forma de transmissão mais frequente da sífilis venérea é o contato sexual, o que ocasiona o aparecimento de úlceras genitais, erupções cutâneas e desenvolvimento de diversas manifestações tardias. *T. p. ssp. pallidum* é a única subespécie com transmissão pela via sexual, além da via de contato pelas lesões, como ocorre nas demais treponematoses. Em média três semanas após a infecção surge uma lesão genital, característica da fase primária da doença, que em poucas semanas espalha-se pelo corpo, levando a outros comprometimentos, como febre, linfadenopatia generalizada, laringites, entre outros. Desta forma, o paciente não tratado atinge a fase secundária (Fitzpatrick TB 2005). Esta fase pode durar até quatro anos, e após este período, uma fase de latência se inicia, e a doença passa a ser detectada somente através de testes sorológicos. Aproximadamente 1/3 dos pacientes não tratados desenvolvem o estágio terciário da sífilis, tendo como sintomas, o acometimento do sistema cardiovascular, neurológico, esquelético e o aparecimento de lesões granulomatosas com centros necróticos coagulados. O dano causado no sistema cardiovascular, e a invasão no sistema nervoso central

ocorrem em mais de 40% dos casos de sífilis, e causa diversas sequelas neurológicas tardias em 8-10% das pessoas não tratadas (De Melo F *et al.* 2010; Gjestland T 1955; Lukehart SA 1988).

Uma gestante infectada pode transmitir o agente para o feto através da placenta ou em alguns casos, pelo canal de nascimento, denominando-se de sífilis congênita. Em países de terceiro mundo, a prevalência de mulheres infectadas na idade reprodutiva varia de 3-15% (Walker DG e Walker GJ 2002). Segundo dados do Ministério da Saúde (2012) em 2011 a taxa de incidência da doença 3,3 casos por 1.000 nascidos vivos, sendo as maiores taxas para as Regiões Nordeste e Sudeste com 3,8 e 3,6, respectivamente. Esta infecção pode ocasionar aborto espontâneo, nascimento prematuro, ou o nascimento de uma criança com sífilis ativa ou latente (Antal G *et al.* 2002). As manifestações patológicas dividem a sífilis congênita em precoce, do nascimento até os 4 anos de idade, e tardia, dos 5 aos 15 anos de idade. Na fase precoce são acometidos o sistema esquelético e as mucosas, e na fase tardia surgem sintomas como malformações em partes específicas do cérebro, *tíbia em sabre*, dentes de Hutchinson, entre outros (Hillson S *et al.* 1998; Tramont EC 1990). Periostites em ossos longos, *tíbia em sabre*, e nariz em forma de sela, são os sinais paleopatológicos mais importantes de sífilis congênita (De Melo F *et al.* 2010).

## **2.5- Sítios Arqueológicos do estudo**

### **2.5.1 - Igreja Nossa Senhora do Carmo da Antiga Sé (INSC)**

Conhecida como Ermida de Nossa Senhora do Ó, antes da chegada dos carmelitas no século XVI, o sítio arqueológico Igreja Nossa Senhora do Carmo da Antiga Sé, localiza-se na Rua Primeiro de Março, antiga Rua Direita, de frente para a Praça XV, no centro da cidade do Rio de Janeiro. Para receber a Família real, a igreja passou por intensas restaurações e aprimoramentos para oferecer uma infraestrutura que estivesse ao alcance da Corte portuguesa e aparentemente próxima às cidades europeias. Esta igreja foi escolhida como o principal templo da cidade, nomeada como a capela real em 1808, após a chegada da família Real Portuguesa ao Brasil e logo como catedral da cidade, condição que permaneceu até 1976. O seu interior apresenta-se no estilo rococó, e foi palco de eventos históricos

importantes, como as coroações de D. Pedro I e D. Pedro II como imperadores (Dias O 2008). Como parte da comemoração dos 200 anos da chegada de D. João e da Família Real Portuguesa ao Rio de Janeiro, em 2007 a capela passou por restaurações (Dias O 2008). Existente desde o século XVI, a igreja foi uma das primeiras a construir catacumbas destinadas aos seus confrades (Rodrigues C 1997). Segundo Debret JB (1989) estas construções seriam de muito antes de 1816. Durante as obras de restauração foram encontrados numerosos enterramentos sob o piso da Igreja. Esses achados seriam resultado das práticas de sepultamentos cristãos até o meado do século XIX (Rodrigues C 1996). Sugere-se que estes enterramentos foram realizados de acordo com a hierarquia social ao qual o indivíduo pertencia enquanto vivo. Aqueles mais respeitosos ocupavam locais privilegiados, como covas próximas aos altares e aos santos (Medeiros JC 2012). A escavação do local foi realizada pelo IAB durante os meses de janeiro a junho. O sítio foi dividido em 22 áreas escavadas, e diversas estruturas arqueológicas, como ossos, cerâmicas neo-brasileiras e ferramentas, foram encontradas e identificadas no local. Artefatos católicos também foram encontrados próximos ou associados aos corpos, assim como artefatos de origem africana que estavam associados a uma das áreas do sítio, a Capela Vermelha (Dias O 2008). Rodrigues C (1996) relata a restrição da igreja quanto aos enterramentos em seu interior. Após numerosos concílios determinou-se que a área interna dos templos seria para sepultamentos de padres, monges, bispos e alguns privilegiados, enquanto que a área externa ficaria para os menos abastados e não eclesiástica da cidade. Foram conduzidas no local a análise bioantropológica e a coleta paleogenética (Ver descrição abaixo no item 5.2.1). Após a coleta os achados foram novamente enterrados, sendo envolvidos por um vasilhame de plástico ou vidro com informações dos trabalhos realizados, objetivando documentar os elementos para pesquisas futuras (Dias O 2008).

Segundo os registros do IAB e da Unidade de Paleogenética, os dados gerais de gênero e idade revelaram que a maioria dos indivíduos eram jovens adultos de até 30 anos de idade (78%), não havendo diferença entre a proporção de indivíduos masculinos e femininos. A ancestralidade matrilinear humana foi determinada em 71,8 % dos indivíduos, incluindo indivíduos do presente estudo (Tabela 2). O perfil haplotípico europeu foi predominante (91,3%) nos enterramentos primárias e secundárias, com o haplogrupo U encontrado mais frequentemente, 26,7% e 25%,

respectivamente (Jaeger LH *et al* 2012). Informações sobre a presença de <sup>1</sup>tuberculose e parasitas intestinais neste sítio também foram verificadas. Foi detectada, através da análise paleogenética, uma prevalência de 53,1% do complexo de *Mycobacterium tuberculosis* entre indivíduos deste sítio (Jaeger LH *et al.* 2012); e pela análise paleoparasitológica, 11,8% de helmintos intestinais (Jaeger LH *et al.* 2013c). Foi observada a presença de *Trichuris* sp. e *Ascaris* sp., com prevalência de aproximadamente 5% para cada parasito.

### **2.5.2 - Cemitério Praça XV (CPXV)**

O sítio arqueológico Cemitério da Praça XV foi descoberto em 1996 durante a construção de um túnel projetado sob o Morro do Livramento no porto, na região central do Rio de Janeiro (Tavares RB 2012). Historicamente este cemitério foi conhecido por sepultar corpos de indivíduos da população geral, pessoas que morriam após grandes epidemias que tenham assolado a cidade (Informação verbal)<sup>1</sup>. Contudo, a região abrigou predominantemente corpos de escravos recém-chegados da África (Jaeger LH *et al.* 2013a) e aqueles que morriam nos depósitos enquanto esperavam para serem vendidos. As condições insalubres que muitos cemitérios apresentavam fizeram com que diversos moradores de algumas freguesias urbanas da Corte organizassem abaixo-assinados destinados à autoridades municipais e imperiais, solicitando a interdição destes cemitérios e o afastamento das áreas residenciais. O mau cheiro que os mortos exalavam resultou em uma intolerância olfativa por parte da população, incentivando-a reivindicar mudança dos locais de sepultamentos. Uma das áreas utilizadas para esta prática era atrás do Hospital da Santa Casa de Misericórdia, onde eram enterrados escravos africanos e seus descendentes, indígenas e os falecidos no hospital. O local passou a não mais atender a demanda dos sepultamentos, em razão do incremento do tráfico de escravos. Por determinação governamental o cemitério permaneceu funcionando até ser transferido para o Valongo, por volta de 1769 (Rodrigues C 1997).

---

<sup>1</sup> Nota de rodapé  
Informação verbal fornecida pelo Dr. Ondemar Dias em 2008

No salvamento arqueológico conduzido pelo IAB, esqueletos humanos que datam dos séculos XVIII e XIX de enterramentos secundários foram expostos, assim como os artefatos de cultura africana. As amostras ósseas coletadas durante o salvamento arqueológico passaram por limpeza das superfícies para retirada de restos de solo, sem adição de substâncias químicas, antes de serem estocadas no acervo do IAB nas condições de temperatura ambiente e protegidas da luz. Segundo os registros, durante a escavação uma série de esqueletos não foi identificada devido ao elevado grau de desagregação dos enterros e separação anatômica dos indivíduos (Dias O 2008). De acordo com as análises bioantropológicas de 37 crânios, 59% eram jovens adultos, 46% eram do gênero masculino, 38% feminino e 16% indeterminados. Em relação à análise étnica, 11/14 crânios analisados exibiram evidências de origem africana e 9/12 demonstraram modificações dentárias intencionais descritas em populações da África (Jaeger *et al.* 2013a).

A análise parcial de ancestralidade humana dos indivíduos, também com base nos polimorfismos da região HVS-I, determinou os haplótipos de 3 indivíduos, um africano, L1, e dois europeus, M e T/J. (Jaeger LH *et al.* 2013b, Tabela 3). Esta análise está em andamento como parte de outro projeto. A análise bioantropológica com base em 36 crânios mostrou uma heterogeneidade étnica, indígena, mongolóide e africana, com forte predominância de negroides, 31% (n=11), para 5% (n=2) e 3% (n=1) de indígena e mongolóide, respectivamente (segundo registros da Unidade de Paleogenética). A pesquisa paleoparasitológica do sítio revelou que 8/10 (80%) indivíduos estavam infectados com parasitos intestinais, sendo o mais frequente *Trichuris* sp. com 70%. (Jaeger LH *et al.* 2013b). A análise morfológica de 26 ovos recuperados revelou que a maior parte corresponde a *Trichuris trichiura*, incluindo indivíduos analisados neste estudo.

### **3- Justificativa**

O propósito desta pesquisa é investigar a presença de treponematoses em remanescentes humanos do período histórico brasileiro (séculos XVII-XIX), provenientes dos sítios arqueológicos Igreja Nossa Senhora do Carmo, sugestiva de população europeia e Cemitério da Praça XV, sugestivo de população europeia, ameríndia e majoritariamente africana. Este material pode oferecer uma oportunidade de testar a capacidade de recuperação de aDNA de *Treponema* em material arqueológico. A avaliação da detecção molecular de DNA de *Treponema* também será verificada em soros de pacientes com sífilis ou com indicação clínica da doença, atendidos em Unidades de Saúde do Rio de Janeiro. Trabalhos como este são escassos e, portanto, há a necessidade do conhecimento da recuperação de DNA neste tipo de material para o fornecimento de um diagnóstico molecular adicional. Numerosos trabalhos tem relatado coinfeções com sífilis, no entanto, no que respeita a parasitoses intestinais há escassez de informações. O estabelecimento de perfis parasitológicos de pacientes com sífilis ou com indicação clínica da doença contribuirá para o conhecimento de fatores que estejam epidemiologicamente relacionados à sífilis, e ainda a possibilidade de comparação com os perfis paleoparasitológicos já traçados de remanescentes humanos destes sítios arqueológicos.

## **4- Objetivos**

### **4.1- Objetivo Geral**

Analisar a presença de *Treponemas* em remanescentes humanos de sítios arqueológicos do período histórico do Rio de Janeiro, para o entendimento da distribuição das treponematoses na cidade.

### **4.2- Objetivos Específicos**

- 1- Verificar o nível de detecção de *T. pallidum* em amostras de soro de pacientes com indicação clínica de sífilis atendidos em Unidades de Saúde do Rio de Janeiro.
- 2- Determinar o perfil parasitológico em pacientes com indicação clínica de sífilis, atendidos em Unidades de Saúde do Rio de Janeiro.
- 3- Verificar a presença de treponematoses através da análise paleogenética em remanescentes humanos de sítios arqueológicos datados dos séculos XVII ao XIX.

## 5- Metodologia

### 5.1- Análise Molecular e Parasitológica de pacientes atendidos em Unidades de Saúde do Rio de Janeiro

#### 5.1.1- Avaliação do diagnóstico molecular de *T. pallidum* em soros

Com o objetivo de avaliar a eficiência na detecção molecular de *T. pallidum* com os três alvos moleculares escolhidos para o estudo, foram selecionadas 18 amostras de soro do Laboratório do Centro de Saúde Escola Germano SINVAL Faria com diferentes titulações sorológicas e 2 amostras como controles negativos (Tabela 1). Além da padronização da PCR realizada previamente com cepas referências, estas amostras também foram utilizadas no processo de padronização. O critério de seleção foram amostras que apresentaram positividade para sífilis no VDRL, que é um dos testes rápidos de triagem sorológica recomendado pelo Ministério da Saúde. Estas amostras foram previamente confirmadas para treponematose pelo LADEP, através da aplicação de um dos exames confirmatórios recomendado pelo Ministério da Saúde, o TPHA. A extração de DNA foi aplicada com o kit comercial QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante e modificações de Iñiguez AM *et al.* (2006). Foi realizada PCR dos alvos os genes 47KDa e DNA Pol A (Tabela 4), conforme as condições descritas anteriormente. Posteriormente foi aplicada a PCR para o alvo 15KDa (Tabela 4) para confirmar a presença de *T. p. ssp. pallidum.*, como descrito acima.

**Tabela 1:** Amostras de soro selecionadas para avaliação do diagnóstico molecular de sífilis

<b>Amostra</b>	<b>VDRL/Titulação</b>	<b>TPHA</b>
1386	SRF	Fr
1681	TPHA (Fr)	Fr
3428	SFR/TPHA (-)/(-)	-
513	1:2	+
2251	1:2	+
2974	1:2	+
340	1:2	+
346	1:2	+
914	1:4	+
1280	1:4	+
1702	1:4	+
1961	1:4	+
2702	1:4	+
108	1:8	+
792	1:8	+
990	1:8	+
1701	1:8	+
1548	1:8	+
3785	SNR	-
3827	SNR	-

\*VDRL: Venereal Disease Research Laboratory; TPHA: Treponema Pallidum Haemagglutination assay; Fr: Fraco; SFR: Soro Fracamente Reator; (-); SNR: Soro Não Reator.

### **5.1.2- Perfil parasitológico**

Foram coletados dados de registros de exames sorológicos e parasitológicos de pacientes com sífilis diagnosticada no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/RJ) e no Laboratório do Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria (LADEP/ENSP/Fiocruz). Estabeleceu-se o período de 2008 a 2013, no entanto, para o LADEP foi determinado um tamanho amostral de 100 pacientes (50 casos e 50 controles), analisado apenas o ano de 2013. Foram considerados os registros que apresentaram positividade para helmintos e/ou protozoários. As unidades de saúde foram visitadas para coleta dos registros. O critério de triagem utilizado para pacientes com sífilis foi, o exame positivo para VDRL com titulação acima de 1:8 (Ministério da Saúde, 2011) e como teste confirmatório foi utilizado o exame de TPHA. No LADEP o conjunto de amostras consistiu de 50 pacientes com positividade no exame VRDL e 50 pacientes com negatividade, representando assim os controles. Para complementação do perfil sorológico, também foram

coletadas informações acerca exame confirmatório TPHA. O banco de dados foi construído no programa Excel (2010).

## **5.2- Análise Paleogenética**

### **5.2.1- Coleta Paleogenética**

A coleta Paleogenética é uma abordagem aplicada durante a escavação no sítio arqueológico em que a coleta de material biológico é dirigida com o objetivo final de uma análise paleogenética. Portanto, a abordagem é conduzida seguindo medidas para evitar a contaminação com material moderno, e a contaminação cruzada de amostras arqueológicas, e ainda, para impedir a degradação da amostra e do aDNA contido, a partir do momento que a mesma é retirada de seu microambiente no sítio arqueológico (Iñiguez AM *et al.* 2006, 2011). As informações referentes a cada amostra são anotadas em fichas de campo. As amostras são coletadas por um profissional arqueólogo, ou bioantropólogo fazendo uso de equipamento individual de proteção, vestindo jaleco, máscara, touca e luvas que foram trocadas a cada coleta (Figura 1). Amostras e sedimentos são retirados com auxílio de instrumentos estéreis e colocados em sacos ou tubos estéreis do tipo Falcon. São selecionados ossos e dentes que se apresentem o mais intacto possível a fim de obter aDNA em maior quantidade/qualidade e com menor exposição externa. Amostras de sedimentos controles dos sítios arqueológicos, entre sepultamentos, são sempre coletadas. As amostras são protegidas da luz com papel alumínio e imediatamente imersas em gelo para o transporte ao Laboratório onde são estocadas definitivamente no acervo a - 20°C.

### **5.2.2.- Sítios Arqueológicos**

#### **5.2.2.1- Igreja Nossa Senhora do Carmo a Antiga Sé**

Amostras dos enterramentos 31 e 41 foram selecionadas do registro do acervo da Unidade de Paleogenética para pesquisa de treponematoses, sendo 21 fragmentos de crânio e uma de dente, totalizando 22 indivíduos. Estas amostras foram coletadas em condições paleogenéticas descritas acima e previamente à extração de aDNA, submetidas à etapa de descontaminação. Nesta etapa as

amostras sofrem a raspagem das superfícies ósseas, limpeza com hipoclorito de sódio a 3% e a irradiação com luz ultravioleta em um comprimento de onda 254 nm, mantendo uma distância de 15 cm, durante 15 minutos em todas as superfícies da amostra (Iñiguez AM *et al* 2003).

#### 5.2.2.2- Cemitério Praça XV

Vinte e seis amostras de crânios de indivíduos diferentes foram usadas para a pesquisa paleogenética de treponematose. Estas amostras foram coletadas em condições paleogenéticas, do acervo do IAB e foram aplicados os mesmos procedimentos de descontaminação descritos para as amostras do sítio INSC.

O critério de tipo de amostra selecionada para o estudo, foi o local de infecção, alta irrigação sanguínea ou/ conservação de aDNA. As amostras selecionadas para o estudo estão listadas nas Tabelas 2 e 3. As amostras selecionadas foram retiradas do acervo da Unidade de Paleogenética e descongeladas a 4°C.



**Figura 1:** Coleta Paleogenética de amostras de restos humanos e análise do contexto arqueológico durante a primeira etapa da escavação da Igreja Nossa Senhora do Carmo (2007). Iñiguez AM.

**Tabela 2:** Amostras do estudo correspondentes ao sítio Arqueológico INSC

Sepultamento	Amostra	Idade aproximada	Gênero	Descrição da amostra	Haplótipos mtDNA
31	1a	Adulto jovem	Feminino	Crânio	
31	2a	Adulto jovem	Feminino	Crânio	
31	3a	Adulto jovem	Feminino	Crânio	
31	4a	12-15 anos	ND	Crânio	
31	5a	30 anos	Masculino	Crânio	
31	6a	Até 18 anos	Feminino	Crânio	
31	7a	18-20 anos	Feminino	Crânio	
31	8f	Até 25 anos	Feminino	Dente	
31	10a	Até 25 anos	Feminino	Crânio	T1-T5
31	11	18-25 anos	Feminino	Crânio	
31	12a	10-12 anos	ND	Crânio	H
31	13a	Criança	ND	Crânio	
31	14a	ND	ND	Crânio	
31	15	-	-	Crânio	U1b
31	16	18-20 anos	Feminino	Crânio	
31	17	Até 18 anos	-	Crânio	
31	18	10-12 anos	-	Crânio	
41	Oss 1	-	-	Crânio	
41	Oss 2	-	-	Crânio	
41	Oss 3	-	-	Crânio	
41	Oss 4	-	-	Crânio	
41	Oss 5	-	-	Crânio	

Total: 22

\*ND: indeterminado; Oss: ossuário.

**Tabela 3:** Amostras analisadas do sítio arqueológico CPXV

Amostra	Idade aproximada	Gênero	Haplótipos mtDNA
6b	ND	ND	A2
7a	ND	ND	
8a	ND	ND	A
9b	Criança	ND	
10a	ND	ND	
12a	ND	ND	L3
15b	ND	ND	
16a	ND	ND	M
17a	ND	ND	
18a	ND	ND	T/J
20a	ND	ND	L1c
28a	ND	ND	
32a	ND	ND	
38b	ND	ND	
39a	ND	ND	
41a	Adulto jovem	ND	
42a	ND	ND	
44a	ND	ND	
45b	Adulto	Masculino	
46a	ND	ND	
47a	ND	Feminino	
48a	ND	ND	
51a	ND	ND	
52a	ND	ND	
53b	ND	ND	
54b	Adulto	Masculino	
Total: 26			

### **5.2.3- Procedimentos para pesquisa com aDNA**

Posteriormente a etapa de descontaminação das amostras, estas foram submetidas ao congelamento por nitrogênio líquido, e pulverizadas com o uso de moinho analítico (Quimis). Duzentas miligramas de pó de osso foram separados para extração de aDNA. Somente seis amostras foram separadas para procedimento de extração e controles negativos de extração foram sempre incluídos. As superfícies das bancadas são limpas e descontaminadas com hipoclorito de sódio a 1% e a sala é irradiada com luz UV por uma hora. Os instrumentos e materiais são exclusivos da Unidade de Paleogenética para o trabalho com aDNA e são sempre esterilizados a cada uso. São utilizadas ponteiras com filtros estéreis, bem como equipamentos de proteção individual, como, jalecos, toucas, luvas e máscaras que devem ser colocados no espaço de paramentação, que se localiza anteriormente a sala de manuseio de amostras (Iñiguez AM *et al.* 2003, 2011). A Unidade de Paleogenética está fisicamente separada dos ambientes de montagem da PCR e de pós-PCR e nela são processados apenas materiais antigos e preservados.

### **5.2.4- Extração de aDNA**

As amostras foram tratadas com 1,2ml de solução de digestão (10mM Tris-HCl pH8,0, 100 mM NaCl, 50mM EDTA, 0,5% SDS e 1mg/ml Proteinase K - Invitrogen) (Iñiguez *et al.* 2006) e incubadas a 56°C por 48-72h com agitação de 800rpm. Ossos e dente foram tratados com o Kit comercial *DNA IQ™ System* (Promega), de acordo com instruções dos fabricantes e modificações sugeridas para estudos de aDNA, sendo aplicado 20µl de EDTA a 0,2M e 10µl de proteinase K (Invitrogen) a 20mg/ml. As amostras foram incubadas a 56°C por 2h a 1.200rpm (Bone Extraction Protocol). Alternativamente foi utilizado o kit comercial Investigator - Qiagen (QIAampDNA Investigator) segundo os fabricantes com modificações; em vez da solução de proteinase K do kit, 30 µl de proteinase K (Invitrogen) a 20mg/ml foram aplicados, o tempo de incubação com TAE foi aumentado por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugação final foi a 14.000 rpm por 2 minutos. Os passos restantes foram seguidos de acordo com as instruções dos fabricantes. As concentrações

foram estimadas a 260nm de absorvância em espectrofotômetro Pico200 (Picodrop<sup>TM</sup>).

### 5.2.5- Reação em Cadeia da Polimerase

As PCRs para os alvos moleculares para treponematoses foram padronizados com controles positivos constituídos de cepas referencias. Utilizaram-se as cepas *Nichols* de *T. p. ssp. pallidum* e *CDC2* de *T. p. ssp. pertenue*, as quais foram cedidas gentilmente pelo Dr. Hsi Liu (Centers for Disease Control and Prevention - CDC). Os alvos selecionados foram 47KDa, DNA Pol A e 15KDa (Tabela 4). Os dois primeiros são específicos para as espécies *T. pallidum* e *T. paraluisuniculi*, e o último tem sido utilizado para diferenciar a subespécie *T. pallidum pallidum* das demais de *T. pallidum*. Estes alvos foram aplicados em estudos anteriores para detecção de DNA de *Treponema* em biópsias de lesões de sífilis secundária preservadas em parafina fixada em formalina (Behrhof W *et al.* 2008, Wenhai *et al.* 2004). Estes materiais de fixação são conhecidos por afetarem a integridade do DNA e podem influenciar no sucesso da amplificação (Scorsato AP e Telles JEQ 2011). Neste estágio da doença de sífilis secundária a carga bacteriana na lesão é baixa e, portanto, a recuperação do DNA torna-se mais difícil. A condição de preservação descrita nestes estudos assemelha-se a aquela encontrada em material arqueológico, em que o DNA frequentemente apresenta-se degradado. A frequência de positividade para *T. pallidum* neste tipo de material e estágio da doença varia de 38,8 a 41,7% (Behrhof W *et al.* 2008, Wenhai *et al.* 2004). Os conjuntos de primers utilizados nestes trabalhos foram aplicados em reações de nested e semi-nested PCR, que aumenta a chance amplificação do fragmento almejado, apresentando, portanto, maior sensibilidade de recuperação do DNA. Kolman C *et al* (1999) utilizaram o marcador molecular 15KDa para detectar *T. pallidum* em material arqueológico de um indivíduo datado de 240±50 AP com lesões características de sífilis, confirmando o diagnostico e concluindo em o primeiro estudo de recuperação do aDNA da bactéria. A especificidade dos produtos de PCR dos três alvos

moleculares foi avaliada por sequenciamento nucleotídico, e posteriormente usados como sondas no ensaio de hibridização de aDNA.

**Tabela 4:** Primers utilizados para diagnóstico molecular de *Treponema* sp. e genotipagem das subespécies de *T. pallidum*

Alvo	Primers	Sequência (5'-3')	pPCR	REF
47KDa	P1R	CAGCAGGGGAAGAAAAAAGTGGG	379pb	Wenhai L <i>et al.</i> 2004
	P2F	AAGGTCGTGCGGGTCCTCCAT		
	P3R	GACCCAAGCGTTACTAAGATGG	196pb	
	P4F	ACCGCAACTGGGACAAACTTCAT		
pol A	TpmodF1	GTGTGCACTGGGCATTACAG	164pb	Behrhof W <i>et al.</i> 2008
	TpmodR1	GTCTGAGCACTTGCACCGTA		
	TpmodF2	TGAAGCTGACGACCTCATTG'	125pb	
15KDa	L243F	GAGCAGGATGTCTCTATGAGTTATAAAGAG	120pb	Kolman C <i>et al.</i> 1999
	H123R	GAAGCCACTACCGATGTGCG		

Para o gene 47KDa foi aplicada uma Nested-PCR que gera um fragmento de 196pb com os primers descritos na literatura (Wenhai L *et al.* 2004). A reação da PCR de volume final de 25µL, contém 2U de *Platinum®Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 1X de Buffer, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 200ng de cada primer, 2-5µL ou 50-100ng/µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf), programado para iniciar o ciclo de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 55°C e 40 segundos a 72°C e extensão de 5 minutos a 72°C. Um microlitro do produto da primeira reação foi utilizado na segunda reação.

Para o alvo Pol A a reação de PCR tem volume final de 25µL, contém 2.5U de Taq-Polimerase (*Promega*), 1X de Buffer, 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs, 0,2µM de cada primer, 2-5µL ou 50-100ng/µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf), programado para iniciar o ciclo de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 58 - 60°C e 60 segundos (45 segundos

na segunda reação) a 72°C e extensão de 7 minutos a 72°C. Um microlitro do produto da primeira reação foi utilizado na segunda reação.

Para o alvo 15KDa foram aplicadas condições descritas por Kolman C *et al.* 1999. Os pPCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% seguido de uma coloração com brometo de etídio a 0.5µg/ml. Posteriormente os géis foram visualizados sob luz UV no transluminador UVP (Gel Logic – 212 PRO – Carestream) e fotografados com o auxílio programa Kodak Gel Logic. Em seguida, os amplicons foram purificados com o Kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

#### **5.2.6- Sequenciamento Nucleotídico e Análise das Sequências**

Os pPCR obtidos foram sequenciados, utilizando o Kit *Big Dye Terminator* v. 3.1 (Applied Biosystems) e a plataforma de sequenciamento PDTIS/Fiocruz (Sequenciador Applied Biosystems ABI 3730). As análises das sequências foram realizadas utilizando os programas Chromas v. 1.45 (school of Health Sciences, Griffth University), SeqMan v. 7.00 - DNASTAR Lasergene (Madison Wisconsin, EUA) e BioEdit v. 5.0.9 (Department of Microbiology, North Carolina State University).

#### **5.2.7- Ensaio de Hibridização de aDNA**

Os procedimentos Dot Blot foram aplicados como descritos em Sambrook J e Russel DW (2001). As membranas incluem amostras de aDNA de cada sítio arqueológico e controles positivos com pPCR dos alvos moleculares específicos para *Treponema* sp., e controle negativo, constituído por DNA humano dos operadores da equipe da Unidade de Paleogenética. Cem nanogramas de aDNA foram fixadas em membrana de nylon Hybond-N Amershan (GE Healthcare). Para secagem e fixação do aDNA as membranas foram submetidas a incubação de 80°C por 2 horas. Os pPCR dos genes 47KDa, DNA Polimerase I e 15KDa utilizados como sonda foram purificados com Kit *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE

Healthcare). As sondas foram ligadas por quimiluminescência usando o kit comercial Gene Images Alkphos Direct Labeling and Detection Systems (GE Healthcare), de acordo com instruções do fabricante. As membranas foram incubadas a 40°C *overnight*. A revelação foi realizada utilizando os reagentes *Kodak Flexicolor* seguindo instruções do fabricante. A intensidade de quimiluminescência foi avaliada a olho e classificada em baixa, media e alta. Os critérios adotados para considerar a amostra como positiva para *Treponema* foram: 1) reatividade em pelo menos dois alvos moleculares, ou 2) reatividade para um alvo com pelo menos intensidade moderada. Baixa intensidade de quimiluminescência com apenas um alvo molecular foi considerada uma fraca evidência de infecção por *Treponema*.

## 6- Resultados

### 6.1- Padronização da PCR

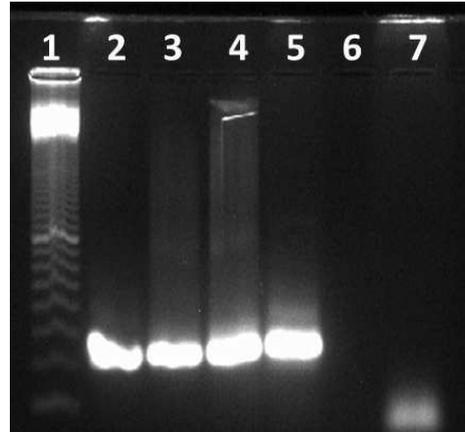
Foram padronizadas as condições de PCR em controles positivos para os alvos 47KDa, DNA Pol A e 15KDa (Tabela 4). As cepas utilizadas foram a Nichols, da subespécie *pallidum* e a CDC2 da subespécie *pertenue*. Foram alteradas as condições de anelamento e proporção de DNA para o segundo PCR, em caso de Nested-PCR. As condições e ciclagem de PCR definitivas foram consideradas quando se atingiu amplificação nítida de banda única, e estão descritas no item 5.1.5. Esta padronização permitiu amplificar o DNA das cepas conforme mostrado nas Figuras 2, 3 e 4. Para confirmação da especificidade dos alvos, os pPCR foram sequenciados e comparados com os disponíveis no banco internacional de sequências GenBank (Figuras 5-7).

As sequências usadas como referências *T. p. ssp. pallidum* cepa Nichols e *T. p. ssp. pertenue*, cepa CDC2, GenBank CP004010 e CP002375, respectivamente, foram idênticas para o alvo 47KDa. A sequência referência da cepa A de *T. paraluiscuniculi* (CP002103) mostrou os polimorfismos T624572C, T624629C, G624632A, C624794T, T624833C, que a diferencia de *T. p. ssp. pallidum* e *T.p. ssp. pertenue*. Em relação as sequências geradas neste estudo, a sequência da cepa Nichols apresentou os polimorfismos C→T e AA→GC nas posições 624590 e 624741 em relação à cepa referência Nichols depositada no GenBank (CP004010). A sequência gerada da cepa CDC2 foi idêntica à da cepa disponível no banco de sequências (CP002375) (Figura 5).

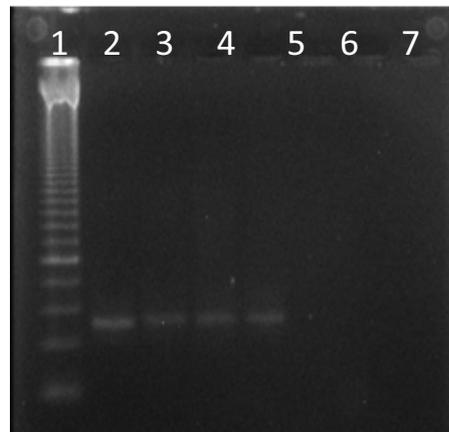
Para o alvo DNA Pol A as sequências geradas no estudo foram idênticas entre si e às referências disponíveis no banco internacional de sequências (Figura 6). Para a cepa referência A de *T. paraluiscuniculi* foram verificados polimorfismos nas posições C116181T e G116260A em relação à referência *T. p. ssp. pallidum* cepa Nichols, GenBank CP004010.

O alinhamento de sequências do alvo 15KDa mostrou um polimorfismo C→T na posição 191995 nas cepas referências CDC2, *T. p. ssp. pallidum*, (CP002375), Bosnia, *T.p. ssp. endemicum* (EU101805) e A, *T. paraluiscuniculi* (CP002103) (Figura 7). Esta última apresentou também o polimorfismo T→C

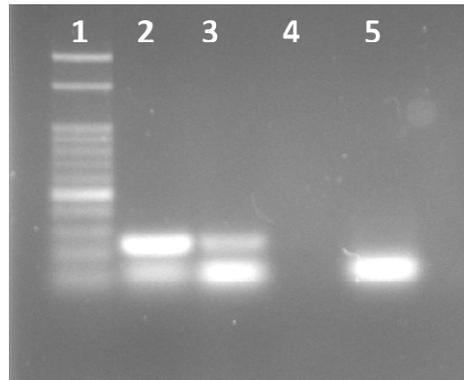
na posição 191980, usando como referência *T. p. ssp. pallidum* cepa Nichols, GenBank CP004010. A cepa referência Bosnia também apresentou o polimorfismo T→C na posição 191980 em relação a cepa Nichols utilizada como referência. As sequências geradas neste estudo foram idênticas entre si e às cepas referências.



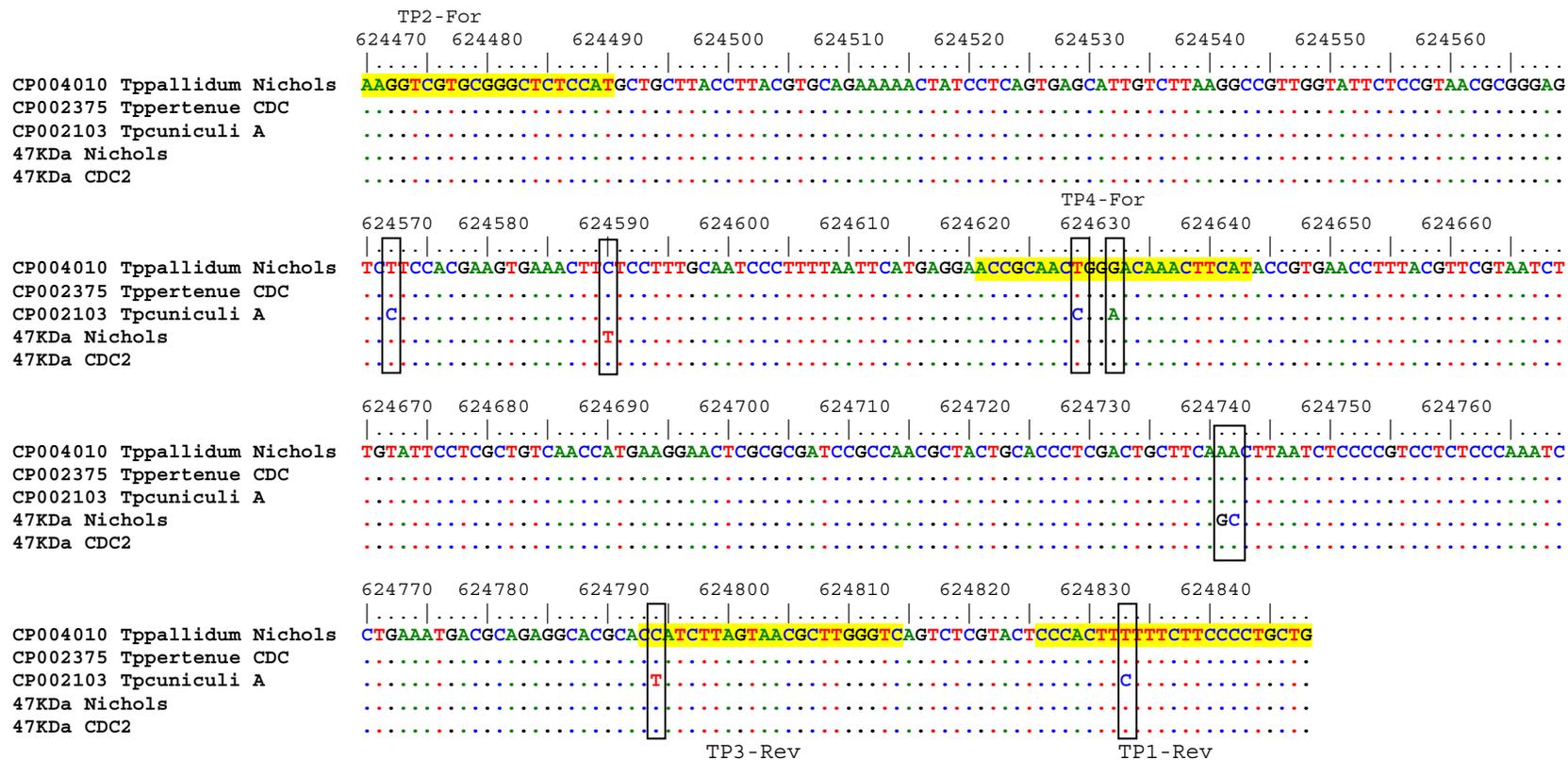
**Figura 2:** Resultado da eletroforese em agarose 3% do PCR para o gene 47 KDa de *T. pallidum* sp. Pista 1: Marcador de 100 pb (Promega). Pistas de 2 e 3: Cepa CDC2. Pistas 4 e 5: Cepa Nichols. Pista 7: Controle negativo



**Figura 3:** Resultado da eletroforese em agarose 3% do PCR para o gene DNA Pol A de *T. pallidum* sp. Pista 1: Marcador de 50 pb (Promega). Pistas de 2 e 3: Cepa CDC2. Pistas 4 e 5: Cepa Nichols. Pista 7: Controle negativo

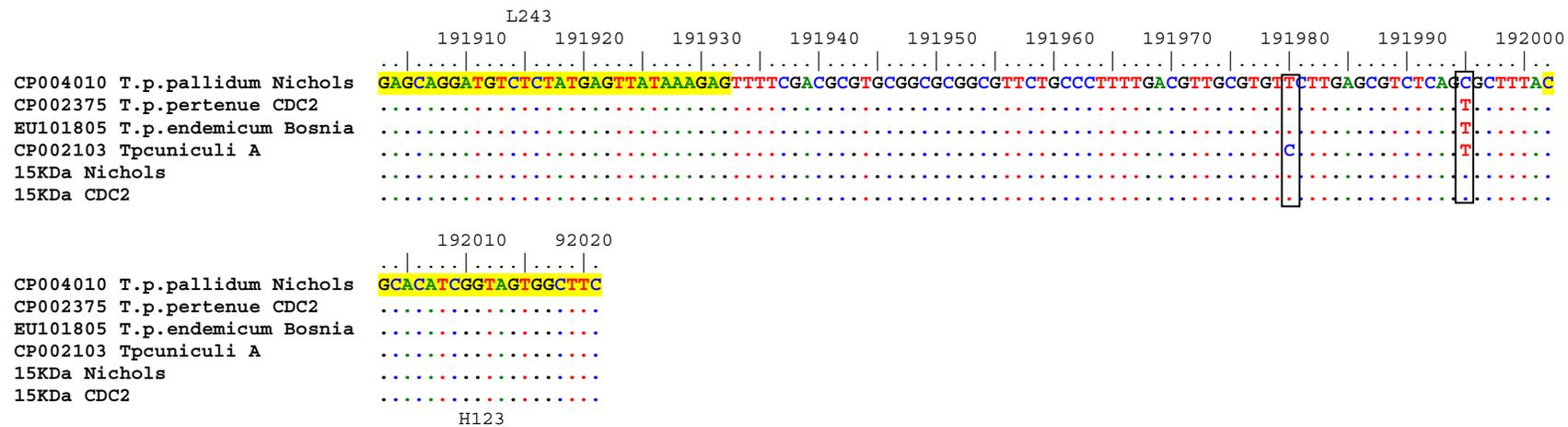


**Figura 4:** Resultado da eletroforese em agarose 3% do PCR para o gene 15KDa de *T. pallidum* sp. pista 1: Marcador de 50 pb (Promega). Pistas 2 e 3: Cepa CDC2 e Nichols, respectivamente. Pista 5: Controle negativo



**Figura 5:** Alinhamento de seqüências do alvo molecular 47KDa das subespécies *T. p. pallidum* – cepa Nichols e *T. p. pertenuae* – cepa CDC2 geradas neste estudo, comparadas a cepas referências disponíveis no GenBank. Os primers estão destacados em amarelo e os polimorfismos em caixas.





**Figura 7:** Alinhamento de seqüências do alvo molecular 15KDa das subespécies *T. p. pallidum* – cepa Nichols e *T. p. pertenuae* – cepa CDC2 geradas neste estudo, comparadas a cepas referências disponíveis no GenBank. Os primers estão destacados em amarelo e os polimorfismos em caixas.

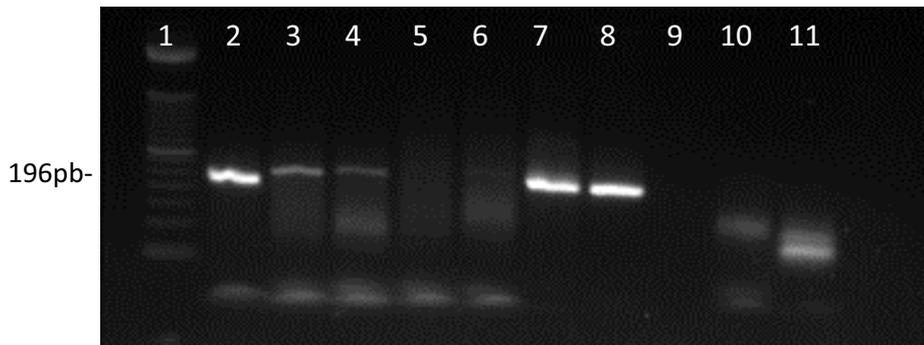
## 6.2- Avaliação da detecção molecular de *T. pallidum* por PCR

Das 18 amostras escolhidas para avaliação do diagnóstico molecular em soros, 10 (50%) amostras foram positivas (Tabela 5). Foram observadas diferentes intensidades de amplificação de bandas. Oito entre dezoito pacientes (44,4%) foram positivos para o alvo 47KDa, incluindo amostras classificadas como soro fracamente reator (SRF), TPHA fraco (Fr) e soro fracamente reator com TPHA negativo (SFR/TPHA (-)/(-)). Destes, 2 (25%), 1 (12,5%), e 2 (25%) amostras foram positivas para a titulação 1:2, 1:4 e 1:8 respectivamente. Para o alvo DNA Pol A 5/18 (27,7%) foram positivas, confirmando o resultado para 3 amostras do alvo anterior. Dentre estas, as amostras classificadas como SFR e SFR/TPHA (-)/(-). Em relação à titulação, foi observado 20% de positividade para cada (1:2, 1:4 e 1:8). Para o alvo 15KDa, quatro entre dezoito pacientes (22,2%) apresentaram positividade confirmando a presença de *T. p. ssp. pallidum*. Duas amostras estão de acordo com resultados apresentados para o 47KDa e 1 para o alvo DNA Pol A (Figura 8-10 e Tabela 7). A amostra classificada como SFR/TPHA (-)/(-) foi positiva com intensidade forte. Uma (5%) e 2 (10%) amostras foram positivas para as titulações 1:2 e 1:8, respectivamente. Para confirmação do fragmento do genoma amplificado, pPCR foi submetido ao sequenciamento nucleotídico para os alvos moleculares DNA Pol A e 15KDa. As sequências usadas como referências *T. p. ssp. pallidum* cepa Nichols e *T. p. ssp. pertenue*, cepa CDC2, GenBank CP004010 e CP002375, respectivamente, foram idênticas para ambos os alvos (Figura 11).

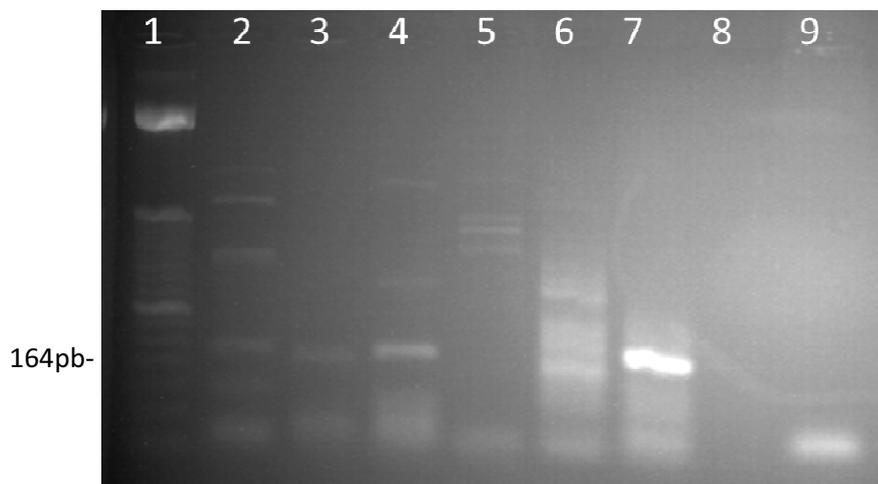
**Tabela 5:** Resultado da detecção molecular para os alvos 47KDa, DNA Pol A e 15KDa em amostras de soro de pacientes soropositivos

ID	VDRL	47KDa	INS	DNA Pol A	INS	15KDa	INS	Positivo
1386	SRF	+	Fo	+	Fr	-		+
1681	TPHA (Fr)	+	Fr	-		-		+
3428	SFR/TPHA (-)/(-)	+	Fr	+	Mo	+	Fo	+
513	1:2	-		-		+	Mo	+
2251	1:2	+	Fo	+	Fr	-		+
2974	1:2	+	Fo	-		-		+
340	1:2	-		-		-		-
346	1:2	-		-		-		-
914	1:4	-		-		-		-
1280	1:4	-		-		-		-
1702	1:4	+	Mo	-		-		+
1961	1:4	-		+	Mo	-		+
2702	1:4	-		-		-		-
108	1:8	-		-		-		-
792	1:8	+	Fo	-		-		+
990	1:8	+	Fr	-		+	Fo	+
1701	1:8	-		+	Mo	-		-
1548	1:8	-		-		+	Fo	+
3785	SNR	-		-		-		-
3827	SNR	-		-		-		-
Total		8 (44,4%)		5 (27,7%)		4 (22,2%)		12 (66,6%)

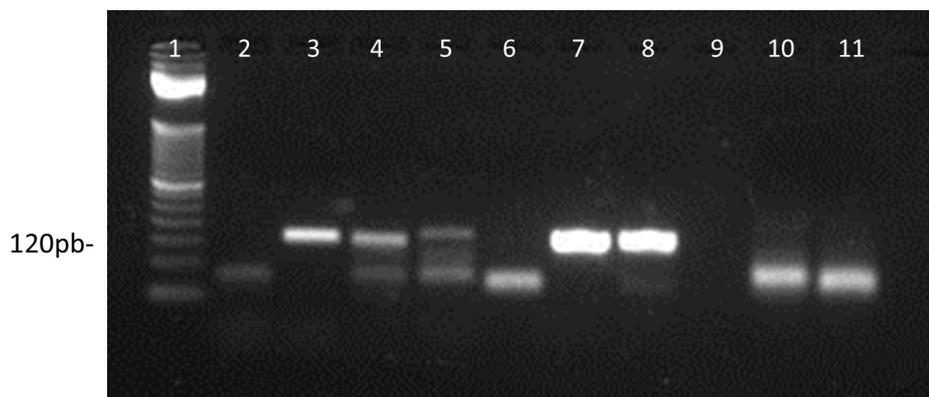
ID: Identificação; VDRL: Venereal Disease Research Laboratory; INS: Intensidade; SFR: Soro fracamente reator; TPHA: Treponema Pallidum Haemagglutination assay, Fr: Fraco; (-): Negativo; SNR: Soro não reator.



**Figura 8:** Resultado da eletroforese em agarose 3% da PCR para o gene 47KDa de amostras de soro de pacientes. Pista 1: Marcador de 50 pb (Ludwig). Pistas 2 a 6: Amostras 2251, 1386, 2974, 3428, 1702. Pista 7-8: Controles positivos *T. p. pallidum*, cepa Nichols e *T. p. pertenue*, cepa CDC2, respectivamente. Pista 10-11: Controles negativos da extração e da PCR, respectivamente.



**Figura 9:** Resultado da eletroforese em agarose 3% da PCR para o gene DNA Pol A de amostras de soro de pacientes. Pista 1: Marcador de 50 pb (Ludwig). Pistas 2 a 6: Amostras 2251, 1386, 2974, 3428, 1702. Pista 7-8: Controles positivos *T. p. pallidum*, cepa Nichols e *T. p. pertenue*, cepa CDC2, respectivamente. Pista 10-11: Controles negativos da extração e da PCR, respectivamente.



**Figura 10:** Resultado da eletroforese em agarose 3% da PCR para o gene 15KDa de amostras de soro de pacientes. Pista 1: Marcador de 50 pb (Invitrogen). Pistas 2-5: Amostras 2974, 3428, 990, 513, 3785. Pista 7-8: Controles positivos *T. p. pallidum*, cepa Nichols e *T. p. pertenue*, cepa CDC2, respectivamente. Pista 10-11: Controles negativos da extração e da PCR, respectivamente.



### **6.3- Perfil Parasitológico de pacientes com indicação clínica de sífilis e/ou soropositivos**

Durante o estudo piloto realizado no HUPE, foram coletados dados de 62 indivíduos com indicação clínica e/ou diagnosticados para sífilis, no período de 2008-2013. Seis de sessenta e dois registros (10%) apresentaram pedidos de exames parasitológicos dos quais se observaram resultados positivos em 2 (3%) para *Giardia lamblia*, 1 (2%) para *Strongyloides stercoralis* e 1 (2%) para *Ascaris lumbricoides* (Anexo 1).

No LADEP foi observado que o TPHA foi realizado em 30/37 (81%) pacientes com VDRL até 1:8. Dentre as amostras com sorologia negativa 8/50 (16%) apresentaram pedido para exame parasitológico. Destes 6/8 (75%) foram negativos e 2/8 (25%) apresentaram cistos de *Entamoeba histolytica/E. dispar* e *Endolimax nana*. Das amostras que apresentaram sorologia positiva apenas 1/50 (2%) apresentou pedido para exame parasitológico, mostrando cistos de *Iodamoeba butschlii*. A técnica de sedimentação Paratest® foi utilizada para realização dos exames parasitológicos. Devido à escassez de indicação de exames parasitológicos, o perfil parasitológico dos pacientes atendidos em ambas as unidades não pode ser traçado (Anexo 2).

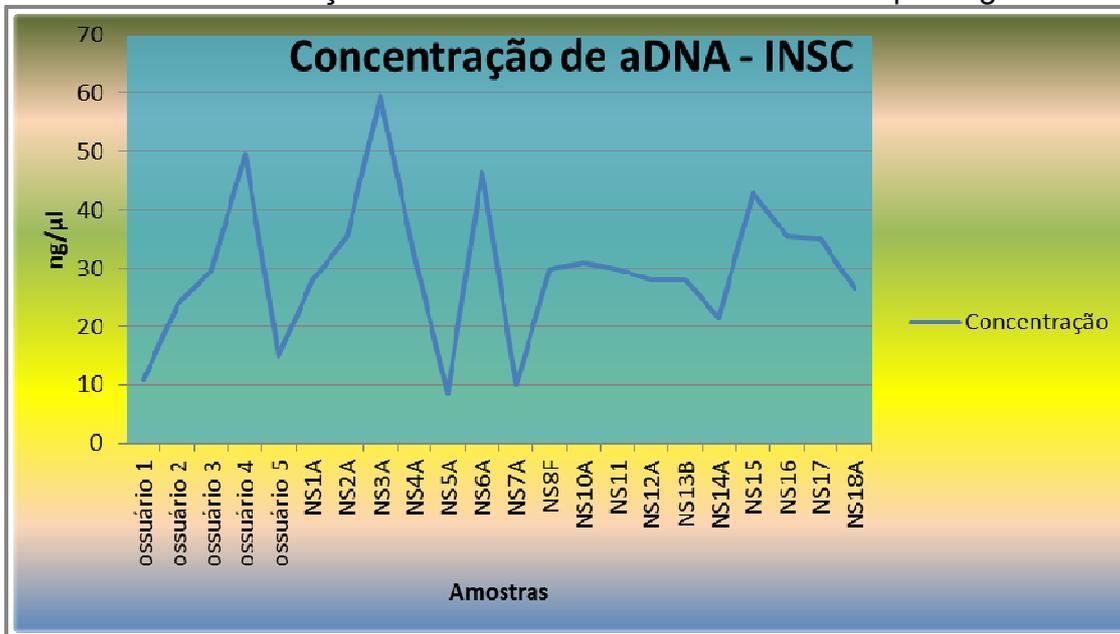
### **6.4- Análise paleogenética**

#### **6.4.1- - Extração e dosagem de aDNA**

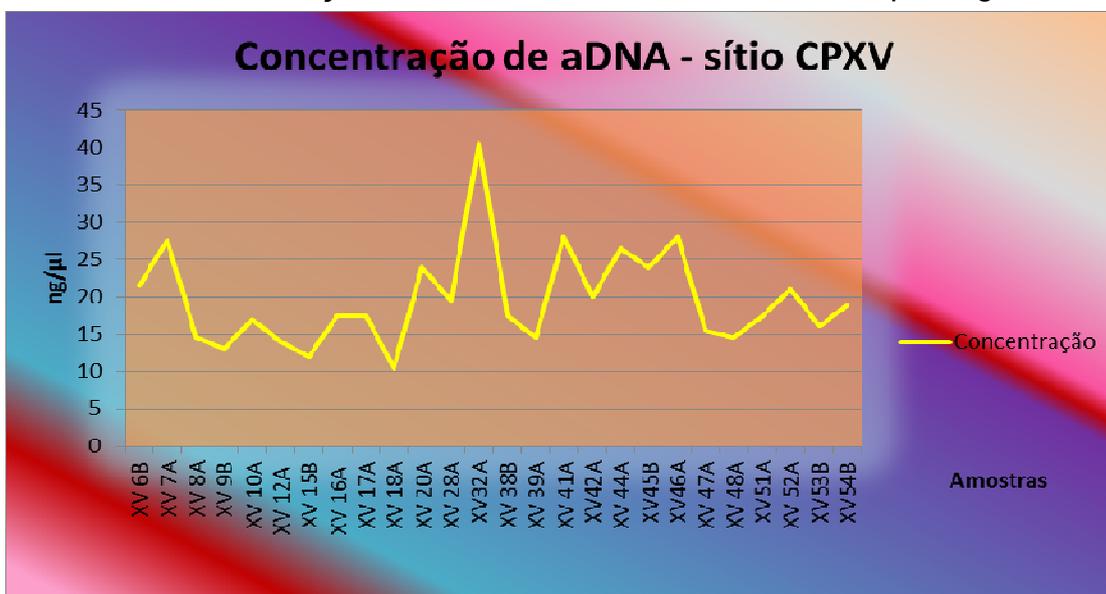
As amostras foram extraídas seguindo os procedimentos para pesquisa em paleogenética em um ambiente isolado da sala de PCR e pós-PCR, e dosadas utilizando o PicoDrop 200. Os valores das concentrações de aDNA foram baixos e oscilaram de 10 a 59,5 ng/μL para o sítio INSC e de 10,5 a 40,5 ng/μL para sítio CPXV. A relação de pureza das amostras obtida pela razão entre 260nm 280 demonstrou o resultado dentro do esperado para a maioria das amostras do sítio CPXV, com valores entre 1,8 e 2,0, no entanto, o mesmo não foi verificado para o sítio INSC, provavelmente devido a diferentes kits de extração utilizados na metodologia (Gráficos 1-4). Na absorvância 320nm foi verificado resultado dentro do esperado para a maioria das amostras do sítio CPXV, com valores próximos ao zero, no entanto, o mesmo não foi verificado

para o sítio INSC. Isso se deve a presença de nucleotídeos livres, o que é característico de aDNA.

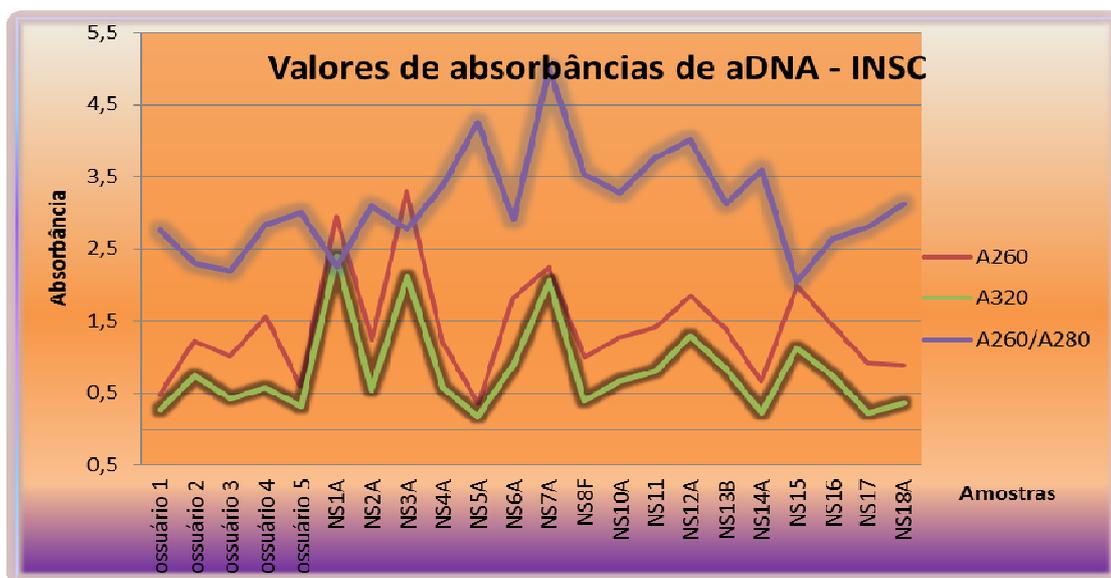
**Gráfico 1:** Concentrações de aDNA das amostras do sítio arqueológico INSC



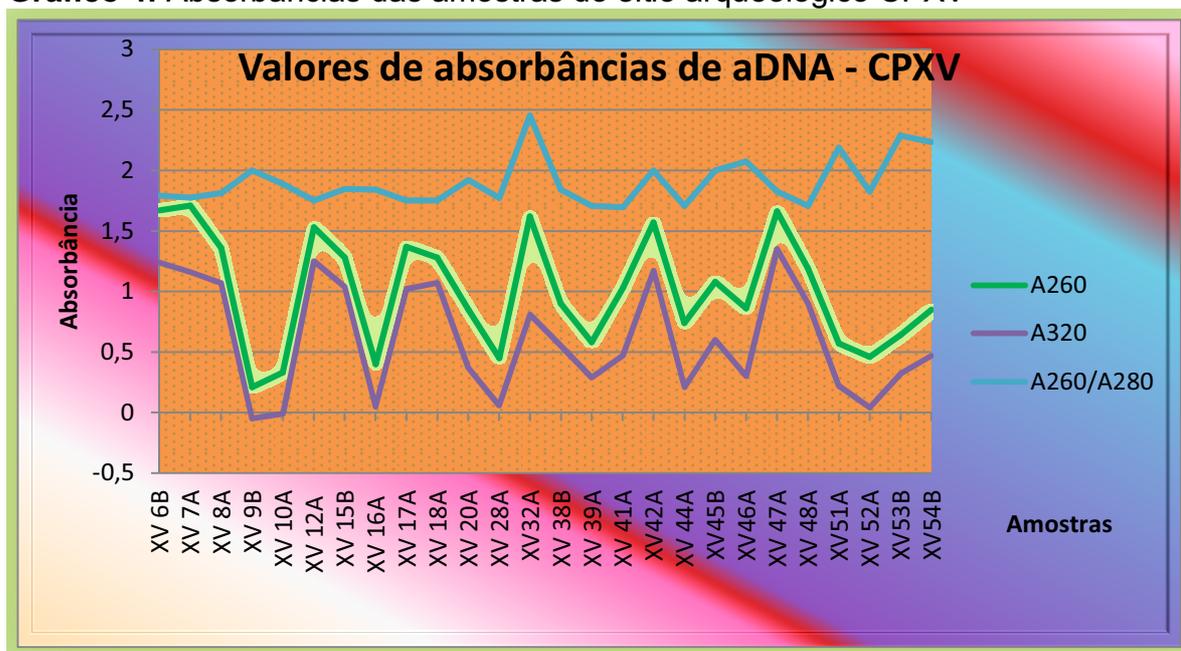
**Gráfico 2:** Concentrações de aDNA das amostras do sítio arqueológico CPXV



**Gráfico 3:** Absorbâncias das amostras do sítio arqueológico INSC



**Gráfico 4:** Absorbâncias das amostras do sítio arqueológico CPXV



#### 6.4.2- Ensaio de Hibridização de aDNA

Material genético de *T. pallidum* foi detectado em amostras arqueológicas dos sítios INSC e CPXV. Diferentes intensidades de quimiluminescência foram observadas (Tabela 6, 7 e Figura 13). No sítio INSC, 7/22 (31,8%) indivíduos foram considerados positivos para a infecção por *Treponema* (Tabela 6; Figura 13A, C, E, G, I e L). Quatro indivíduos de 22 (18%) apresentaram resultados positivos com o alvo 47KDa. O ensaio com o

alvo DNA Pol A mostrou 5 (22,7%) resultados positivos, confirmando 3 amostras positivas com o alvo 47KDa. Para o alvo 15 KDa, 12/22 (54,5%) foram positivos, confirmando todas as amostras positivas pelos outros dois alvos. As sete amostras consideradas positivas para a infecção por *Treponema* na INSC eram do sepultamento 31, com três amostras positivas para todos os alvos. Segundo o critério adotado neste estudo, cinco amostras com intensidade de quimiluminescência baixa em apenas um alvo molecular, 15KDa, foram considerados uma fraca evidência de infecção por *Treponema*.

Nas amostras do sítio CPVX (Tabela 7 e Figura 13B, D, F, H, J e M) observou-se positividade em 8/26 (30,7%), o mesmo valor para o alvo 47KDa. Para o alvo DNA Pol A, 3 (11,5%) amostras confirmaram positividade de acordo com resultados do alvo 47KDa. Para o alvo de 15 KDa, 2 (7%) amostras foram positivas, uma também positiva para o alvo 47KDa e a segunda para os outros dois alvos. Sete indivíduos foram considerados positivos para a infecção por *Treponema* no CPXV, 1 para todos os alvos e 2 para dois alvos. Uma amostra com baixo sinal de quimiluminescência em apenas um alvo molecular, 47 KDa, foi considerada uma fraca evidência de infecção por *Treponema*.

Em todos os ensaios os controles positivos apresentaram os resultados esperados, exibindo forte intensidade. Os controles negativos de DNA humano não apresentaram reatividade para todos os alvos moleculares de *Treponema* (Figura 13N, O, P e Q).

**Tabela 6:** Resultados de hibridização de aDNA em amostras humanas do sítio arqueológico INSC

Amostra	Alvos Moleculares para <i>T. pallidum</i>						
	47KDa	INS	Pol A	INS	15KDa	INS	Positivo
Sep. 31 1a	-		-		-		-
Sep. 31 2a	-		+	Fr	+	Fr	+
Sep. 31 3a	-		-		+	Fr	Fr
Sep. 31 4a	+	M	-		+	M	+
Sep. 31 5a	-		-		+	Fr	-
Sep. 31 6a	-		+	M	+	Fr	+
Sep. 31 7a	+	Fo	+	Fo	+	Fo	+
Sep. 31 8f	-		-		+	M	+
Sep. 31 10a	-		-		-		-
Sep. 31 11	-		-		-		-
Sep. 31 12a	+	Fr	+	M	+	M	+
Sep. 31 13a	-		-		+	Fr	Fr
Sep. 31 14a	-		-		-		-
Sep. 31 15	+	Fr	+	M	+	M	+
Sep. 31 16	-		-		-		-
Sep. 31 17	-		-		+	Fr	-
Sep. 31 18a	-		-		+	Fr	-
Sep. 41 Oss. 1	-		-		-		-
Sep. 41 Oss. 2	-		-		-		-
Sep. 41 Oss. 3	-		-		-		-
Sep. 41 Oss. 4	-		-		-		-
Sep. 41 Oss. 5	-		-		-		-
Total 22		4 (18%)		5 (22,7%)		12 (54,5%)	7 (31,8%)

\*INS: Intensidade; Sep.: Sepultamento; Oss.: Ossuário; Fo: Intensidade forte, M: Intensidade moderada e Fr: Intensidade fraca. Resultado positivo (+) e resultado negativo (-).

**Tabela 7:** Resultados de hibridização de aDNA em amostras humanas do sítio arqueológico CPXV

Amostra	Alvos Moleculares para <i>T. pallidum</i>						Positivo
	47KDa	INS.	Pol A	INS	15KDa	INS.	
6b	-		-		-		
7a	+	M	-		-		+
8a	+	M	-		+	Fr	+
9b	-		-		-		
10a	+	Fr	-		-		Fr
12a	+	M	-		-		+
15b	-		-		-		
16a	-		-		-		
17a	-		-		-		
18a	-		-		-		
20a	-		-		-		
28a	+	Fo	+	M	+	Fo	+
32a	-		+	M	-		+
38b	-		-		-		
39a	-		-		-		
41a	+	M	-		-		+
42a	+	M	+	Fr	-		+
44a	-		-		-		
45b	-		-		-		
46a	-		-		-		
47a	-		-		-		
48a	-		-		-		
51a	-		-		-		
52a	-		-		-		
53b	-		-		-		
54b	+	M	-		-		+
Total 26		8		3		2	8
		(30,7%)		(11,5%)		(7%)	(30,7%)

\*INS: Intensidade; Fo: Intensidade forte, M: Intensidade moderada e Fr: Intensidade fraca. Resultado positivo (+) e resultado negativo (-).

A

	1	2	3	4	5	6	7
A	XV6B	XV7A	XV8A	XV9B	XV10A	XV12A	XV15B
B	XV16A	XV17A	XV42A	XV20A	XV28A	XV32A	XV38B
C	XV39A	XV41A	XV18A	XV44A	XV45B	XV46A	XV47A
D	XV48A	XV51A	XV52A	XV53B	XV54B	vazio	vazio

B

	1	2	3	4	5	6
A	INSC Oss1	INSC Oss2	INSC Oss3	INSC Oss4	INSC Oss5	INSC 1A
B	INSC 2A	INSC 3A	INSC 4A	INSC 5A	INSC 6A	INSC 7A
C	INSC 8F	INSC 10A	INSC 11	INSC 12A	INSC 13A	INSC 14A
D	INSC 15	INSC 16	INSC 17	INSC 18A	vazio	vazio

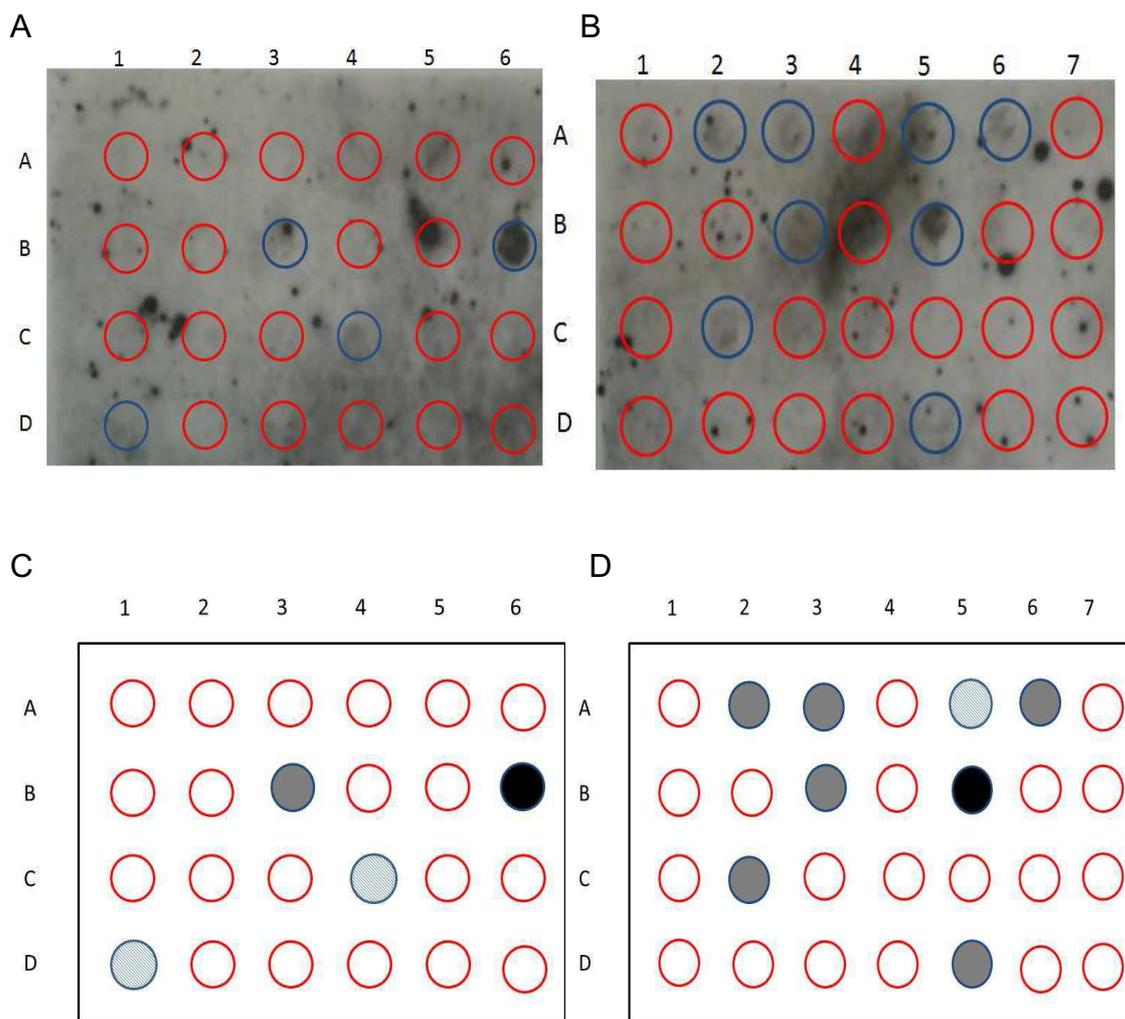
C

	3
A	DNA total Humano
B	DNA total Humano

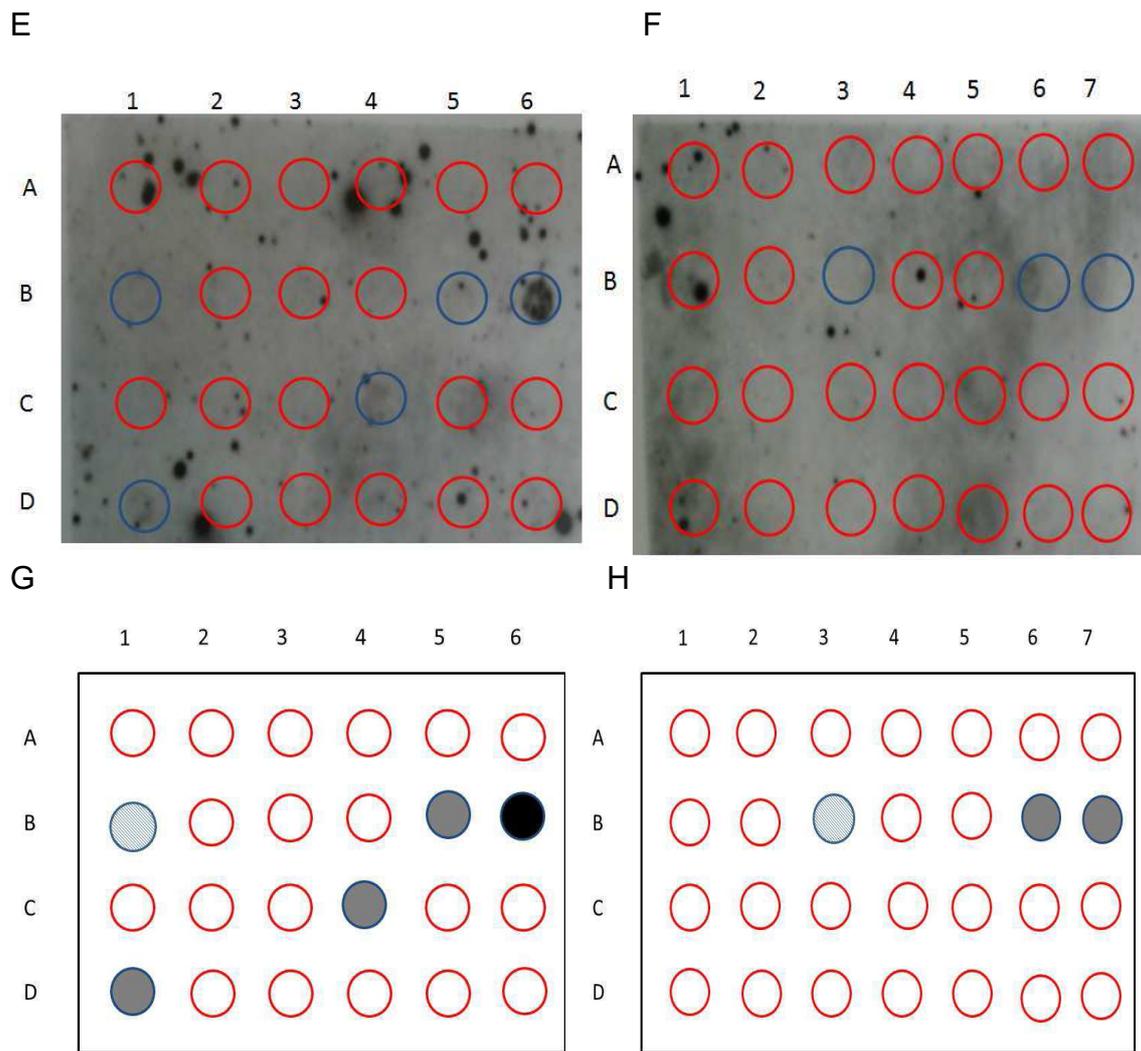
D

	1	2	3	4
A	pPCR 47KDa Nichols	pPCR DNA Pol A CDC2	pPCR 15KDa CDC2	pPCR 15KDa Nichols

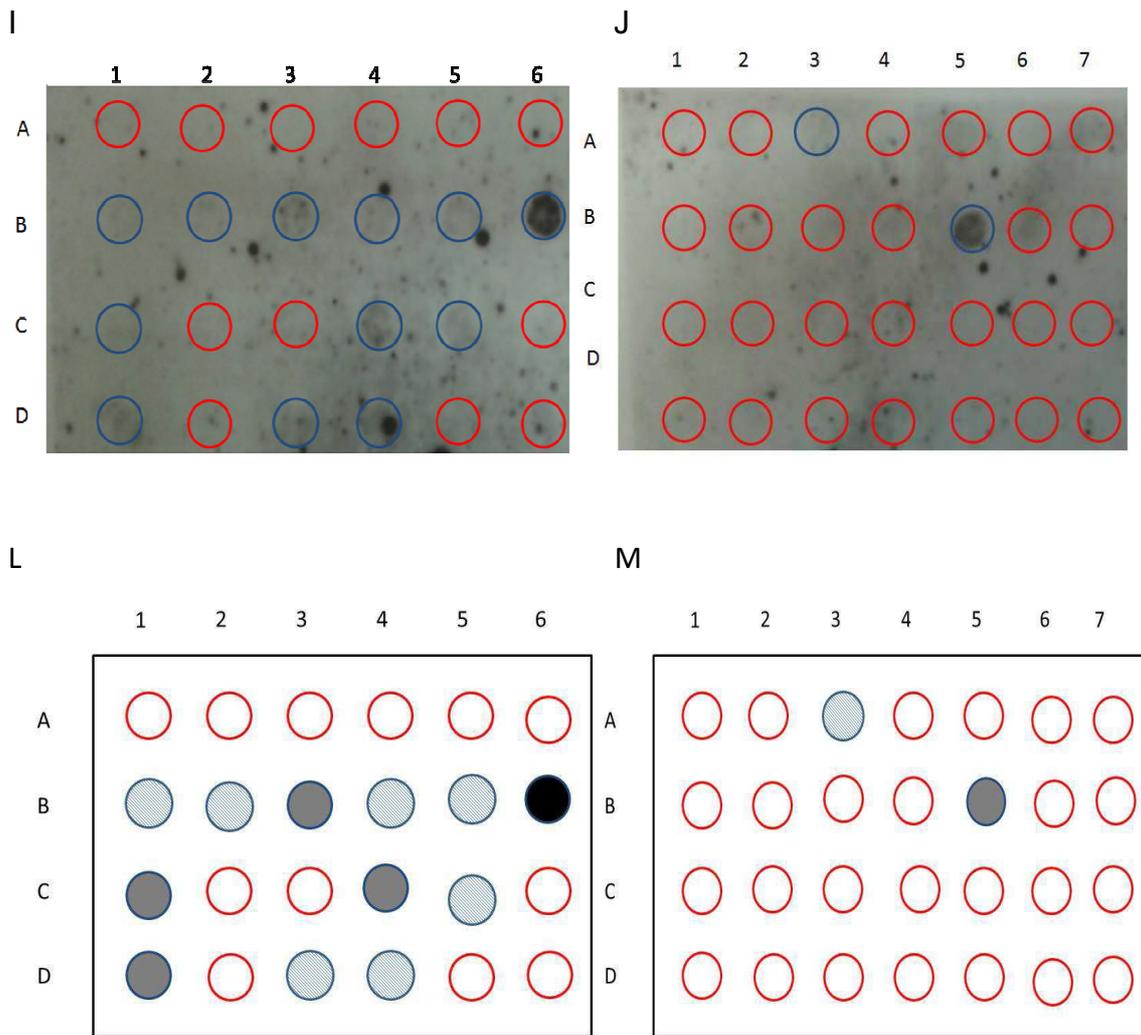
**Figura 12:** Diagramas representativos das membranas de hibridização de aDNA com a disposição das amostras de aDNA do sítios arqueológicos e dos controles da hibridização. A: Sítio CPXV, B: Sítio INSC, C: Controles negativos humanos, D: Controles positivos.



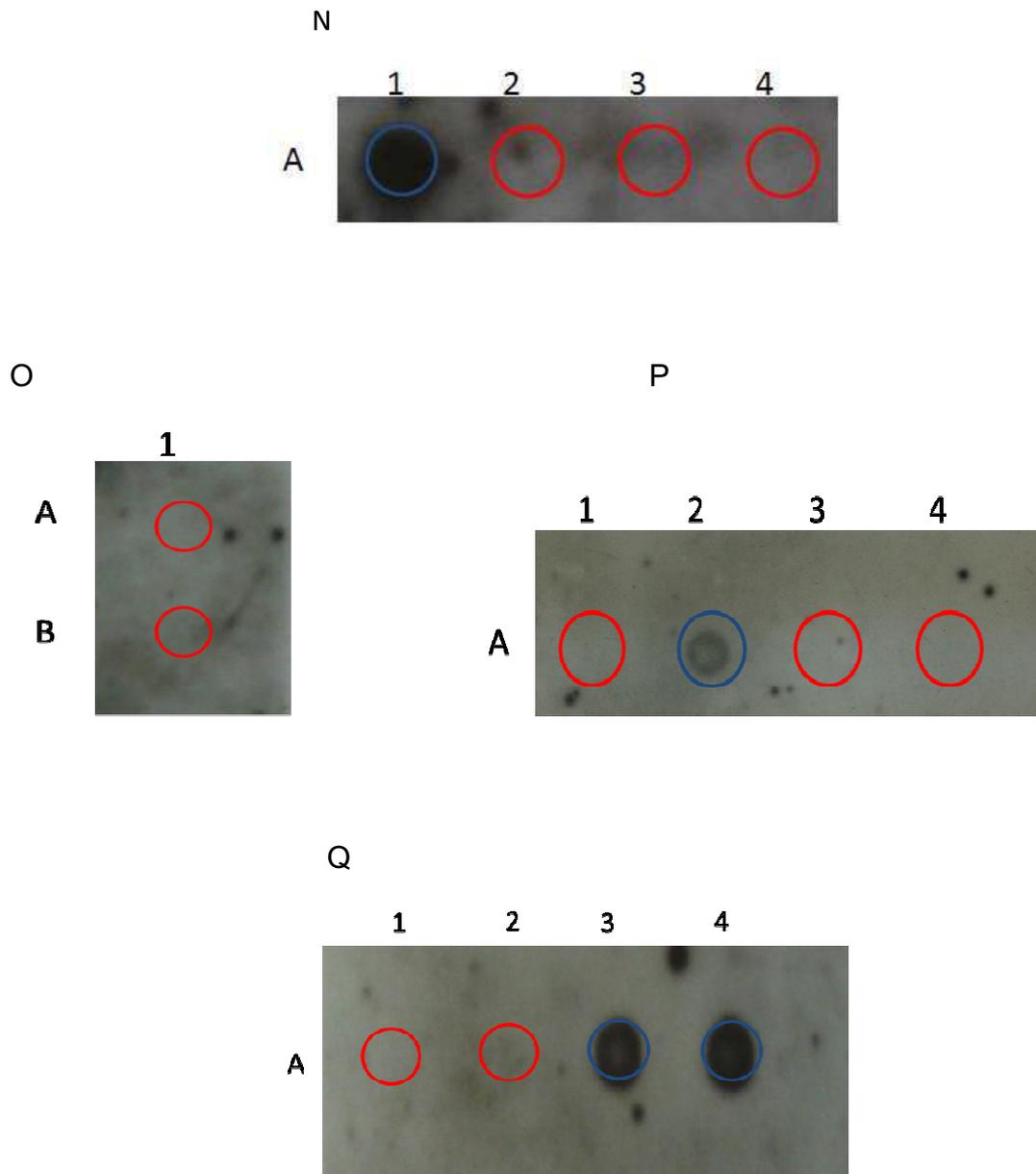
**Figura 13:** Resultado e representação esquemática de hibridização de aDNA com amostras de remanescentes humanos dos sítios arqueológicos. A, B: sítios INSC e CPXV, respectivamente usando o alvo 47KDa. C, D: representação esquemática dos sítios INSC e CPXV, respectivamente usando o alvo 47KDa. Nas membranas, os círculos azuis representam as amostras positivas e os círculos vermelhos, amostras negativas. Nos diagramas, os círculos pretos representam amostras com intensidade forte, os círculos cinza, as amostras com intensidade moderada e os círculos azuis, as amostras com intensidade fraca.



**Figura 13E, F:** sítios INSC e CPXV, respectivamente usando o alvo DNA Pol A. G, H: representação esquemática dos sítios INSC e CPXV, respectivamente, usando o alvo DNA Pol A.



**Figura 13I, J:** sítios INSC e CPXV, respectivamente, usando o alvo 15KDa. L, M: representação esquemática dos sítios INSC e CPXV respectivamente, usando o alvo 15KDa.



**Figura 13N, O, P, Q:** controles positivos 47KDa, controle negativo humano, controles positivos DNA Pol A, controles positivos 15KDa, respectivamente.

## 7- Discussão

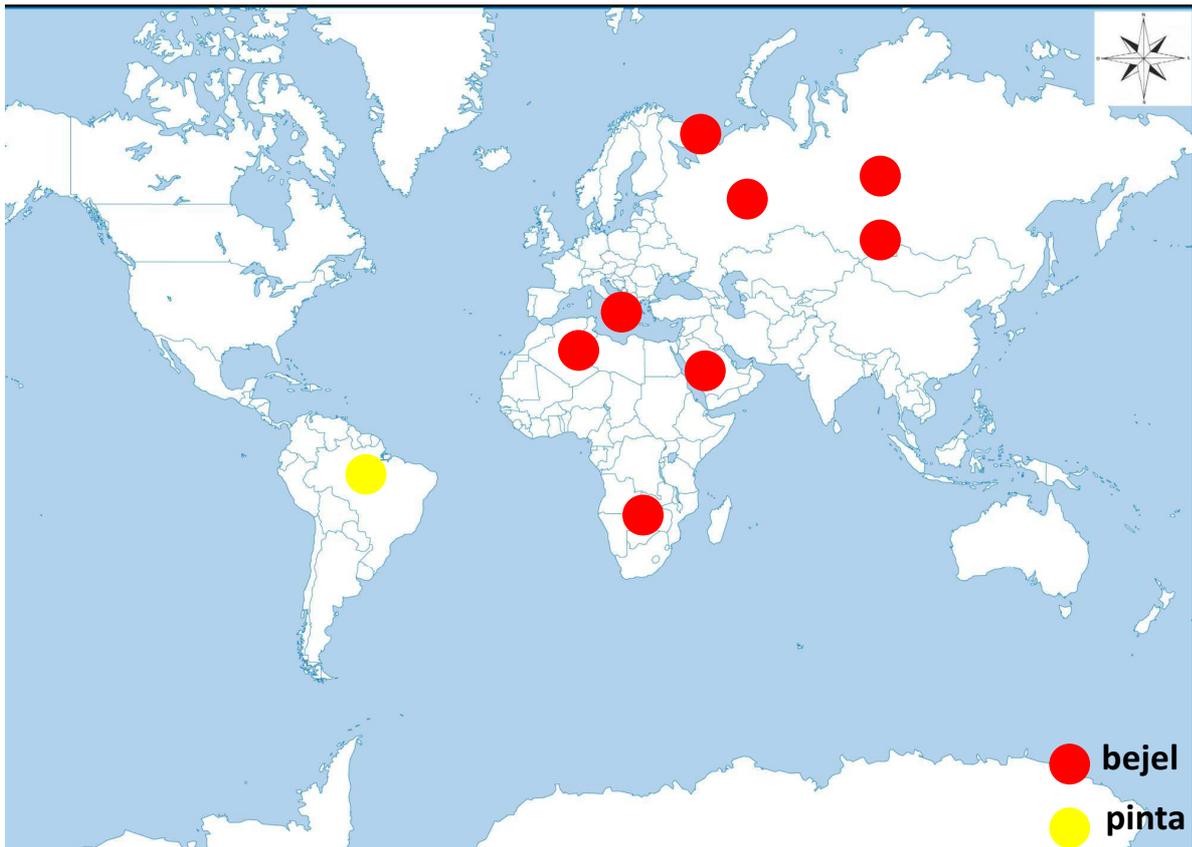
A análise molecular das subespécies da bactéria é uma importante ferramenta para oferecer informações que contribuam para o conhecimento acerca da origem da sífilis, bem como dispersão das treponematoses. No entanto, a recuperação do material genético da *T. pallidum* em amostras arqueológicas ainda é um alvo difícil de ser alcançado. Kolman C *et al.* (1999) e Montiel R *et al.* (2012) demonstraram a detecção de aDNA da *Treponema* com a utilização da PCR como ferramenta. Entretanto, estes são os únicos estudos que tiveram sucesso na recuperação de aDNA da bactéria. Kolman C *et al.* (1999), que aplicou o marcador molecular 15KDa, revela que para o sucesso da obtenção do material genético foi essencial a padronização da metodologia com a aplicação de espermidina. Este composto estabiliza membranas celulares e a estrutura do DNA (Nascimento E *et al.* 2009). Além disso, a extração de DNA foi realizada com duas adições de EDTA em momentos diferentes, permanecendo cada uma durante uma semana e meia a 4°C. EDTA tem propriedade descalcificante em contato com o osso, fazendo com que minerais presentes nas membranas sejam solúveis e assim permita a extração do DNA (Kiviranta M *et al.* 1980). Montiel R *et al.* (2012) sugerem que o sucesso na detecção de aDNA de *Treponema* deveu-se às amostras do estudo de indivíduos neonatos. Segundo os autores, quanto mais jovem o indivíduo, mais fácil é a recuperação de aDNA amplificável, devido ao alto número de espiroquetas disseminadas pelo corpo, o que facilitaria a detecção. Por outro lado, estudos tem descrito o insucesso na recuperação e detecção de aDNA de *T. pallidum*. Bouwman AS e Brown TA (2005) foram capazes de recuperar mtDNA em 25/46 amostras de ossos de indivíduos de sítios arqueológicos ingleses datados entre os séculos IX e XIX. A maior parte dos indivíduos apresentava evidências paleopatológicas de treponematoses. Este resultado indica que os ossos analisados estavam em condições de preservação que permitiram a extração de aDNA humano amplificável. Entretanto, o mesmo não foi verificado na análise do DNA de *T. pallidum*, pois após aplicarem sete diferentes alvos moleculares da bactéria, foram observados somente resultados negativos. Barnes I e Thomas MG (2006) em estudo de detecção de *T. pallidum* em remanescentes humanos com modificações osteológicas características de sífilis, provenientes dos EUA e Inglaterra e datadas dos

séculos XVIII e XX, discutem que a falta da recuperação de DNA de *T. pallidum* pode ser explicada por diversas razões. Os autores citam a ausência de bactéria no osso, a baixa carga bacteriana e a ausência de integração do DNA do patógeno ao osso do hospedeiro, entre outros. Von Hunnius *et al.* (2007) justificam que a falha na detecção do material genético da bactéria deveu-se a baixa preservação do aDNA devido a ausência de lipopolissacarídeos nas membranas de *Treponemas*.

Até o momento os estudos que aplicam técnicas moleculares para a detecção de *T. pallidum* em remanescentes humanos de sítios arqueológicos fizeram uso apenas da técnica de PCR. A hibridização de aDNA tem sido cada vez mais utilizada na paleogenética como forma de diagnóstico molecular. Madden M *et al.* (2001) aplicaram PCR para diagnóstico de *T. cruzi* em aDNA extraído de diversos tecidos de múmias datando de 2000 A.P. escavadas no Norte do Chile. A técnica foi seguida de clonagem, sequenciamento e complementada com hibridização, demonstrando sua eficácia na detecção do microrganismo. *T. cruzi* também foi identificado em múmias datando 2.000 anos B.P. – 1.400 A.D. no Norte do Chile, através da técnica de PCR precedido de hibridização (Ferreira LF *et al.* 2000). Neste estudo a técnica de hibridização foi aplicada para a confirmação da especificidade dos pPCR amplificados das amostras arqueológicas. Usando a mesma técnica, Aufderheide (2004) identificaram *T. cruzi* em remanescentes humanos da área Costal Andina, datando de 450 a 9.000 anos B.P. No estudo se utilizou uma membrana de Dot Blot com pPCR das amostras humanas de diversos sítios de infecção da tripanossomíase a qual foi submetida a hibridização para a detecção do parasito com o marcador estabelecido por Ferreira 2000. O estudo revelou um padrão epidemiológico de 40,6% de prevalência da doença de Chagas nesse período (Aufderheide AC *et al.* 2004). Jaeger LH *et al.* (2012) aplicaram a técnica de hibridização em membrana de Dot Blot de aDNA total de amostras humanas de diversos sítios de infecção da tuberculose, depois do insucesso da aplicação de PCR direta. Após utilizarem esta técnica de hibridização de aDNA foram capazes de detectar *M. tuberculosis* em indivíduos dos séculos XVII ao XIX, do sítio arqueológico INSC. Os autores mostraram que 53,1% dos indivíduos estavam infectados pela bactéria. Ainda enfatizam que a

hibridização de aDNA é mais sensível que a PCR e não está sujeita à contaminação por pPCR, o que a coloca como uma ferramenta útil para amostras degradadas ou com baixa carga bacteriana, e garante a confiabilidade dos resultados, respectivamente. Recentemente, a mesma abordagem foi aplicada para a análise paleogenética da tuberculose em amostras de ossos cremados (Jaeger LH *et al.* 2013b). O estudo realizado em uma população de escravos chamados “Pretos Novos”, quer dizer, escravos que morriam na travessia ou logo que aportavam no porto do Rio de Janeiro, demonstrou que 4/16 (25%) indivíduos estavam infectados pela micobactéria e consequentemente não seria a África “virgin soil” de tuberculose no período colonial, como se pensava. No presente estudo foi aplicada esta abordagem molecular pela primeira vez para detectar *T. pallidum* em amostras humanas arqueológicas. Foi demonstrada a presença de *T. pallidum* em aproximadamente 30%, média de 31,25% (30,7% - 31,8%), da população enterrada nos sítios INSC e CPXV. Esta prevalência indica a presença da infecção por *Treponema*, no entanto, não é um indicativo de que os indivíduos tenham manifestado a doença. Alguns fatores levam a sugerir que a treponematose circulante entre estas populações seria a sífilis. Em revisão realizada por Antal G *et al.* (2002) é relatada que a doença é dividida em fases sintomáticas e assintomáticas, com períodos de latência entre as fases sintomáticas. Apenas um terço dos indivíduos que estão na fase latente tardia é sintomático (Swartz MN *et al.* 1998). Isto sugere que muitos dos infectados poderiam não exibir sintomas da doença. Outros fatores também sugerem a presença de sífilis entre as populações estudadas. Os marcadores moleculares utilizados na análise genética deste estudo são específicos para as espécies *T. pallidum* e *T. paraluisuniculi*, sendo esta última uma espiroquetose venérea em coelhos (Smajs D *et al.* 2011). O que indica a infecção por treponematoses humanas entre os indivíduos estudados. A hibridização de aDNA aplicada como ferramenta molecular para detecção de *T. pallidum* neste estudo não permite diferenciar geneticamente entre as subespécies, e consequentemente, entre as treponematoses. Portanto, nossos resultados podem indicar infecção por *T. p. ssp. pallidum*, *T. p. ssp. pertenue* ou *T. p. ssp. endemicum*. Entretanto, características epidemiológicas e distribuição geográfica das treponematoses limitam para a presença de sífilis entre as populações

estudadas. (Dyck EV *et al.* 1999). A distribuição geográfica das treponematoses endêmicas está relacionada ao clima da região, e as áreas demarcadas pelos seus acometimentos são bem conhecidas (Antal G *et al.* 2000; Mitjà O *et al.* 2013). A bejel encontra-se em climas secos, quentes e temperados, e assim, restrita ao Norte e Sudeste da Europa, Rússia, Mongólia, Oriente Médio, Leste do Mediterrâneo, África do Sul e algumas populações nômades e seminômades do Norte da África (Antal G *et al.*). A pinta, no Brasil, tem sido identificada apenas em tribos indígenas da Amazônia (Guimarães FN e Rodrigues BA 1948; WHO 1987) (Figura 14). Estes dados epidemiológicos sugerem a uma pouca probabilidade da presença de bejel e pinta nas populações do presente estudo. Grin EI (1956) apresentou a distribuição geográfica mundial das treponematoses não venéreas, e de acordo com o autor, somente a boubá estaria presente no Brasil, na região tropical. Antal G *et al.* (2002) descrevem a presença desta doença apenas em regiões de florestas tropicais, com altos índices de precipitação e umidade. Por isso a possibilidade da presença de boubá entre os indivíduos estudados não pode ser descartada. Segundo Edler FL (2010), a boubá era uma das doenças mais presentes entre colonos, negros e índios no Brasil. Contudo, a alta taxa de mortalidade por sífilis já vinha sendo apontada por fontes seguras a partir do século XVIII (Araújo OS 1928). As estatísticas eram reveladas pela contribuição do número de internações em diferentes hospitais brasileiros. Em artigo publicado na Gazeta Médica da Bahia em 1861, mais de um terço dos internados nas enfermarias de cirurgias da Santa Casa de Misericórdia do Rio de Janeiro no período de 1861 a 1866, eram de portadores de doenças venéreas (Da frequência das moléstias syphiliticas no Rio de Janeiro e da necessidade de adoptarem-se medidas que atenuem seus estragos, 1871). A combinação de dados epidemiológicos e históricos apresentados leva a sugerir que muitos dos indivíduos dos sítios arqueológicos INSC e CPXV provavelmente sofriam de sífilis, doença com distribuição mundial.



**Figura 14:** Mapa da distribuição geográfica de bejel e pinta Segundo Antal G et al. 2002; Guimarães FN e Rodrigues BA 1948; WHO 1987.

Neste estudo, é demonstrada a presença de *T. pallidum* em ossos de remanescentes humanos datados dos séculos XVII ao XIX através da utilização da hibridização de aDNA. Foi possível observar que nos sítios INSC e CPXV aproximadamente 30% da população estava infectada por *T. pallidum*. O aparecimento de lesões em indivíduos com sífilis ocorre em estágios avançados da doença e o nível de detecção de aDNA de *T. pallidum* nesta fase é reduzido (Montiel R et al. 2012). Nas amostras analisadas nos dois sítios arqueológicos não se observou lesões características da doença, o que sugere que os indivíduos que poderiam ser sífilíticos estariam em estágios primários e secundários da doença.

Embora a localização dos sítios arqueológicos INSC e CPXV sejam próximos da costa do Rio de Janeiro, e alguns enterramentos tenham sido afetados pelas chuvas, presença de insetos, solo ácido e entrada de água salgada proveniente de marés (Jaeger LH et al. 2012, 2013a), a análise

genética dos indivíduos destes sítios ainda pode fornecer dados quanto à circulação de treponematoses nesta população. Contudo, foi essencial a aplicação da abordagem de coleta paleogenética que consiste em medidas controle durante a escavação e no armazenamento das amostras (Ver materiais e métodos). Diferentemente do sítio arqueológico CPXV, em que as amostras passaram por processos de curadoria e foram mantidas em coleções museológicas, sem serem tomadas as precauções necessárias para uma análise genética posterior. No sítio arqueológico INSC, pesquisadores da Fiocruz juntamente com arqueólogos do IAB puderam realizar a coleta paleogenética *in situ*, o grande diferencial na qualidade de preservação do aDNA em relação ao sítio CPXV. No sítio INSC, embora apenas 12 amostras tenham apresentado positividade para o alvo molecular 15KDa, 7 foram reativas para o mesmo, resultando em uma prevalência de 54,5%. Esta frequência foi maior em comparação ao sítio CPXV que teve prevalência de 7% de treponematose para este alvo. Este cenário provavelmente é um reflexo dos cuidados aplicados durante a coleta paleogenética.

No presente estudo, foi possível extrair aDNA utilizando apenas 200 mg de pó de osso, ao contrário de Kolman C *et al.* (1999) que utilizou 15 g. Von Hunnius *et al.* (2007) descreve que métodos de extração de aDNA não utilizam mais do que 1g de material ósseo. A pequena quantidade de material ósseo requerida para pesquisa paleogenética é essencial visto a importância da preservação de amostras arqueológicas.

Dias O (2008) descreve que em algumas das covas exumadas no sítio INSC, os corpos foram cobertos com boa quantidade de cal, e à medida que os caixões de madeira desapareceram com o tempo, os cadáveres foram preservados em uma espécie de cápsula, onde alguns mantiveram detalhes de seus corpos impressos em seu interior. A prática de jogar cal nos corpos em enterramentos antigos está também relacionada à presença de lesões nos corpos, pois a camada de cal evitaria a exalação de maus cheiros e a disseminação de microrganismos localizados nos ferimentos, pois estes poderiam ser fonte de infecção para outras pessoas. Rodrigues C (1997) descreve: “Os cadáveres serão (...) cobertos de uma camada de cal, e encerrados em caixões inteiros de madeira perfeitamente unidos e fechados.

Só assim evitará respirar-se miasmas que sempre prejudicam, e que aumentam a repugnância que se tem aos mortos”.

A análise bioantropológica revelou uma baixa expectativa de vida para os indivíduos ali enterrados, em razão da grande quantidade de jovens adultos, até 30 anos de idade (78%) (Dias O 2008; Jaeger LH *et al.* 2012). Dias O (2008) descreve: “mas de fato quase ninguém morria velho”. A escassez de dados estatísticos durante o período prejudica a obtenção de informações confiáveis, mas de fato não se pode negar que a sífilis contribuiu significativamente para a situação devastadora de morbidade e mortalidade no Brasil (Carrara S 1996). Dias O (2008) comenta que as pesquisas paleogenéticas realizadas com as amostras coletadas no local devem dar a resposta para a tão curta expectativa de vida. Os resultados aqui encontrados podem estar associados a este indicador de saúde bem como a alta prevalência por tuberculose observada por Jaeger LH *et al.* (2012).

Este trabalho pretende contribuir para o conhecimento da paleoepidemiologia das treponematoses no período histórico brasileiro no Rio de Janeiro. As populações dos sítios arqueológicos analisados representam o panorama de saúde pública que ocorria nas Américas neste período. Evidências de treponematoses foram encontradas em esqueletos de Lower Susquehanna River Valley, Norte dos Estados Unidos, datados entre 1575-1600. Alguns dos esqueletos encontrados apresentaram lesões como tibia em sabre, que é uma das características de sífilis, e manifestações craniais (Gagnon CM 1996). Diversos outros autores descrevem a presença de treponematoses em outras áreas da América no período pós-contato (Tríbin HAS 2012; Okumura MMM e Eggers S 2004, De la Cova C 2011). No período colonial a epidemia de sífilis tornou-se um problema de saúde pública no Brasil. Gonçalves MA (1997) e Rodrigues C (1997) registraram elevadas taxas de mortalidade por conta de sífilis e outras doenças infecciosas durante o período. Os altos índices seriam consequência da falta de medicamentos eficazes para o tratamento. Mercúrio, arsênico, bismuto e iodetos foram as drogas inicialmente utilizadas, no entanto, demonstraram baixa eficácia, toxicidade e difícil manuseio. Em 1928 após a descoberta por Fleming sobre o poder atuante da penicilina sob a *T. pallidum*, a sífilis passou a ganhar menos

destaque na história da epidemiologia brasileira (Avelleira JCR e Botino G 2006). A falta de conhecimento sobre os modos de transmissões sexual e congênita, e ainda de programas de saúde para controle da infecção, podem ter contribuído também para a ampla distribuição da sífilis. Outras raras formas de transmissão da doença como através de objetos contaminados, tatuagens e transfusões sanguíneas (Garnett GP *et al.* 1997), podem ser consideradas. Mas como essas formas de transmissão são menos importantes epidemiologicamente, pouco se sabe sobre seu poder de dispersão. Entretanto, a contribuição dessas vias em tempos ancestrais não pode ser descartada, principalmente pela falta de práticas de esterilização e higiene em procedimentos médicos (WHO 2001).

A miscigenação relacionada à sifilização do Brasil foi tema de grande discussão entre sifilógrafos e escritores. Araújo OS (1928) aponta que a falta de miscigenação estaria diretamente ligada à severidade da sintomatologia da sífilis na população brasileira. Em regiões menos miscigenadas, como no caso do Nordeste, os sinais da doença eram expressos de forma mais intensa. Portanto, a falta de mistura de raças da Europa teria sido uma das causas para a devastação por sífilis no continente. No entanto, Freyre G (1933) discute que o início da miscigenação teria dado origem a sifilização. De acordo com os resultados do presente estudo, parece que todas as classes sociais, a baixa e majoritariamente africana, representada pela população do CPXV, e a abastada, pelos indivíduos da INSC, estiveram expostas a infecção, com uma prevalência similar. É evidente a vulnerabilidade à infecção pelo *Treponema* independentemente da etnia, entretanto, devido a que populações indígenas de ancestralidade ameríndia não estão totalmente incluídas no presente estudo, análises posteriores precisam ser realizadas. Seguindo a hipótese mais provável de surgimento da sífilis, a Hipótese Colombiana, que propõe que a doença emergiu nas Américas, e posteriormente levada à Europa pelos exploradores europeus, podemos conjecturar que os ameríndios seriam menos vulneráveis ou até mesmo imunes à sífilis por já terem sido expostos à doença.

A predominância de ascendência europeia observada por Jaeger LH *et al.* (2012) no sítio INSC está de acordo com relatos anteriores de que as igrejas eram utilizadas para o sepultamento de indivíduos da classe eclesiástica e

católicos de alta posição social (Pereira JCMS 2007). Segundo Rodrigues C (1997), o interior da igreja era reservado apenas para os enterramentos da classe nobre. Os sepultamentos eram realizados de acordo com a hierarquia social a que pertencia o indivíduo enquanto vivo. Os principais locais, como túmulos perto dos altares e santos, eram ocupados pelos mais respeitados (Medeiros JC 2012). Em seu interior as igrejas não permitiam sepultamentos de indivíduos que estivessem “fora de suas boas graças” e por isso cediam as adjacências como forma de espaço para abertura de covas (Rodrigues C 1997). Isso explicaria as evidências culturais de origem africana encontrada apenas em torno da nave central da Igreja INSC (Dias O 2008).

Os resultados parciais do sítio arqueológico CPVX mostraram haplogrupos Europeus, Ameríndios e Africanos confirmando registros históricos que este sítio também foi usado como cemitério da população em geral, os mais desfavorecidos, como mencionado anteriormente.

Os enterramentos ocorridos durante os séculos XIV até o XVIII eram realizados conforme as normas da igreja, em que a classe social do morto era fundamental para determinar o local e a forma de sepultamento (Medeiros JC 2012). Todos os procedimentos seriam realizados de acordo com a vontade da igreja católica, desde a cerimônia funeral até os rituais de sepultamento. No sítio INSC observa-se a disposição de um ossuário de crânios que provavelmente foi resultado de práticas de exumação de corpos para liberação de espaços para novos cadáveres. Diversos crânios estavam amontoados. A maior quantidade dos sepultamentos secundários foi provavelmente para desocupação de covas para novos enterramentos (Dias O 2008).

### **7.1- Análise Parasitológica**

A análise de registros das Unidades de Saúde durante este estudo revelou a carência de pedidos de exames parasitológicos em pacientes soropositivos para sífilis e com suspeita da doença. Este cenário reflete à escassez de trabalhos que abordem temas como este. A falta desses dados impossibilita correlacionar fatores vinculados a parasitoses intestinais com características epidemiológicas de indivíduos com sífilis. Jennings E (1912) ao descrever o achado de protozoários em cancos e sangue de sífilítico não traz características quanto ao perfil do indivíduo, e, portanto permanece ausente o

conhecimento do quadro das possíveis infecções concomitantes entre parasitas intestinais e *T. pallidum* ssp. *pallidum*.

O perfil parasitológico destes pacientes não pode ser traçado aos perfis paleoparasitológicos de remanescentes humanos dos sítios INSC e CPXV devido à escassez de dados. Como mencionado anteriormente a análise paleoparasitológica do sítio arqueológico INSC realizada por Jaeger LH *et al.* (2013c) revelou a presença de *Trichuris* sp. e *Ascaris* sp. No sítio CPXV foi verificada a infecção por *Trichuris* sp em 80% dos indivíduos analisados, incluindo amostras analisadas nesta dissertação (Jager LH *et al.* 2013a).

## 7.2- Análise da detecção molecular de *T. pallidum* em soros

A PCR tem sido frequentemente utilizada como ferramenta para diagnóstico molecular de *T. pallidum* em materiais frescos, como sangue, swabs e raspados de lesões, que já tem sido sempre descritos como fonte primária para avaliação da detecção molecular de *T. pallidum*. (Grange PA *et al.* 2012; Shield M 2012; Gayet-Ageron A *et al.* 2013). Entretanto, a sensibilidade da PCR aplicada ao DNA extraído de soro de indivíduos com sífilis foi pouco descrito. Kouznetsov *et al.* (2005) detectaram a presença de gene da proteína 47KDa em soros de pacientes submetidos a triagem e confirmação por VDRL e TPHA, respectivamente. O DNA de *Treponema* que foi comparado a titulações sorológicas, pode ser detectado em 83,3% dos pacientes sintomáticos para sífilis e em 67% daqueles em estágio tardio. No presente estudo, foi avaliado o nível de detecção do DNA da bactéria em soros de pacientes com sífilis ou com indicação clínica da doença que são atendidos em Unidades de Saúde do Rio de Janeiro. O DNA de *T. pallidum* pode ser detectado com todos os alvos moleculares aplicados em todas as titulações sorológicas testadas, mesmo em amostras com fracos sinais sorológicos. Um estudo que avaliou a detecção de *T. p. ssp. pallidum* em 138 amostras de soro de pacientes com suspeita de sífilis em diversos estágios, não pode detectar DNA em nenhuma das amostras analisadas (Falasarová M *et al.* 2006). O sucesso da aplicação do diagnóstico molecular por PCR neste estudo foi demonstrado pela detecção com intensidades de fraca a forte em amostras com titulações de até 1:8. O alvo 47KDa foi o que mostrou melhor sensibilidade, seguido de DNA Pol A e 15KDa. No que respeita ao objetivo desta análise, de verificar a sensibilidade da PCR para detecção de *T. pallidum* em amostras de soro, para posterior avaliação na análise paleogenética, pode-se demonstrar que a técnica foi capaz de detectar DNA da bactéria em diferentes titulações sorológicas. A abordagem mostrou-se sensível até mesmo em amostras classificadas como fracamente reatoras na sorologia. Entretanto, padronizações ainda precisam ser estabelecidas, e parâmetros avaliados, a fim de recomendar-se esta técnica como um diagnóstico molecular da sífilis em amostras de soro.

## **8- Conclusões**

### **Detecção molecular de *T. pallidum* em soros de indivíduos com sífilis**

- ✓ DNA de *T. pallidum* pode ser detectado em soros de pessoas com sífilis em títulos de 1:2 até 1:8.
- ✓ A técnica de PCR mostrou ser eficaz na detecção de DNA de *T. pallidum* até mesmo em amostras fracamente reatoras na sorologia.

### **Perfil parasitológico de indivíduos com sífilis**

- ✓ Devido à escassez de indicação de exames parasitológicos, o perfil parasitário dos pacientes com sífilis não pode ser traçado.

### **Detecção de *T. pallidum* em remanescentes humanos**

- ✓ aDNA de *T. pallidum* obtido a partir de ossos de remanescentes humanos pode ser detectado através da técnica de hibridização.
- ✓ Indivíduos de diferentes etnias estavam infectados com *T. pallidum* e poderiam sofrer de algum tipo de treponematose

## **9- Aspectos Éticos**

A presente dissertação foi submetida à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa, ENSP (CEP) e aprovado sob número de Parecer 12/2013.

As amostras de material ósseo que foram utilizadas neste trabalho foram provenientes do acervo da Unidade de Paleogenética do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LabTrip/IOC) sob a responsabilidade da Dra. Alena Mayo Iñiguez produto de colaboração institucional com o Instituto de Arqueologia Brasileira (IAB). Este material tem sido utilizado em outras pesquisas, apresentando contribuições para estudos da epidemiologia das infecções infecto-parasitárias no passado.

O levantamento de dados parasitológicos e recebimento de amostras de soro para análise molecular foi realizado mediante apresentação de proposta ao Comitê Científico do Centro de Saúde Germano Sival Faria ENSPFIOCRUZ, o qual foi aprovado para seu desenvolvimento conjunto.

## 10- Referências Bibliográficas

Antal G, Lukehart S, Meheus A. The endemic treponematoses. *Microbes and Infection* 2002; 4: 83–94.

Araújo, OS. Alguns comentários sobre a sífilis no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Empreza Gráfica Editora Paulo Pongetti & Cia; 1928.

Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streit J, Buikstra J, Guhl F et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 2004; 101(7):2034-9.

Avelleira JCR e Botino G. Sífilis: diagnóstico, tratamento e controle. *An. Bras. Dermatol.* 2006; 81 (2): 111-126.

Barnes I, Thomas MG. Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in museum osteological collections. *Proc. R. Soc. B.* 2006; 273, 645–653.

Bell LS, Skinner MF, Jones SJ. The speed of post-mortem change to the human skeleton and its taphonomic significance. *Forensic Sci. Int.* 1996; 82: 129–149.

Behrhof W, Springer E, Bräuninger W, Kirkpatrick CJ, Weber A. PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin-embedded skin biopsy specimens: test design and impact on the diagnosis of syphilis. *J Clin Pathol.* 2008 Mar;61(3):390-5.

Bowman AS, Brown TA. The limits of biomolecular palaeopathology: ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis. *J archeol Sci* 2005; 32 (5): 703-713.

Cameron CE, Castro C, Lukehart SA, Van Voorhis WC. Sequence conservation of glycerophosphodiester phosphodiesterase among *Treponema pallidum* strains. *Infect. Immun* 1999; 67: 3168–3170.

Campos PF, Craig OE, Turner-Walker G, Peacock E, Willerslev E, Gilbert MT. DNA in ancient bone - where is it located and how should we extract it? *Ann Anat.* 2012; 194(1):7-16.

Castellani A. FURTHER OBSERVATIONS ON PARANGI (YAWS). 1905; *The British Medical Journal*; Nov (18), 1330.

Cejková D, Zobaníková M, Chen L, Pospíšilová P, Strouhal M, Qin X, et al. Whole Genome Sequences of Three *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* Strains: Yaws and Syphilis Treponemes Differ in Less than 0.2% of the Genome Sequence. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(1), e1471.

Centurion-Lara A, Castro C, Castillo R, Shaffer JM, Van Voorhis WC, Lukehart SA. The flanking regions sequences of the 15-kDa lipoprotein gene differentiate pathogenic treponemes. *J. Infect. Dis.* 1998; 177, 1036–1040.

Centurion-Lara ES, Sun L.K, Barrett C, Castro SA, Lukehart WC, Van Voorhis. Multiple alleles of *Treponema pallidum* repeat gene D in *Treponema pallidum* isolates. *J. Bacteriol* 2000, 182:2332–2335.

Centurion-Lara A, Molini BJ, Godornes C, Sun E, Hevner K, Van Voorhis WC, et al. Molecular differentiation of *Treponema pallidum* subspecies. *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3377-80.

Chen JJ, Yu CB, Du HB e Li LJ. HIV, hepatitis B and C, and syphilis prevalence and coinfection among sex workers in Southern Brazil. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2011; 10(2).

Cole G, Waldron T. Apple Down 152: A Putative Case of Syphilis from Sixth Century AD Anglo-Saxon England. *Am J of Phys Anthropol* 2011; 144: 72-79.

Crosby AWJR. The early history of syphilis: a reappraisal. *American Anthropologist.* 1969; 71: 218-227.

'Da freqüência das moléstias syphiliticas no Rio de Janeiro e da necessidade de adoptarem-se medidas que attenuem seus estragos'. *Gazeta Médica da Bahia.* 1871, ano V. (99-101).

Debret JB. Viagem pitoresca e histórica ao Brasil. Trad. e notas Sérgio Milliet. 1989. Belo Horizonte: Itatiaia; São Paulo: Edusp.

De la Cova C. Race, health, and disease in 19th-century-born males. *Am J Phys Anthropol.* 2011 Apr;144(4):526-37.

De Melo F, De Melo J, Fraga AM, Nunes K, Eggers S. Syphilis at the crossroad of phylogenetics and paleopathology; *PLoS Negl Trop Dis.* 2010; 5 (1), e575, 1-11.

Dias O. Arqueologia, Igreja de Nossa Senhora do Carmo da Antiga Sé: História e Restauração. 2008. Editora Nacional, Rio de Janeiro.

Dyck EV, Meheus AZ, Piot P; in *Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases* 1999; Syphilis, chapter 3. World Health Organization, Geneva.

Edler FL. O saber medico e o poder profissional: do contexto-luso brasileiro ao Brasil imperial. In: *Na corda bamba de sombrinha: a saúde no fio da história.* Ponte CF e Falleiros I. Rio de Janeiro : Fiocruz/COC; Fiocruz/EPSJV, 2010.

Efremov JA. TAPHONOMY: NEW BRANCH OF PALEONTOLOGY. *American Geologist.* Sep1940; V.LXXIV (2).

Ferreira LF, Britto C, Cardoso MA, Fernandes O, Reinhard K, Araújo A. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Trop.* 2000; 75: 79-84.

Fillipini J. Treponematoses e outras paleopatologias em sítios arqueológicos pré-históricos do litoral sul e sudeste do Brasil. São Paulo. Tese [doutorado] – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva; 2012.

Fitzpatrick TB. Tratado de Dermatologia, ed. Revinter, 5ªed, 2º volume, 2005.

Flasarová M, Smajs D, Matejková P, Woznicová V, Heroldová-Dvoráková M, Votava M. Molecular detection and subtyping of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in clinical specimens. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2006 Aug;55(3):105-11.

Fraser CJ, Norris SJ, Weinstock GM, White O, Sutton GG, Dodson R, et al. Complete Genome Sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. *Science* 1998; 281: 375-388.

Freyre G. Casa grande e senzala. 4ª ed. Rio de Janeiro: 1946; Olympio J, V.1.

Gagnon CM. THE EFFECTS OF EUROPEAN CONTACT ON NATIVE AMERICAN HEALTH IN THE LOWER SUSQUEHANNA RIVER VALLEY. Estados Unidos. Dissertação [Mestrado]. Arizona State University, 1996.

Garnett GP, Aral SO, Hoyle DV, Cates W Jr, Anderson RM. The natural history of syphilis. Implications for the transmission dynamics and control of infection. *Sex Transm Dis.* 1997;24:185-200.

Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C. Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Infect.* 2013 May;89(3):251-6.

Gjestland T. The Oslo study of untreated syphilis. *Acta Derm. Venereol.* 1955; 35: 11–368.

Gonçalves MA. Expostos à Misericórdia – Um estudo sobre o abandono de crianças no Rio de Janeiro (séculos XVIII e XIX). 1997.

Götherström A, Collins MJ, Angerbjörn A, Lidén K. Bone Preservation and dna amplification. *Archaeometry.* 2002; 44 (3): 395– 404.

Grange PA, Gressier L, Dion PL, Farhi D, Benhaddou N, Gerhardt P, et al. Evaluation of a PCR test for detection of *treponema pallidum* in swabs and blood. *J Clin Microbiol.* 2012 Mar;50(3):546-52.

Grin EI., Endemic syphilis and Yaws. *Bull. World Health Org.* 1956; 15: 959-973.

Guimarães FN e Rodrigues BA. O puru-puru da Amazônia (Pinta, Carate, Mal del Pinto etc). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1948. 46(1); 135-197.

Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, et al. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol.* 1999; (4):401-7.

Hackett CJ. On the origin of the human Treponematoses (Pinta, Yaws, endemic Syphilis and venereal Syphilis). *Bull World Health Organ.* 1963; 29:7-41.

Harper KN, Ocampo PS, Steiner BM., George RW, Silverman MS, Bolotin S, et al. On the origin of the treponematoses: a phylogenetic approach. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2 (1): e148.

Herrmann B, Hummel S. Introduction. In: Herrmann B, Hummel S. *Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens.* 1994 New York: Springer.

Higuchi R, Bowman B, Freiberger B, Ryder OA, Wilson AC. DNA sequence from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 1984; 312: 282-284.

Hillson S, Grigson C, Bond S. Dental Defects of congenital syphilis, *American Journal Physical Anthropology.* 1998; 107 (1): 25-40.

Ho EL, Lukehart SA. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. *J Clin Invest.* 2011; 121(12):4584-92.

Holt SC. Anatomy and chemistry of Spirochetes. *Microbiol. Rev.* 1978; 2 (1), 114-160.

Horn S. Case study: enrichment of ancient mitochondrial DNA by hybridization capture. *Methods Mol Biol.* 2012; 840:189-95.

Hudson E. Treponematoses and Man's Social Evolution. *American Anthropologist.* 1965; 67 (4): 885-901.

Iñiguez AM, Araújo A, Ferreira LF, Vicente AC. Analysis of Ancient DNA from Coprolites: a Perspective with Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98 Suppl 1:63-5.

Iñiguez AM, Reinhard K, Carvalho Gonçalves ML, Ferreira LF, Araújo A, Paulo Vicente AC. SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int J Parasitol.* 2006; 36(13):1419-25.

Iñiguez AM. Paleoparasitologia molecular. In: *Paleoparasitologia*, Ferreira LF et al. (2011), ed. Fiocruz.

Jaeger LH, Leles D, Lima Vdos S, da Silva Lda P, Dias O, Iñiguez AM. Mycobacterium tuberculosis complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol.* 2012;12(4):642-8.

Jaeger LH, Taglioretti V, Fugassa MH, Dias O, Neto J, Iñiguez AM. Paleoparasitological results from XVIII century human remains from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 2013a; 125(3):282-6.

Jaeger LH, Dias O, Iñiguez AM. Mycobacterium tuberculosis complex infection in human remains from Praça XV cemetery, Rio de Janeiro. 2013b. Trabalho apresentado no 8<sup>th</sup> World Congress on Mummy Studies em forma de pôster. Rio de Janeiro.

Jaeger LH, Taglioretti V, Dias O, Iñiguez AM. Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th century in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Paleopathology.* 2013c. 3: 214– 217.

Jel M, Rothschild BM, Woods R, Rothschild C. Unique aspects of west coast treponematoses. *Chungara* 2000; 32:1–12.

Jennings E. THE PARASITES RECENTLY FOUND IN SYPHILIS. *BR Med J.* 1912; Dec 14; 2(2711): 1655.

Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Kassu A, Mekonnen A, Bekele A, Abseno N, Melese E, Moges F, et al. HIV and syphilis infection among elderly people in northwest Ethiopia. *Jpn J Infect Dis.* 2004 Dec;57(6):264-7.

Kiviranta M, Tammi R, Lappalainen T, Kusela, Helminen HJ. The rate of calcium extraction during EDTA decalcification from thin bone slices as assessed with atomic absorption spectrophotometry. *Histochemistry and Cell Biology.* 1980; 68(2):119-120.

Kolman C, Centurion-Lara A, Lukehart S, Owsley S, Tuross N. Identification of *Treponema pallidum* Subspecies *pallidum* in a 200-Year-Old Skeletal Specimen. *J Infect Dis* 1999; 180:2060–3.

Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, Multhaupt S, Prinz JC. Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of *Treponema pallidum* in various tissue sources of patients with syphilis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2005; 51; 143 – 145.

Lima BGC. Mortalidade por sífilis nas regiões brasileiras, 1980-1995. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Brasileira* 2002; 38(4): 267-271.

Liska SL, Perine PL, Hunter EF, Crawford JA, Feeley JC. Isolation and transportation of *Treponema pertenuis* in golden hamsters. *Curr Microbiol*. 1982; 7: 41–43.

Lukehart SA, Hook EW, Baker-Zander SA, Collier AC, Critchlow CW, Handsfield HH. Invasion of the central nervous system by *Treponema pallidum*: implications for diagnosis and treatment, *Ann. Intern. Med.* 1988; 109: 855–862.

Madden M, Salo WL, Streitz J, Aufderheide AC, Fornaciari G, Jaramillo C. Hybridization screening of very short PCR products for paleoepidemiological studies of Chagas' disease. *Biotechniques* 2001. 30: 102-104.

Mays S, Crane-Kramer G, Bayliss A. Two probable cases of treponemal disease of medieval date from England. *Am J of Phys Anthropol* 2003; 120: 133-143.

McNeill WH. *Plagues and peoples*. Anchor books Edition, United States of America 1996.

Medeiros JC. GERMINAL: MORTE E SEPULTAMENTO DE PRETOS NOVOS NO RIO DE JANEIRO DO SÉCULO XIX. *Habitus*. 2012; V.10(2), 173-185.

Meyer C, Jung C, Kohl T, Poenicke A, Poppe A. Syphilis 2001 – a palaeopathological reappraisal. *HOMO*. 2002; 53 (1): 39-58.

Miao R, Fieldsteel AH. Genetic relationship between *Treponema pallidum* and *Treponema pertenuis*, two noncultivable human pathogens. *J. Bacteriol.* 1980; 141, 427–429.

Mikalová L, Strouhal M, Čejková, D. Genome analysis of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* and subsp. *pertenuis* strains: Most of the genetic differences are localized in six regions. *PLoS One* 2010; 5(12) e15713.

Ministério da Saúde, Comentários sobre os Indicadores de Morbidade e Fatores de Risco até 2006. [http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2008/Com\\_D0111.pdf](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/idb2008/Com_D0111.pdf). (Acessado em 13/01/2012).

Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico sífilis 2012. Ano 1, nº1

Mitjà O, Šmajš D, Bassat Q. Advances in the Diagnosis of Endemic Treponematoses: Yaws, Bejel, and Pinta. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Oct 24;7(10):e2283.

Montiel R, Solórzano E, Díaz N, Álvarez-Sandoval BA, González-Ruiz M, Cañadas MP, et al. Neonate Human Remains: A Window of Opportunity to the Molecular Study of Ancient Syphilis. *Plos One*, 2012; 7(5): e36371

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, Treponema, Borrelia e Leptospira. *Microbiologia Médica*. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p 419-424.

Nascimento E, Pinheiro MC., De Souza GNP. Genotipagem de DNA em Condições Adversas de Amostras Low Copy Number - LCN (Amostras de Tecidos Formolizados e emblocados em Parafina). *Prova material*. 2009, 6(12).

Narain JP. Eradicating and eliminating infectious diseases: Past, Present and Future; *Indian J public Health* 2011; 55 (2): 81-87.

Nichols HJ. Observations on a strain of *Spirochaeta pallida* isolated from the nervous system. *J Exp Med*. 1914; 19: 362–371.

Noordhoek GT, Hermans PW, Paul AN, Schouls LM, van der Sluis JJ, van Embden JD. *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* (Nichols) and *Treponema pallidum* subspecies *pertenue* (CDC 2575) differ in at least one nucleotide: comparison of two homologous antigens. *Microb Pathog*. 1989;6(1):29-42.

Oliveira FL, Benício K, Cerutti G, Natividade NB, Nery JAC. Manifestações Clínicas e sorológicas Conflitantes de sífilis em Coinfecção pelo HIV. *DST - J bras Doenças Sex Transm*. 2011;23(4):222-224.

Okumura MMM e Eggers S. The people of Jabuticabeira II: reconstruction of the way of life in a Brazilian shellmound. *HOMO – Journal of Comparative Human Biology*. 2005; V.55(3), 263-281.

Organización Mundial de la Salud. Eliminación Mundial De La Sífilis Congênita: Fundamentos Y estratégia Para La Acción. 2008

Pääbo S, Gifford J, Wilson A. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Research* 1988; 16 (9):775-789.

Pääbo, S. Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*. 1985; 314: 644-645.

Pääbo S. Amplifying DNA from archeological remains: a meeting report *Genome Res*. 1991; 1: 107-110.

Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N, et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu. Rev. Genet* 2004; 38:645-79.

Pereira JCMS. *À flor da Terra: o cemitério dos pretos novos na cidade do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, ed. Garamond. 2007.

Perine PL; Hopkins D; Niemel P; Jonh R; Causse G; Antal GM. *Handbook of Endemic Treponematoses: Yaws, Endemic Syphilis, and Pinta*. World Health Organization Geneva 1984.

Powell ML e Cook DC. *The myth of syphilis: The Natural History of Treponematoses in North America*. 2005; editado por Powell ML e Cook DC, Unniversity press of Florida.

Pruvost M, Schwarz R, Correia VB, Champlot S, Braguier S, Morel N, et al. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *PNAS* 2007; 104: 739-744.

Radolf JD, Norgard MV, Schulz WW. Outer membrane ultrastructure explains the limited antigenicity of virulent *Treponema pallidum*. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86(6):2051-5.

Ribeiro-dos-Santos AKC, Ribeiro-dos-Santos A, Santos SEB, Machado NA, Guapindaia V, Zago MA. Heterogeneity of Mitochondrial DNA Haplotypes in Pre-Columbian Natives of the Amazon Region. *Am J Phys Anthropol* 1996; 101:29-37.

Rizzi E, Lari M, Gigli E, De Bellis G, Caramelli D. Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genet Sel Evol*. 2012; 44:21.

Rodrigues C. *Lugares dos mortos nas cidades dos vivos: Tradições e transformações fúnebres do Rio de Janeiro*. V. 43, Rio de Janeiro, Coleção biblioteca carioca, 1997.

Rothschild BM, Rothschild C. Yaws, mine and ours: treponemal disease transitions in prehistory. *J Comp Human Biol*. 1994; 45:S115.

Rothschild BM, Hershkovitz I, Rothschild C. Origin of yaws in the Pleistocene. *Nature* 1995; 378:343-4.

Rothschild C, Rothschild BM. Occurrence and transitions among the treponematoses in North America. *Chungara, Revista de Antropologia Chilena*. 2000; 32:147-55.

Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York. 2001.

Schuelter-Trevisol F, Custódio G, Silva AC, Oliveira MB, Wolfart A, Trevisol DJ. HIV, hepatitis B and C, and syphilis prevalence and coinfection among sex workers in Southern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013 Jul-Aug;46(4):493-7. Scorsato AP, Telles JEQ. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol Med Lab*. 2011, v. 47, n. 5, 541-548.

Shields M, Guy RJ, Jeffreys NJ, Finlayson RJ, Donovan B. A longitudinal evaluation of *Treponema pallidum* PCR testing in early syphilis. *BMC Infect Dis*. 2012 Dec 17;12:353.

Skerman VBD., Mc Gowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1980; 30: 225-420.

Smajs D, Norris SJ, Weinstock GM. Genetic diversity in *Treponema pallidum*: implications for pathogenesis, evolution and molecular diagnostics of syphilis and yaws. *Infect Genet Evol*. 2012 12(2):191-202.

Stamm LV, Greene SR, Bergen HL, Hardham JM, Barnes NY. Identification and sequence analysis of *Treponema pallidum* tprJ, a member of a polymorphic multigene family, *FEMS Microbiol. Lett*. 1998; 169, 155–163.

Swartz MN, Healy BP, Musher DM. Late syphilis. In: Holmes, K, Mardh PA, Sparling PF, Lemon SM, Stamm WE, Piot P, Wasserheit JN, editors. *Sexually transmitted diseases*. 3rd ed. McGraw Hill; 1998. 487-98.

Talhari S, Dourado HV, Alecrim WD, Guimarães JA. “Pinta” em população nativa no Estado do Amazonas, *Acta Amazônica* 1975; 5(2): 199-202.

Tavares RB. CEMITÉRIO DOS PRETOS NOVOS, RIO DE JANEIRO, SÉCULO XIX: UMA TENTATIVA DE DELIMITAÇÃO ESPACIAL. Rio de Janeiro. Dissertação [mestrado em arqueologia]. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Museu Nacional. 2012.

Thyresson N. Girolamo Fracastoro and syphilis; *Inter J Dermatol* 1995; 34(10): 735-739.

Tornatore M, Gonçalves CV, Bianchi MS, Germano FN, Garcés AX, Soares MA. Co-infections associated with human immunodeficiency virus type 1 in pregnant women from southern Brazil: high rate of intraepithelial cervical lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Mar;107(2):205-10.

Tramont EC. *Treponema pallidum* (syphilis). Em principles and practice of infectious diseases, editado por Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. 1990; 1794-1808, New York: Churchill Livingstone.

Tribín HAS. Treponematosi: sífilis, pían y carate. In: Aspectos históricos y geográficos de algunas enfermedades importantes em colombia. Granada. 2012. 1ª ed, Universidad Militar Nueva Granada.

Von Hunnius TE, Yang D, Eng B, Waye JS, Saunders SR. Digging deeper into the limits of ancient DNA research on syphilis. *J archeol Sci*, 2007; 34: 2091-2100.

Walker DG, Walker GJ. Forgotten but not gone: the continuing scourge of congenital syphilis. *Lancet Infect Dis*. 2002 Jul;2(7):432-6.

Wenhai L, Jianzhong Z, Cao J. Detection of *Treponema pallidum* in Skin lesions of Secondary Syphilis and Characterization of the Inflammatory Infiltrate. *Dermatology* 2004; 208(2):94-7.

Wicher K, Wicher V, Abbruscato F, Baughn RE. *Treponema pallidum* subsp. *pertenue* displays pathogenic properties different from those of *T. pallidum* subsp. *Pallidum*. *Infect. Immun*. 2000; 68: 3219–3225.

World Health Organization. Sexually transmitted infections management guidelines. ([www.who.int/HIV/AIDS](http://www.who.int/HIV/AIDS)) Geneva: WHO, 2001.

Zobaníková M, Strouhal M, Mikalová L, Cejková D, Ambrožová L, Pospíšilová P, et al. Whole genome sequence of the *Treponema Fribourg-Blanc*: unspecified simian isolate is highly similar to theyaws subspecies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 18;7(4):e2172.

## Anexos

### Anexo1: Registros parasitológicos de pacientes atendidos no Hospital Universitário Pedro Ernesto

Nº registro	Ano	Pedido parasitológico	Helmintos	Protozoários
1263385	2013	Não		
1785274	2013	Não		
1779809	2013	Não		
1777477	2013	Não		
1764122	2013	Não		
1761874	2013	Não		
-	2013	Não		
1771828	2013	Não		
-	2013	Não		
1785723	2013	Não		
1778561	2013	Não		
-	2013	Não		
-	2013	Não		
1511254	2012	Não		
1773787	2012	Sim		<i>Giardia lamblia</i>
1768895	2012	Não		
1711692	2012	Não		
1751064	2012	Não		
1756276	2012	Não		
1754090	2012	Não		
1760937	2012	Não		
1764176	2012	Não		
1778564	2012	Não		
1635884	2011	Não		
1723094	2011	Não		
1696802	2011	Sim	<i>Strongyloides stercoralis</i>	
1729187	2011	Não		
1731313	2011	Não		
1689517	2011	Não		
522837	2011	Não		
1698881	2011	Não		
1737734	2011	Não		
1738468	2011	Não		
913909	2011	Sim		<i>Giardia lamblia</i>
1249035	2011	Não		
1302256	2011	Não		
1754090	2011	Não		
1722071	2010	Não		
1252191	2010	Não		

1708162	2010	Não	
1213038	2010	Não	
916878	2010	Sim	<i>Stongyloides stercoralis</i>
1648957	2010	Não	
1688135	2010	Não	
1692007	2010	Não	
1684451	2010	Não	
-	2010	Não	
1246058	2010	Não	
1684138	2009	Não	
1681924	2009	Não	
1679862	2009	Sim	<i>Ascaris lumbricoides</i>
1674368	2009	Sim	<i>Giardia lamblia</i>
1673261	2009	Não	
1647498	2009	Não	
1177765	2009	Não	
1684451	2009	Não	
-	2009	Não	
-	2009	Não	
1129427	2009	Não	
1665869	2009	Não	
1125440	2008	Não	
1129427	2008	Não	
Total	62		

**Anexo 2: Registros parasitológicos e sorológicos de pacientes atendidos no Laboratório Germano Sinval Faria (ENSP/Fiocruz)**

Registro	Data	Sorologia	TPHA	Pedido parasitológico	Helmintos	Protozoários
87	09/01/2013	SFR	?	Não		
88	09/01/2013	SNR		Não		
108	09/01/2013	SR 1:8	positivo	Não		
115	10/01/2013	SNR		Não		
294	21/01/2013	SR 1:16		Não		
308	21/01/2013	SNR		Não		
340	22/01/2013	SR 1:2	positivo	Não		
360	22/01/2013	SNR		Não		
346	22/01/2013	SR 1:2	positivo	Não		
374	23/01/2013	SNR		Não		
393	23/01/2013	SR 1:32		Não		
394	23/01/2013	SNR		Não		
397	23/01/2013	SR 1:8		Não		
404	23/01/2013	SNR		Não		
513	20/01/2013	SR 1:2	positivo	Não		
518	30/01/2013	SNR		Não		
552	30/01/2013	SR 1:16		Não		
561	31/01/2013	SNR		Sim	Negativo	Negativo
604	04/02/2013	SFR	positivo	Não		
607	04/01/2013	SNR		Não		
617	04/01/2013	SR 1:4		Não		
624	04/01/2013	SNR		Não		
707	08/02/2013	SR 1:8		Não		
709	08/02/2013	SNR		Não		
792	19/02/2013	SR 1:8	positivo	Não		

793	19/02/2013	SNR		Não		
914	26/02/2013	SR 1:4	positivo	Não		
830	21/02/2013	SNR		Sim	Negativo	negativo
990	28/02/2013	SR 1:8	positivo	Não		
1005	01/03/2013	SNR		Não		
1117	08/03/2013	SR 1:32		Não		
1162	12/03/2013	SNR		Não		
1194	13/03/2013	SR 1:16		Não		
1200	13/03/2013	SNR		Não		
1280	18/03/2013	SR 1:4	positivo	Não		
1281	18/03/2013	SNR		Sim	Negativo	cistos de <i>E. histolytica</i> / <i>E. dispar</i>
1386	22/03/2013	SFR	Fra. Positivo	Não		
1391	22/03/2013	SNR		Não		
1523	03/04/2013	SR 1:2	Fra. Positivo	Não		
1536	03/04/2013	SNR		Não		
1548	03/04/2013	SR 1:8	positivo	Não		
1550	03/04/2013	SNR		Sim	Negativo	Negativo
1681	09/04/2013	SFR	Fra. Positivo	Não		
1684	09/04/2013	SNR		Sim	Negativo	Negativo
1701	09/04/2013	SR 1:8	positivo	Não		
1704	09/04/2013	SNR		Sim	Negativo	cistos de <i>Endolimax nana</i>
1702	09/04/2013	SR 1:4	positivo	Não		
1711	10/04/2013	SNR		Não		
1742	10/04/2013	SR 1:16		Não		
1743	10/04/2013	SNR		Não		
1821	15/04/2013	SR 1:8		Não		
1824	15/04/2013	SNR		Não		

1961	19/04/2013	SR 1:4	positivo	Não		
1969	24/04/2013	SNR		Não		
2001	24/04/2013	SFR	Fra. Positivo	Não		
2009	21/04/2013	SNR		Não		
2054	26/04/2013	SFR	Fra. Positivo	Não		
2083	29/04/2013	SNR		Sim	Negativo	negativo
2159	03/05/2013	SR 1:16		Não		
2161	03/05/2013	SNR		Não		
2251	08/05/2013	SR 1:2	positivo	Não		
2257	08/05/2013	SNR		Não		
2266	08/05/2013	SR 1:8	positivo	Não		
2268	08/05/2013	SNR		Não		
2330	10/05/2013	SR 1:4		Não		
2331	10/05/2013	SNR		Não		
2433	15/05/2013	SR 1:2		Não		
2448	15/05/2013	SNR		Não		
2508	20/05/2013	SFR	positivo	Não		
2521	20/05/2013	SNR		Não		
2702	28/05/2013	SR 1:4	positivo	Não		
2705	28/05/2013	SNR		Não		
2813	05/06/2013	SFR	positivo	Não		
2607	23/05/2013	SNR		Não		
2896	07/06/2013	SR 1:16		Não		
2900	10/06/2013	SNR		Sim	Negativo	negativo
2953	11/06/2013	SR 1:16		Não		
2954	11/06/2013	SNR		Não		
2974	12/06/2013	SR 1:2	positivo	Não		

2975	12/06/2013	SNR		Não
3198	21/06/2013	SR 1:16		Não
3199	21/06/2013	SNR		Não
3284	26/06/2013	SFR	Fra. Positivo	Não
3285	26/06/2013	SNR		Não
3359	01/07/2013	SR 1:4	positivo	Não
3366	02/07/2013	SNR		Não
3420	02/07/2013	SR 1:8	positivo	Não
3419	02/07/2013	SNR		Não
3422	03/07/2013	SFR	positivo	Não
3431	03/07/2013	SNR		Não
3428	03/07/2013	SFR	negativo	Não
3438	03/07/2013	SNR		Não
3651	10/07/2013	SR 1:32		Sim
				Negativo
				cistos de <i>Iodamoeba bustchilli</i>
3670	12/07/2013	SNR		Não
972	27/02/2013	SR 1:4		Não
981	28/02/2013	SNR		Não
3787	16/07/2013	SR 1:16		Não
3785	16/07/2013	SNR		Não
3819	17/07/2013	SR 1:2	positivo	Não
3827	17/07/2013	SNR		Não

\*Em vermelho estão destacadas as sorologias que foram positivas. Para todos os pacientes que apresentaram pedidos de exames parasitológicos foi utilizada a técnica de sedimentação espontânea.

