

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ENSP-FIOCRUZ



Daniela Leles de Souza

Diagnóstico paleoparasitológico molecular de *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758).

**Rio de Janeiro
2007**

**ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ENSP-FIOCRUZ**

Daniela Leles de Souza

Diagnóstico paleoparasitológico molecular de *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758).

Dissertação de Mestrado apresentada à
Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio
Arouca - Fundação Oswaldo Cruz
Orientador: Dr. Adauto José Gonçalves de
Araújo
Orientadora: Dra. Alena Mayo Iñiguez

**Rio de Janeiro
2007**

AGRADECIMENTOS

Ao professor Aduino Araújo pela amizade, incentivo à pesquisa, por sempre acreditar em mim e em nosso projeto e pelas valiosas contribuições.

À Dra. Alena Mayo Iñiguez por me ensinar biologia molecular e ajudar com as técnicas no trabalho, pelo apoio irrestrito e sugestões críticas durante sua realização.

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

À Koko Otsuki (Rosa) pela amizade e apoio técnico.

À Dra. Sheila Mendonça pelas sugestões críticas apontadas no trabalho.

Ao Dr. Sérgio Augusto de Miranda Chaves pelos trabalhos iniciados das análises palinológicas das amostras.

À equipe do laboratório do Centro de Saúde Germano Sinval Faria ENSP-FIOCRUZ por cooperar com as análises parasitológicas das amostras.

Aos colegas do Mestrado e laboratório pelas sugestões.

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

Às Instituições financiadoras dessa pesquisa: CNPq, CAPES, IOC-FIOCRUZ e FAPERJ.

Finalmente, aos meus familiares e pessoas queridas que mesmo não citadas nominalmente foram parte importante na conclusão do trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

Páginas

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Ascaris lumbricoides</i>	16
1.1.1 O parasito	16
1.1.2 Importância para saúde coletiva	16
1.1.3 Breve dados sobre a morfologia dos vermes adultos e ovos	17
1.1.4 Ciclo biológico	17
1.1.5 Distribuição geográfica	18
1.1.6 Patologia	18
1.1.7 Tratamento	19
1.2 Marcadores moleculares usados no diagnóstico de <i>Ascaris</i> sp	19
1.3 Paleoparasitologia	23
1.3.1 ADN antigo e coprólitos	26
1.3.2 Paleodistribuição de <i>Ascaris</i> sp	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Ensaio moleculares	30

3.1.1 Amostras fecais atuais	30
3.1.1.1 Amostras	30
3.1.1.2 Metodologia	32
3.1.2 Coprólitos experimentais	39
3.1.2.1 Preparação dos coprólitos experimentais	39
3.1.2.2 Metodologia	39
3.1.3 Material arqueológico	40
3.1.3.1 Cuidados prévios	40
3.1.3.2 Amostras	41
3.1.3.3 Metodologia	43
4 RESULTADOS	48
4.1 Amostras fecais atuais	48
4.2 Coprólitos experimentais	55
4.3 Material arqueológico	57
5 DISCUSSÃO	69
5.1 Diagnóstico molecular de <i>A. lumbricoides</i> em amostras fecais	69
5.2 Coprólitos experimentais	73
5.3 Diagnóstico paleoparasitológico molecular de <i>A. lumbricoides</i> em coprólitos	75
6 CONCLUSÕES	81
7 REFERÊNCIAS	83
8 ANEXOS	96
ANEXO 1 Figura 3. Paleodistribuição de <i>Ascaris lumbricoides</i> através de diagnóstico por microscopia ótica	97
ANEXO 2 Parecer do comitê de ética em pesquisa ENSP-FIOCRUZ	100

ANEXO 3 Termo de consentimento livre e esclarecido.....	101
ANEXO 4 Tabela 3: Perda de peso dos coprólitos experimentais ao longo do tempo	102
ANEXO 5 Tabela 5: Amostras arqueológicas segundo nossa codificação e tipo de material disponível para descontaminação por UV e remoção de superfície.....	103

ABSTRACT

Ascaris lumbricoides human infection is distributed all over the world. It is the most prevalent of all intestinal helminths. The same high prevalences seemed to have occurred in the past, as evidenced by paleoparasitological data. *A. lumbricoides* eggs are commonly found in Old World archaeological material. However, the findings of this parasite in pre-Columbian South American material are rare. The goal of this study is to establish a methodology to identify *A. lumbricoides* infection by DNA extraction from coprolites. Positive fresh samples for *A. lumbricoides* and/or other helminth eggs were used to establish a standard methodology. Sensitivity and specificity were tested using isolated *A. lumbricoides* eggs. Two treatments were used to DNA extraction from eggs: physical (boiling/freezing) and physical-chemical (boiling/freezing and phenol-chloroform). For fecal samples, four treatments were used: chemical (phenol-chloroform), commercial Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen), physical-chemical and physical-Kit (boiling/freezing and commercial Kit). Two molecular targets, the mitochondrial *cit b* and nuclear ITS 1, were used. Both treatments, physical and physical-chemical resulted in DNA amounts sufficient to yield PCR amplifications of a single egg using both molecular targets. The physical treatment was essential for DNA extraction from fecal samples. RFLP assay resulted in the profile described for *A. lumbricoides*. All the nucleotide sequences of *cit b* of the Brazilian isolates have the nucleotide T at position 5522, characteristic of *A. lumbricoides* species. For the region ITS 1, 4/5 nucleotide sequences correspond to the genotype G1, the most prevalent in humans. The first *A. lumbricoides* sequences found in South America were deposited in the GenBank. It is also the first time that molecular diagnosis is used for this parasite in fecal samples. The methodologies used were able to extract parasite DNA from experimental coprolites. Nucleotide sequences were not affected by experimental desiccation, as showed by RFLP and nucleotide sequencing. The strategies of reconstructive PCR and reamplification were essential for PCR amplifications, when applying in archaeological material. The paleoparasitological molecular diagnosis identified the parasite in five human coprolites collected in South American archaeological sites dated of pre-Columbian times. All five samples were negative under microscopic examination. All the 16 nucleotide sequences of *cit b* have the characteristic nucleotide of *A. lumbricoides* specie. The most ancient sequences recovered differ from the modern ones, excluding the possibility of contamination. The results of paleoparasitological molecular diagnosis changed the paleodistribution of the parasite, showing that *A. lumbricoides* infection was present since 8800 BP in South America, from the northeast of Brazil to north of Chile. For the first time was demonstrated the recovery of *A. lumbricoides* aDNA straight from coprolites.

RESUMO

O parasito humano *Ascaris lumbricoides* tem distribuição cosmopolita sendo o mais prevalente dos helmintos intestinais. Estudos paleoparasitológicos por microscopia ótica revelaram também que é um dos mais encontrados em material antigo. No entanto são raros os achados desse parasito na América do Sul pré-colombiana. O objetivo desse estudo foi estabelecer uma metodologia de diagnóstico paleoparasitológico molecular de *A. lumbricoides* que possa ser aplicado diretamente a ADN antigo extraído de coprólitos provenientes de sítios arqueológicos. Inicialmente a metodologia foi padronizada em amostras fecais atuais positivas para *A. lumbricoides* e/ou outros helmintos e ovos isolados a fim de testar a sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos. Aos ovos, dois tratamentos foram empregados na extração de ADN: físico (choque térmico) e físico-químico (choque térmico e fenol-clorofórmio). Para as amostras fecais foram usados quatro tratamentos: químico (fenol-clorofórmio), Kit comercial *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (Qiagen), físico-químico e físico-Kit (choque térmico e Kit comercial). Dois alvos moleculares, o mitocondrial cit b e o nuclear ITS 1, foram usados. Ambos os tratamentos físico e físico-químico disponibilizaram ADN suficiente para a PCR usando-se apenas um ovo para os dois alvos moleculares. O tratamento físico foi essencial para extração de ADN das amostras fecais. O ensaio do RFLP mostrou o perfil esperado para *A. lumbricoides*. Todas as seqüências nucleotídicas de cit b obtidas dos isolados brasileiros revelaram o nucleotídeo T na posição 5522 característico da espécie *A. lumbricoides*. Para região ITS 1, 4/5 seqüências nucleotídicas correspondem ao genótipo G1, o mais prevalente na espécie humana. Foram depositadas as primeiras seqüências de *A. lumbricoides* da América do Sul, assim como este é o primeiro diagnóstico molecular para esse parasito a partir de amostras fecais. As metodologias utilizadas mostram-se aptas em recuperar ADN do parasito a partir dos coprólitos experimentais. Os resultados do RFLP e sequenciamento nucleotídico mostraram que o processo de dessecação artificial não afetou as seqüências nucleotídicas. No trabalho com material arqueológico, as estratégias como PCR reconstrutiva e reamplificação foram essenciais para as amplificações. O diagnóstico paleoparasitológico molecular identificou o parasito em 5 amostras procedentes de sítios arqueológicos sul americanos datados do período pré-colombiano que o exame por microscopia ótica não havia diagnosticado. Todas as 16 seqüências nucleotídicas de cit b obtidas revelaram o nucleotídeo característico da espécie *A. lumbricoides*, sendo que a maioria das seqüências difere das modernas, afastando a possibilidade de contaminação. Os resultados do diagnóstico paleoparasitológico molecular mostraram uma mudança na paleodistribuição do parasito na América do sul, onde este se estende desde o nordeste de Brasil até o norte do Chile, sendo o achado mais antigo datado de 8800 AP. Pela primeira vez é feito diagnóstico molecular de *A. lumbricoides* diretamente de coprólitos.

1 INTRODUÇÃO

Ascaris lumbricoides (Linnaeus 1758) é um parasito de distribuição cosmopolita e, dentre os parasitos intestinais, é o mais prevalente na população mundial (O’Lorcain e Holland 2000, Lukes et al 2005), formando com *Trichuris trichiura* uma das associações parasitárias mais encontradas (Rey 2001). Juntamente com *T. trichiura* são os parasitos intestinais mais encontrados em material arqueológico através de diagnóstico por microscopia ótica, baseada na morfologia dos ovos (Szidat 1944, Jansen Jr e Over 1962, Aspöck et al 1973, Herman 1985, Reinhard et al 1987, Ferreira et al 1980, 1982, 1983, 1989, Jones e Nicholson 1988, Bouchet et al 1995, Domellier-Espejo 2001, Han et al 2003, Matsui et al 2003, Hidalgo-Argüelo et al 2003, Gonçalves et al 2003, Fugassa et al 2006). No entanto, são raros os achados de *A. lumbricoides* na América do Sul no período pré-colombiano (Patrucco et al 1983, Gonçalves et al 2003, Fugassa et al 2006). A ausência de caracteres morfológicos que distingam as espécies *A. lumbricoides* e *Ascaris suum* (Goeze 1782), parasito de suínos (*Sus scrofa* e *Sus domestica*), torna o diagnóstico em material arqueológico europeu, principalmente originado da Idade Média muito difícil (Loreille et al 2001, Loreille e Bouchet 2003). Esta foi uma época marcada pela carência de saneamento básico e promiscuidade com animais domésticos, em que os vestígios orgânicos de origem humana e de outros animais misturavam-se em estruturas como fossas e sarjetas, onde os detritos eram despejados (Loreille e Bouchet 2003).

Tradicionalmente o diagnóstico parasitológico para *Ascaris* sp é feito por microscopia ótica, pelo encontro de ovos do parasito através do exame direto das fezes. Segundo Rey (2001), esse exame permite o achado dos ovos em mais de 90% das amostras, podendo se aproximar de 100% quando usada à técnica de sedimentação espontânea (Lutz 1919).

Marcadores moleculares para diferenciar as espécies *A. lumbricoides* e *A. suum* foram propostos (Zhu et al 1999, 2000, Anderson 2001, Peng et al 2003, 2005). Apesar de existir diagnóstico molecular em amostras fecais para outros parasitos intestinais (Iñiguez et al 2002b, Verweij et al 2001, Traub et al 2004), não existe diagnóstico molecular para o altamente prevalente *A. lumbricoides* direto de material fecal.

Em relação a material arqueológico, existe um único trabalho de diagnóstico molecular com ovos de *Ascaris sp* isolados de sedimento arqueológico proveniente do sítio arqueológico de Places d'Armes em Namur, Bélgica, século XIV (Loreille et al 2001).

1.1 *Ascaris lumbricoides*

1.1.1 O parasito

Ascaris lumbricoides é um parasito intestinal do filo Nematoda, família *Ascarididae*, característico da espécie humana e de alguns outros primatas (*Pan troglodytes*, *Gorilla gorilla*, *Hilobates lar* e *Macaca mulatta*) (Rey 2001). Em suínos encontra-se a espécie *Ascaris suum*, muito semelhante morfológicamente a *A. lumbricoides* e tem-se discutido se estas espécies são realmente diferentes. Recentemente, marcadores moleculares mostraram que essas espécies têm maior afinidade por um ou outro hospedeiro, com genótipos diferentes mais prevalentes para cada espécie (Peng et al 2003, 2005).

1.1.2 Importância para saúde coletiva

Estima-se que esse parasito infecte 1/4 da população mundial, formando com *Trichuris trichiura* uma das associações parasitárias mais encontradas em todo mundo (O'Lorcain e Holland 2000, Rey 2001). *A. lumbricoides* pode representar um fator de risco para morbimortalidade principalmente em crianças mal nutridas que vivem em condições de

subdesenvolvimento (O’Lorcain e Holland 2000). Regiões endêmicas para infecção e que usam como fertilizantes fezes de suínos têm apontado interesse em entender a epidemiologia da infecção, pois infecções cruzadas entre as espécies de humanos e suínos já foram registradas, o que pode representar um problema potencial para os programas de controle da ascaríase (doença causada pelo parasito *A. lumbricoides* no homem) (O’Lorcain e Holland 2000, Rey 2001, Anderson 2001, Peng et al 2003, 2005, 2006). Tem-se observado, assim como em outras espécies animais, resistência a anti-helmínticos em suínos (Anderson 2001, Coles et al 2006). Se a espécie humana infecta-se com o parasito de suínos, casos de resistência a drogas anti-helmínticas de amplo espectro podem estar acontecendo, dificultando assim o tratamento da verminose (Anderson 2001).

1.1.3 Breve dados sobre a morfologia dos vermes adultos e ovos

Ascaris sp são vermes longos, cilíndricos e com extremidades afiladas. As fêmeas são maiores que os machos medindo de 200 - 350 mm de comprimento e de 3 - 6 mm de circunferência, tendo a parte posterior retilínea ou ligeiramente encurvada. Os machos medem de 150 - 300 mm de comprimento e 2 - 4 mm de circunferência, tendo a extremidade caudal encurvada (O’Lorcain e Holland 2000, Rey 2001). Esse tamanho pode variar de acordo com o número de parasitos que o hospedeiro alberga; quanto mais parasitos menores são em tamanho (Rey 2001). Ovos férteis medem entre 60 e 70 μm de comprimento por 40 -50 μm de largura, possuindo uma casca composta de quatro camadas, muito resistente a condições adversas (O’Lorcain e Holland 2000, Quilès et al 2006).

1.1.4 Ciclo biológico

A infecção é contraída via fecal/oral, através da ingestão de ovos férteis eliminados com as fezes humanas. A formação da larva dos ovos férteis se dá no meio externo e as

condições ótimas de temperatura para sua formação são de 20 - 30°C que requer mais uma semana para sofrer a primeira muda e se tornar infectante. Após ingestão desses ovos há eclosão das larvas de segundo estágio que irão ganhar a mucosa intestinal e penetrar na circulação sanguínea ou linfática aonde chegarão ao coração e serão levadas ao pulmão, onde sofrerão a segunda muda. As larvas, agora de terceiro estágio e com sexo já reconhecível, ganham os alvéolos pulmonares e realizam a terceira muda. As larvas de quarto estágio chegam aos bronquíolos onde são arrastadas juntamente com o muco pelos movimentos ciliares da mucosa, então sobem pela traquéia e laringe para finalmente serem deglutidas com as secreções brônquicas e alcançarem o estômago e intestino. Já no intestino as larvas sofrem a quarta e última muda que as transformam em adultos jovens, ao final de dois meses e meio as fêmeas começam a ovipor (Rey 2001).

1.1.5 Distribuição geográfica

A. lumbricoides é um parasito de distribuição cosmopolita, ocorrendo em países de ambiente temperado e tropical. Altas prevalências de *Ascaris* sp estão relacionadas principalmente a condições de subdesenvolvimento e falta de saneamento básico e/ou fatores ligados ao tipo de agricultura. Estima-se que 73% das infecções por *A. lumbricoides* estejam na Ásia, 12% na África e 8% na América Latina (O’Lorcain e Holland 2000).

1.1.6 Patologia

Na maioria das vezes a ascariase é assintomática, não trazendo maiores complicações (Rey 2001). A ação patogênica pode ser desenvolvida durante a migração das larvas, onde podem ocorrer hemorragias, pneumonia difusa ou lobar e crises de asma (Rey 2001). Já no intestino os sintomas mais comuns são dores abdominais, náuseas, perda de apetite, emagrecimento e irritabilidade (O’Lorcain e Holland 2000). Casos mais graves estão

relacionados à localização ectópicas dos vermes e grandes cargas parasitárias que podem causar obstrução intestinal havendo necessidade de intervenção cirúrgica (Rey 2001). Porém, esses casos são muito raros e acometem na maioria das vezes crianças que se apresentam mal nutridas e com outros problemas associados (Rey 2001).

1.1.7 Tratamento

A maioria dos antihelmínticos é eficaz contra esse parasito, tais como pirantel, mebendazol, levamisol e piperazina (Rey 2001). No entanto, a diminuição da prevalência, não só de *Ascaris lumbricoides* como de outros parasitos intestinais, está mais associada às melhorias no saneamento básico que vêm ocorrendo ao longo dos anos (Simões 2002).

1.2 Marcadores moleculares usados no diagnóstico de *Ascaris sp*

Estudos moleculares propõem o uso de múltiplos marcadores moleculares, nucleares e mitocondriais para a caracterização molecular de *Ascaris sp* (Anderson 2001).

As mitocôndrias estão envolvidas na fosforilação oxidativa do metabolismo respiratório da maioria dos eucariotos e seu genoma está presente em múltiplas cópias por organela. Os genomas mitocondriais diferentemente dos nucleares são pequenos, aproximadamente 13-26 Kb, circulares, compactos e haplóides. Eles contêm de 12 a 13 genes protéicos (*cox1-3*, *nad1-6*, *nad4L*, *cob*, *atp6* e/ou *atp8*), dois genes ribossomais, 22 genes transportadores (Figura 1) (Hu e Gasser 2006).

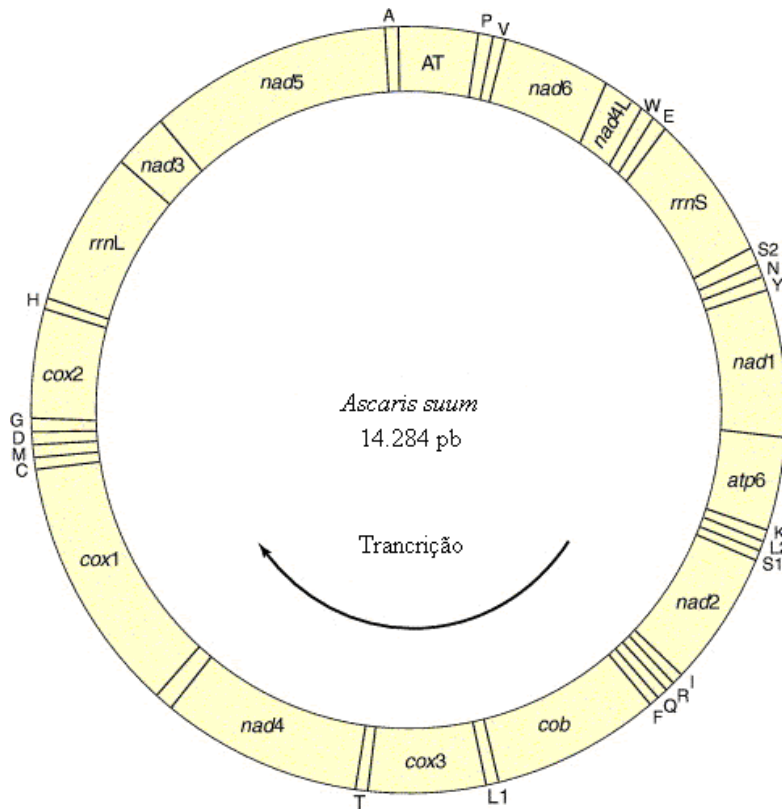


Figura 1. Genoma mitocondrial de *Ascaris suum*. Forma circular e tamanho de 14.284 pb (número de acesso no Genbank X54253). Contêm 12 genes protéicos (*cox1-3*, *nad1-6*, *nad4L*, *cob*, *atp6*), dois genes ribossomais, 20 genes transportadores. A seta indica o sentido da transcrição.
 Fonte: modificado de Hu e Gasser 2006 e Okimoto et al 1992.

Mais de 696 genomas mitocondriais de organismos metazoários foram seqüenciados e estão disponíveis no GenBank (Banco internacional de seqüências) e EBI (Instituto de Bioinformática Europeu), no entanto menos de 2% desses pertencem a nematóides e apenas doze espécies de nematóides parasitos têm o genoma completo seqüenciado (Lukes et al 2005, Hu e Gasser 2006); *Ascaris suum* foi o primeiro deles (Okimoto et al 1992). Genomas mitocondriais têm sido propostos como importante ferramenta no fornecimento de informações acerca de genética de populações, estudos de sistemática e evolução (Hu e Gasser 2006).

Marcadores mitocondriais como citocromo c oxidase subunidade 1 (*cox1*) e NADH desidrogenase subunidade 1 (*nad1*), foram usados para caracterizar haplótipos de *Ascaris sp* em hospedeiro humano e animal, e verificar a ocorrência de fluxo gênico. Em seis províncias

chinesas, 720 vermes adultos de *Ascaris* sp foram coletados de humanos e suínos. Para *cox1*, 10 diferentes haplótipos *Ascaris* sp foram encontrados no hospedeiro humano e 10 em suínos, sendo apenas um deles comum entre as espécies humana e suína. Para *nad1*, 11 diferentes haplótipos de *Ascaris* sp foram encontrados no hospedeiro humano e 15 em suínos. Esses marcadores mostraram grande poder de distinção das espécies *A. suum* e *A. lumbricoides*, agrupando haplótipos bem mais prevalentes em um ou outro hospedeiro, concluindo haver mínimo fluxo gênico entre as espécies (Peng et al 2005).

Um fragmento de 142 pb do gene mitocondrial citobromo b (*cit b*), foi usado para recuperação de ADN antigo de ovos isolados de coprólitos. No entanto, na porção, analisada apenas uma diferença nucleotídica foi observada (Loreille et al 2001).

Os genes ribossomais presentes no genoma nuclear têm sido amplamente usados como marcadores moleculares em estudos filogenéticos de nematódeos, pois são estruturas presentes em todos os organismos e retêm informações cruciais aos mesmos (Blaxter et al 1998, Dorris et al 1999). Esses genes estão presentes em múltiplas cópias no genoma (Dorris et al 1999). A pequena subunidade 18S (SSU 18S) de aproximadamente 1700 pb é altamente conservada entre os organismos, o que faz dessa região a mais utilizada nos estudos filogenéticos de nematóides (Blaxter et al 1998, Dorris et al 1999). No entanto, para organismos que divergiram há pouco tempo na escala evolutiva, esse passa a não ser o melhor alvo molecular (Dorris et al 1999). Para esse tipo de organismos a região espaçadora transcrita interna aos genes RNA ribossomais (rRNAs) e região terminal não transcrita têm sido usadas (Figura 2) (Dorris et al 1999).

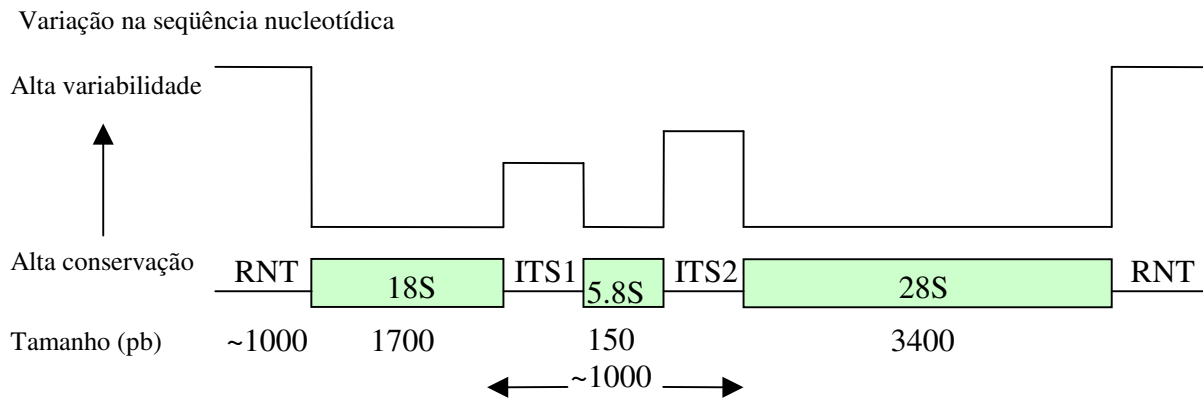


Figura 2: Esquema dos genes rRNA e regiões espaçadoras da maioria dos nematóides. Legenda: ITS 1 e 2 região espaçadora interna transcrita 1 e 2; RNT região terminal não transcrita; 18S, 5.8S e 28S genes rRNA 18S, 5.8S e 28S respectivamente. Fonte: modificado de Dorris et al 1999.

Existe uma variabilidade genética nas regiões ITS 1 e ITS 2 de nematóides da família Ascaridae, porém a região ITS 2 não é um bom alvo molecular para diferenciar as espécies *A. lumbricoides* e *A. suum*, pois não apresentou nenhuma diferença nucleotídica entre as espécies (Zhu et al 2000). Os estudos envolvendo a região ITS 1 assim como os alvos mitocondriais têm encontrado diferentes genótipos que são mais característicos de um ou outro hospedeiro (Peng et al 2003, 2005). Para região ITS 1, cinco genótipos foram encontrados em estudos envolvendo 815 vermes adultos provenientes da espécie humana e suína de diferentes províncias chinesas (Peng et al 2003). O genótipo classificado como G1 foi o mais prevalente na espécie humana (69,5%), o G3 foi mais prevalente em suínos (82,4%). Outros genótipos classificados como G4 e G5 foram encontrados somente na espécie humana, mas com prevalência muito baixa (0,4 e 0,6% respectivamente). Já o genótipo G2 não mostrou ter afinidade maior por um ou outro hospedeiro, sendo a porcentagem dos achados próxima na espécie humana e suína (25,5% e 15,2% respectivamente) (Peng et al 2003).

Embora à região ITS 1 apresente menor número de genótipos e diferenças nucleotídicas quando comparada aos alvos mitocondriais *nad1* e *cox1*, ambos os alvos nuclear e mitocondriais têm corroborado seus resultados (Peng et al 2005).

1.3 Paleoparasitologia

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

Os primeiros parasitos recuperados em material antigo provêm dos estudos de Sir Marc Armand Ruffer no início do século 20, que descreveu ovos de *Schistosoma haematobium* nos rins de múmias egípcias datadas de 3.200 AP (Antes do Presente) (Ruffer 1910).

Somente no ano de 1960, com o desenvolvimento da técnica de reidratação em fosfato trissódico desenvolvida por Callen e Cameron baseada na técnica para recuperar espécimes dessecados em coleções de museus, os horizontes da paleoparasitologia seriam ampliados. A partir de então, os coprólitos (fezes fossilizadas) que passaram por processo de dessecação poderiam ser estudados, permitindo o uso de técnicas parasitológicas comumente empregadas nos laboratórios clínicos (Gonçalves et al 2002a).

No Brasil, os primeiros resultados dessa linha de pesquisa foram apresentados no Congresso Brasileiro de Parasitologia em 1979, onde se instituiu o termo Paleoparasitologia para essa linha de pesquisa (Ferreira et al 1979). Os achados de ovos de *T. trichiura* e ancilostómídeos em material datado de período pré-colombiano em sítios arqueológicos brasileiros trariam questionamentos importantes a despeito da rota de introdução desses parasitos e conseqüentemente da própria espécie humana (Araújo 1980). O modelo clássico de povoamento pré-colombiano das Américas propõe como rota de migração o Estreito de Bering. No entanto, a região fria da Beringia funcionaria como um filtro na manutenção desse

parasito ao longo das gerações de seus hospedeiros, já que são parasitos com passagem obrigatória pelo solo e que para se tornarem infectantes necessitam de temperaturas muito mais altas que as alcançadas na região da Beringia (Araújo 1980).

Com desenvolvimento da técnica de Jones (1983) utilizando ácido clorídrico 10%, coprólitos que passaram pelo processo de fossilização por mineralização como a maioria dos materiais paleontológicos, poderiam agora ser estudados ampliando ainda mais o campo da paleoparasitologia. Larvas de nematóides foram encontradas em coprólitos animais datados de aproximadamente 1.500.000 AP (Ferreira et al 1993) e ovos de *Toxocara canis* foi observado em coprólito de hiena datado de 300.000 a 500.000 AP (Bouchet et al 2003).

A paleoparasitologia tem demonstrado que vários são os parasitos que acometiam a humanidade e outras espécies animais em tempos passados, assim como tem ajudado a compreender o comportamento e paleodistribuição das endemias e zoonoses que acometiam esses povos (Araújo et al 2003).

Segundo a revisão de Gonçalves et al (2003), os estudos paleoparasitológicos que usaram microscopia ótica identificaram os seguintes parasitos intestinais no Velho Mundo: *Ancilostomídeos*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Strongyloides stercoralis*, *Fasciola spp*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium spp*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Clonorchis sinensis*, *Taenia spp*, *Taenia solium*, *Diphyllobothrium spp*, *Diphyllobothrium D. latum*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia duodenalis*, *Chilomastix mesnili*. E no Novo Mundo foram encontrados: *Ancilostomídeos*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Trichostrongylus spp*, *Paragonimus sp*, *Diphyllobothrium spp*, *Diphyllobothrium pacificum*, *Hymenolepis sp*, *Hymenolepis nana*, *Acanthocephala*, *Entamoeba spp*, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* e *Sarcocystis hominis*.

A paleoparasitologia tem feito inferências da existência de determinado parasito através da sua visualização direta ou vestígios deixados por ele como os ovos de parasitos intestinais (Gonçalves et al 2002a, Araújo et al 2003). Também através de evidências indiretas, como lesões ósseas deixadas por determinada infecção, no entanto com caráter menos espécie-específico que as evidências diretas (Lessa e Guidon 2002); e ainda pela correlação com evidências paleoambientais e comportamentais como estilo de vida, tipo de dieta, habitação dentre outros (Chaves e Reinhard 2003, 2006).

Os avanços das técnicas diagnósticas (imunológicas, moleculares dentre outras) têm permitido a detecção de parasitos, quando suas dimensões não permitem visualização por microscopia ou quando os vestígios que permitiriam sua identificação foram destruídos por processos tafonômicos (Gonçalves et al 2002a, Drancourt e Raoult 2005, Iñiguez et al 2006).

Diagnóstico imunológico tem sido aplicado em material arqueológico, através de teste do tipo ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Gonçalves et al (2002b) identificaram *Giardia duodenalis* em coprólitos com mais de 2.000 anos. Kolman e colaboradores (1999) identificaram pelo teste ELISA vestígios de *Treponema pallidum* em ossos provenientes da Ilha de Páscoa com datação de 200 AP.

As ferramentas de diagnóstico molecular muito têm contribuído no campo da paleoparasitologia, pois permitem a recuperação de ADN antigo (ADNa) (Araújo et al 1998, Ferreira et al 2000, Loreille et al 2001, Iñiguez et al 2002a, 2006), que em sentido mais amplo pode ser definido como qualquer massa ou traço de ADN originado de um organismo morto ou de parte deste (Herrmann e Hummel 1994); ou para referir-se a fragmentos de ADN encontrados em materiais biológicos preservados e/ou fossilizados (Brown e Brown 1994).

Em revisão feita por Drancourt e Raoult (2005) que validaram os trabalhos que recuperaram ADNa de parasitos adequadamente, vários são os estudos de paleoparasitologia molecular que têm recuperado ADN antigo dos mais diversos microorganismos:

Mycobacterium tuberculosis (Zink et al 2003), *M. leprae* (Spigelman e Donoghue 2001), bactérias entéricas (Zink et al 2000), *Treponema pallidum* (Kolman et al 1999), *Borrelia burgdorferi* (Mutuschka et al 1996), *Bartonella quintana* (Drancourt et al 2005), *Bartonella henselae* (La et al 2004), *Yersinia pestis* (Drancourt et al 2004) , *Plasmodium falciparum* (Sallares e Gomzi 2001), *Trypanosoma cruzi* (Aufderheide et al 2004), *Enterobius vermicularis* (Iñiguez et al 2002b).

1.3.1 ADN antigo e coprólitos

ADN antigo tem sido recuperado de diversos tipos de material: tecidos, ossos, dentes, coprólitos, dentre outros (Drancourt e Raoult 2005). Muitos são os fatores que podem influenciar o sucesso da recuperação de ADN ancestral. Esses fatores vão desde os critérios de autenticidade propostos nos trabalhos com ADN no intuito de descartar a possibilidade de contaminação com ADN moderno até o alvo molecular a ser escolhido, bem como a metodologia adotada.

Uma das técnicas mais utilizadas em paleoparasitologia molecular é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) descrita por Saiki et al 1985 e Mullis e Fallona 1987, por aumentar em milhões de cópias o alvo molecular. Os alvos moleculares de múltiplas cópias são escolhidos por aumentarem as chances de recuperação da seqüência nucleotídica pretendida (Pääbo 1990, Handt et al 1996, Iñiguez 1998 e 2002b).

Os coprólitos apresentam particularmente uma série de inibidores que podem impedir a amplificação do ADN (Hööss et al 1996, Poinar et al 1998 e 2001, Hofreiter et al 2001, Iñiguez et al 2002a, 2002b). Porém, ao longo do tempo esses problemas têm sido superados por meio de estratégias que vão desde a etapa da extração do ADN até a amplificação (Iñiguez et al 2002a, 2002b, 2006).

Embora cada vez mais estudos de ADNa estejam sendo realizados, ainda é raro trabalhos de extração de ADNa de parasitos intestinais. O primeiro estudo foi feito por Loreille et al (2001), que recuperaram ADNa de *Ascaris* sp material de latrina do século XIV, proveniente do sítio arqueológico de Places d'Armes em Namur, Bélgica. Nesse estudo foi extraído ADNa de 100-300 ovos isolados de *Ascaris* sp usando ultrasonicação combinada com o método fenol-clorofórmio e como alvos moleculares, fragmento do gene mitocondrial *cit b* e região nuclear 18S. Iñiguez et al (2006), trabalhando diretamente com coprólitos pré-colombianos, tanto da América do Norte quanto do Sul, datados de 4110 AC- 900AD (Antes de Cristo – Ano Domini), recuperaram ADNa de *Enterobius vermicularis* usando como alvo molecular a região espaçadora 5S rRNA.

1.3.2 Paleodistribuição de *Ascaris* sp

Provavelmente pelo mecanismo de transmissão, metabolismo semelhante, ocupação de nichos muito próximos, número de ovos eliminados por dia nas fezes (cerca de 10 mil para *T. trichiura* e 200 mil para *A. lumbricoides*) e ainda a resistência de seus ovos *A. lumbricoides* e *T. trichiura* assim como atualmente, também são os parasitos mais encontrados em material arqueológico no Velho Mundo através do diagnóstico por microscopia ótica (Gonçalves et al 2003, Leles 2004). Até o momento, o achado mais antigo para *Ascaris* sp pertence ao sítio Arcy-sur-Cure, França datado de 30.000 anos (Loreille e Bouchet 2003). O estudo sugeriu a presença da espécie *A. lumbricoides*, pois não foram encontrados restos de suíno na caverna. Inferiu-se também que homínídeos infectaram os suínos após sua domesticação, em virtude de seus hábitos coprofágicos.

A associação *A. lumbricoides* e *T. trichiura* vem de longa data, sendo o registro mais antigo pertencente ao sítio arqueológico Kruger Cave na África do Sul (\pm 10 000 AP), embora

haja incerteza quanto à origem do material (Evans et al 1996). No entanto, quando se observa períodos de tempo e localidades específicas no passado, a distribuição desses parasitos se apresenta de maneira distinta. No período pré-colombiano achados de *A. lumbricoides* são raros na América do Sul (Gonçalves et al 2003, Leles 2004). O achado mais antigo está datado de 2277 AC \pm 181 em Huarmey Valley, Peru (Patrucco et al 1983), seguido do achado pertencente ao sítio arqueológico Gruta do Gentio II, Brasil datado de 3490 \pm 120 – 430 \pm 70 AP (Gonçalves et al 2003). Achados de ovos de *Ascaris* sp em sedimento arqueológico, contidos em cavidade pélvica estomacal de restos humanos recuperados no distrito El Potrero de Santa Lucía, Andalgalá-Catamarca, Argentina datados de 470 \pm 200 AC a 310 \pm 90 AD também foram relatados (Pau et al 2005). No entanto, esses achados são inexpressivos em número, se comparados aos achados de *T. trichiura* (ANEXO 1, Figura 3) (Gonçalves et al 2003; Leles 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Padronizar uma metodologia de diagnóstico paleoparasitológico molecular para *A. lumbricoides* a partir de coprólitos e/ou sedimentos provenientes de sítios arqueológicos.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar uma metodologia de diagnóstico molecular por PCR, RFLP e seqüenciamento nucleotídico para *A. lumbricoides* em material fecal.
- Adequar e aplicar a metodologia padronizada aos coprólitos experimentais de *A. lumbricoides*.
- Recuperar e diagnosticar ADN antigo de *A. lumbricoides* em coprólitos humanos e/ou sedimentos provenientes de sítios arqueológicos do continente europeu e americano.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensaios moleculares

Os ensaios moleculares foram realizados no Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos (LGMM) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e no Laboratório de ADN antigo, anexo ao LGMM. O trabalho foi iniciado com ovos isolados de fezes de origem humana positivas para *A. lumbricoides*. As regiões intergênicas ITS 1 e cit b foram selecionadas como alvos moleculares para o diagnóstico por apresentarem maior número de cópias no genoma e por suas seqüências estarem depositadas no GenBank. Além disso, estudos com a região ITS 1 têm mostrado que esta região diferencia as espécies *A. lumbricoides* e *A. suum* (Zhu et al 1999, Peng et al 2003). Inicialmente a metodologia foi padronizada ao trabalho com ADN extraído de fezes, tentando superar os problemas de inibições da reação em cadeia da polimerase e da baixa qualidade e concentração de ADN. A metodologia foi aplicada e adaptada à coprólitos experimentais, visando à recuperação e amplificação de ADN do parasito submetido à dessecação artificial, e posteriormente a metodologia padronizada nos coprólitos experimentais foi aplicada às amostras antigas, com modificações.

3.1.1 Amostras fecais atuais

3.1.1.1 Amostras

Dezesseis amostras fecais positivas ao exame parasitológico para *A. lumbricoides* e/ou outros helmintos pelo método modificado de Kato-Katz (Kato 1960, Katz et al 1972), e de sedimentação espontânea (Lutz 1919) foram obtidas no Centro de Saúde Germano Sinval Faria

ENSP/FIOCRUZ. Foram usados como controles positivos ovos isolados de fezes humanas positivas para *A. lumbricoides*. Este projeto foi aprovado pelo comitê de ética da ENSP/FIOCRUZ (ANEXO 2) e termo de consentimento livre e esclarecido foi entregue aos pacientes (ANEXO 3). Todas as amostras e sedimentos eram frescos, sem adição de nenhum tipo de solução de conservação, exceto a amostra DL18 (Tabela 1) conservada pelo período de aproximadamente 20 anos em MIF (Mertiolato, Iodo, Formol), procedente do Sul de Minas Gerais, cedida pela Universidade Federal de Alfenas – MG (UNIFAL – MG).

Inicialmente as amostras foram codificadas, fotografadas em câmera digital Nikon Cool PI X 5000 acoplada a microscópio óptico Nikon E200 Eclipse (Figura 4 A e B). As informações pertinentes a elas registradas em protocolo próprio de trabalho (Tabela 1). As amostras fecais e, quando disponível o sedimento, foram imediatamente estocadas a -20°C . Quando o sedimento não estava disponível ou em quantidades insuficientes para trabalho, fez-se sedimentação espontânea das fezes, segundo a técnica de Lutz (1919).

Tabela 1: Amostras fecais (n=16) usadas nos ensaios moleculares.

Amostras	Parasitas encontrados
DL01	<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>
DL02	<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>
DL03	<i>A. lumbricoides</i>
DL04	<i>A. lumbricoides</i>
DL05	<i>A. lumbricoides</i>
DL06	<i>A. lumbricoides</i> e <i>E. vermicularis</i>
DL07	<i>T. trichiura</i>
DL08	<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>
DL11	<i>T. trichiura</i>
DL12	<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>
DL13	<i>A. lumbricoides</i>
DL14	<i>A. lumbricoides</i>
DL15	<i>A. lumbricoides</i>
DL16	<i>A. lumbricoides</i>
DL17	<i>A. lumbricoides</i>
DL18	<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>

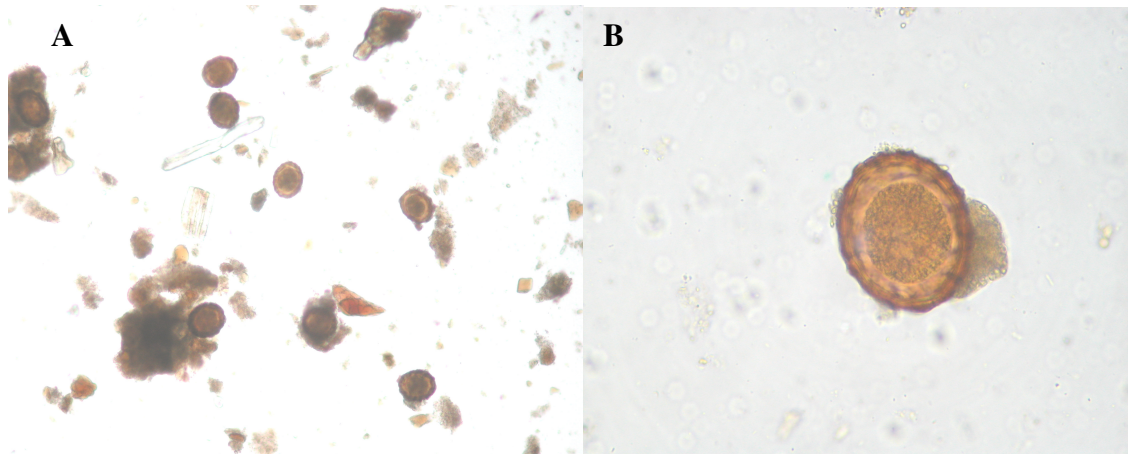


Figura 4 A e B: A - Ovos de *Ascaris lumbricoides*, em aumento de 10X (amostra DL01); B - Ovo de *Ascaris lumbricoides* em aumento de 40X (amostra DL13).

3.1.1.2 Metodologia

a) Sensibilidade e Especificidade

Após sedimentação espontânea das amostras fecais, números diferentes de ovos (80, 50, 30, 10, 5 e 1) foram isolados com auxílio de microscópio ótico Nikon E200 eclipse e microscópio estereoscópio Carl Zeiss DL0603 e colocados em água Milli-Q esterilizada (1, 5 e 10 ovos em 6µl H₂O e 30, 50 e 80 em 50µl H₂O).

Amostras positivas para *A. lumbricoides* e *Trichuris trichiura*, *A. lumbricoides* e *E. vermicularis* e amostras positivas somente para *A. lumbricoides* ou *T. trichiura* foram usadas para se testar a especificidade do diagnóstico molecular (Tabela 1).

b) Extração do ADN

Ovos

Dois tratamentos foram aplicados: físico e físico-químico. No tratamento físico as amostras foram submetidas a choque térmico por 5 vezes, banho-maria fervente (100°C) por 5

minutos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. No tratamento físico-químico, após o tratamento físico adicionou-se às amostras 400µl de tampão de digestão (10mM NaCl; 10mM Tris HCl pH 8.0; 2mM EDTA), 100µl SDS 10%, 20µl DTT 1M e 1.2mg proteinase K (modificado de Iñiguez et al 2002a). A reação foi incubada em shaker por 12 horas a 55-60°C. O ADN foi extraído pelo método fenol-clorofórmio sem precipitação, seguido de purificação em colunas Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

Amostras fecais

Após sedimentação espontânea 150µl do sedimento foi usado para extração do ADN pelo tratamento químico e físico-químico descrito para os ovos, exceto na última etapa de extração do ADN pelo método fenol-clorofórmio, onde a 200µl da fase clorofórmio foi adicionado 130µl de água Milli-Q esterilizada para início da purificação. Adicionalmente, usou-se o Kit comercial para extração de ADN a partir de amostras fecais - *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (Qiagen) segundo protocolo recomendado pelo fabricante ou com modificações. As mudanças no protocolo foram: tratamento físico das amostras prévio à extração, incubação da reação com proteinase K por 4 horas a 55-60 °C com movimentação e eluição final em 100µl de solução de eluição do Kit.

c) Quantificação do ADN e eletroforese em gel de agarose

O ADN foi quantificado em espectrofotômetro (*Gene Quant RNA/DNA Calculator II Pharmacia Biotech*) por absorvância no comprimento de onda 260nm. O ADN foi submetido à eletroforese em gel de agarose pelo procedimento descrito em Sambrook et al (1989). A agarose foi dissolvida em tampão TAE 1X na concentração final de 1 %. As alíquotas de 10µl da amostra e do marcador de peso molecular foram adicionadas 2µl de tampão de corrida (0,25% azul de

Bromo Fenol, 0,25% Xileno Cianol, 15% Ficoll). As amostras foram submetidas à eletroforese em tampão de corrida TAE 1X sob uma corrente de 75-40 v, posteriormente coradas com brometo de etídio e visualizadas em transluminador UV (Image Master®VDS-Pharmacia Biotech), documentando-se com fotografias para certificação da qualidade do ADN extraído.

d) PCR

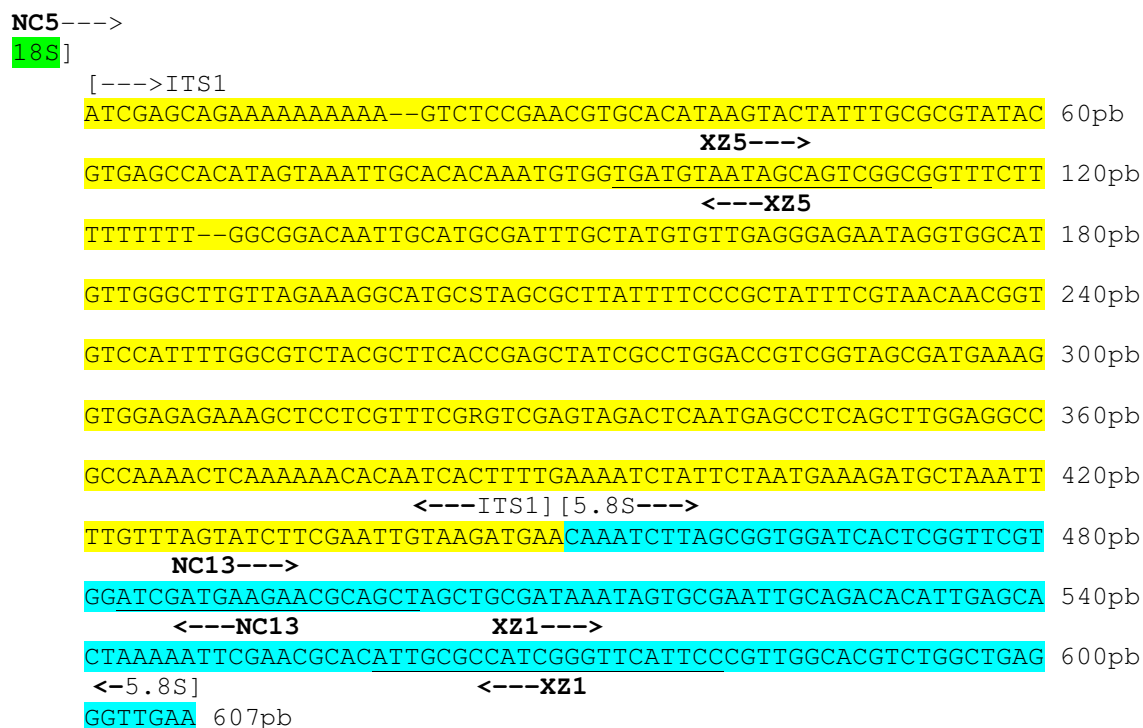
Alvo molecular *Ascaris* sp

Na PCR foram usados oligonucleotídeos previamente descritos na literatura para regiões intergênicas dos genes ribossomais 18S rRNA - 5,8S rRNA (ITS 1) de nematódeos, assim como oligonucleotídeos específicos para região ITS 1 de *A. lumbricoides*/*A. suum* e fragmento do gene mitocondrial cit b de alguns nematódeos (Tabela 2, Figura 5).

Tabela 2: Descrição dos oligonucleotídeos usados no estudo.

Nome dos oligonucleotídeos e combinações	Seqüências	Tamanho dos produtos da PCR para <i>A. lumbricoides</i>	Referências
ITS 1			
NC5 forward NC13 reverse	5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3' 5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3'	527 pb	Zhu et al, 1999
NC5 forward XZ5 reverse	5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT-3' 5'-CGCCGACTGCTATTACATCA-3'	139 pb	Zhu et al, 1999
XZF forward NC13 reverse	5'-TGATGTAATAGCAGTCGGCG-3' 5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3'	407 pb	Zhu et al, 1999
XZ5 forward XZ1 reverse	5'-TGATGTAATAGCAGTCGGCG-3' 5'-GGAATGAACCCGATGGCGCAAT-3'	480 pb	Zhu et al, 1999
cit b			
CCRB-Asc1 forward CCRB-Asc2 reverse	5'-GTTAGGTTACCGTCTAGTAAGG-3' 5'-CACTCAAAAAGGCCAAAGCACC-3'	142 pb	Loreille et al, 2001

Figura 5: Esquema de pareamento dos oligonucleotídeos usados nas PCRs para região ITS 1 de *Ascaris lumbricoides* (modificado de Zhu et al 1999).



Legenda:

gene 18S rRNA região intergênica ITS 1 gene 5.8S rRNA

A reação da PCR foi realizada em volume final de 50µl (10X de Tampão: 200mM Tris - HCl, 500mM KCl - Invitrogen, pH 8.4; 3mM MgCl₂; 0.4mM do mix de dNTP; 200ng de cada oligonucleotídeo); 2.5 U de *Taq* polimerase *Platinum*; 25-80ng de ADN das amostras. Eventualmente usamos 2.5 U de *Taq* polimerase (Promega). Todas PCRs foram acompanhadas de controles negativos (todos os reagentes menos o ADN da amostra) e um controle positivo, ADN extraído de ovos de *A. lumbricoides* isolados de amostras fecais. As reações foram submetidas em termociclador programável (PTC 100 60 v, MJ Research, Inc) a um ciclo inicial de 10 minutos a 94°C, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos para amplificação do fragmento cit b (Tabela 2). Para região ITS 1 utilizou-se

um ciclo inicial de 7 minutos a 96 °C seguido de 40 ciclos de 96°C por 40 segundos, 55°C ou 60°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto e 15 segundos ou 40 segundos dependendo do tamanho do alvo. Alternativamente semi-nested PCR da região ITS 1 foi feito com diferentes combinações de oligonucleotídeos.

Os produtos da PCR de tamanho entre 500 – 400 pb foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e os entre 120 - 150 pb em gel de agarose 3% e em seguida foram corados com brometo de etídio, visualizados em transluminador UV (Image Master®VDS-Pharmacia Biotech) e fotografados segundo procedimento já descrito 3.1.1.2 c).

Alvo molecular humano

Adicionalmente, fez-se PCR para ADN mitocondrial humano para verificar a presença de inibidores da reação do PCR. Outra alternativa utilizada foi adicionar ADN sabidamente amplificável nas amostras que não amplificavam e posteriormente realizar a PCR a fim de determinar a presença de inibidores nas amostras negativas para a PCR. O alvo molecular foi um pequeno segmento intergênico situado entre o gene citocromo oxidase II (*cox II*) e o gene que codifica para lisil tRNA (Pääbo et al 1990). Os oligonucleotídeos usados foram A forward: 5'-ATGCTAAGTTAGCTTTACAG-3' e C reverse: 5'- ATTCCCCTAAAAATCTTTGA-3' que amplificam um fragmento de 92 pares de base. A reação da PCR foi realizada em volume final de 50µl (10X de Tampão: 200mM Tris -HCl, 500mM KCl - Invitrogen, pH 8.4; 3 mM MgCl₂; 0.4mM do mix de dNTP; 400ng de cada oligonucleotídeo); 2.5 U de *Taq* polimerase *Platinum*; 25 - 80ng de ADNa das amostras. As reações foram submetidas a um ciclo inicial de 5 minutos a 96°C, seguido de 35 ciclos 96°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos em termociclador programável (PTC 100 60v, MJ Research).

e) Sequenciamento nucleotídico e análise das seqüências nucleotídicas

Os produtos amplificados da PCR foram purificados em colunas Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Estes foram diretamente seqüenciados usando Kit comercial Big Dye Terminator v 3. 1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). As amostras foram seqüenciadas em ambas as fitas em seqüenciador automático (3100 Applied Biosystems) como descrito pelo fabricante. Os programas Chromas versão 1.45 (School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia) e BioEdit Sequence Alignment versão 5.0.9 (Department of Microbiology, North Carolina State University, USA) foram usados na edição e análise das seqüências nucleotídicas. Estas foram comparadas a todas as seqüências de *A. lumbricoides* e *A. suum* depositadas no Genbank (access number: AJ000895-6, AJ5536-43, AB110019-23 e X54253).

f) Polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

Os produtos da região ITS 1 vindos da PCR-semi-nested de 407pb (Tabela 2) foram digeridos com 1U da enzima de restrição *Hae III* (Invitrogen) (modificado de Zhu et al 1999) que gera perfis de digestão diferentes para *A. lumbricoides* e *A. suum*, sendo de 144/263 pb e 36/144/277 pb, respectivamente) (Figura 6).

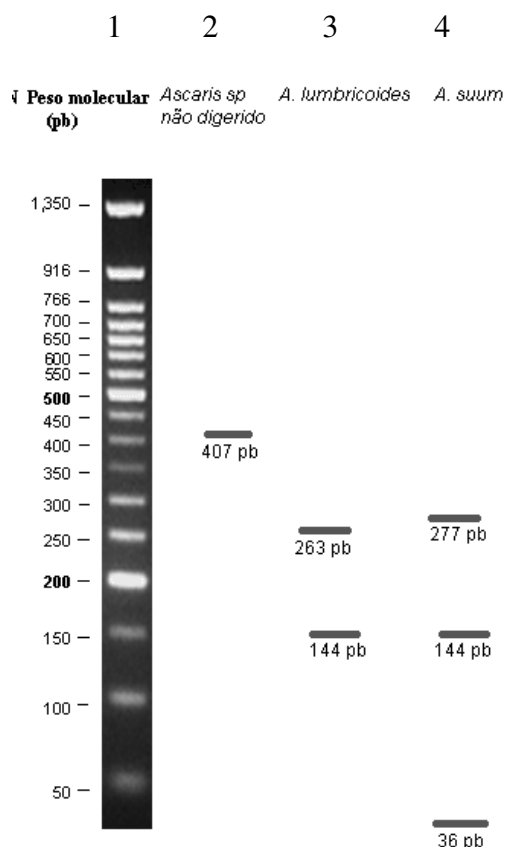


Figura 6: Esquema do perfil de digestão esperado para *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum* digeridos com a enzima de restrição *Hae III*. Pista 1 – ladder 50 pb (Invitrogen); 2 – produto PCR *Ascaris sp* de 407 pb não digerido; 3- perfil de digestão esperado para *A. lumbricoides*; 4- perfil de digestão esperado para *A. suum*.

Os produtos digeridos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida pelo procedimento descrito em Sambrook et al (1989), na concentração final de 8%, para melhor separação dos fragmentos pequenos e/ou de tamanhos próximos. Ao produto digerido e ao marcador de peso molecular foi adicionado 2µl de tampão de corrida, e estes foram submetidos à eletroforese em cuba vertical em tampão de corrida TBE1X sob corrente de 70 - 40 v. Em seguida o gel foi corado, visualizado e fotografado como descrito no item 3.1.1.2 c.

3.1.2 Coprólitos experimentais

3.1.2.1 Preparação dos coprólitos experimentais

Uma alíquota de 0,175g a 0,381g das amostras fecais DL01, DL02, DL04, DL13 e DL18 (Tabela 1) foi colocada em tubo de microcentrífuga que foram vedados com parafilme, evitando assim qualquer contaminação externa. Em seguida, as amostras foram colocadas em estufa a 37°C, onde passaram por um processo de desidratação induzida. Periodicamente fez-se a pesagem das amostras visando o controle da perda de água. Após a certificação da não alteração de peso das amostras, estas permaneceram na estufa por mais 15 dias, seguindo recomendações de Confalonieri et al (1985). O controle da pesagem e codificação dada aos coprólitos experimentais se encontra na Tabela 3 (ANEXO 4).

3.1.2.2 Metodologia

Os coprólitos experimentais foram reidratados em solução de fosfato trissódico 0,5% por 72 horas (Callen e Cameron 1960), segundo recomendado para exame paleoparasitológico (Araújo et al 2003). A sedimentação espontânea não foi feita. Em seguida 80, 50, 30, 5 e 1 ovos foram isolados do coprólito experimental DL01 – I, os quais passaram pelos mesmos tratamentos de extração de ADN descritos (item 3.1.1.2 b) para ovos obtidos das amostras fecais atuais (Figura 7 A e B).

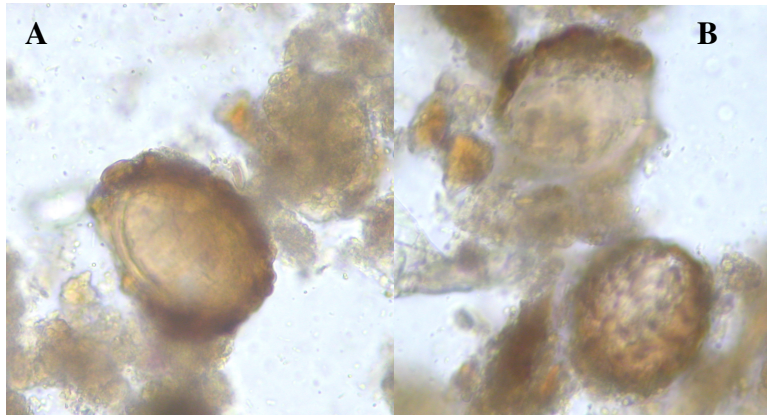


Figura 7 A e B: Ovos de *Ascaris lumbricoides* do coprólito experimental DL01-I em aumento de 40 X mostrando a sua quebra.

A extração de ADN dos coprólitos experimentais DL01 - I, DL02 - I, DL04 - I, DL13 - I e DL18 - I, foi feita pelo método físico-químico (choque térmico e fenol/clorofórmio) e pelo físico - Kit comercial para material fecal - *QIAamp® DNA Stool Mini Kit* (Qiagen) modificado, como descrito no item 3.1.1.2 b para fezes. PCR, RFLP e seqüenciamento nucleotídico foi realizado nas mesmas condições anteriores.

3.1.3 Material arqueológico

3.1.3.1 Cuidados prévios

Seguiram-se recomendações e critérios de autenticidade em estudos de ADN antigo, para prevenir contaminação com ADN moderno (Hofreiter et al 2001, Drancourt e Raoult 2005):

O trabalho envolvendo material antigo foi realizado em laboratório próprio para trabalho com ADN;

Quando possível, a superfície dos coprólitos foi removida com lâmina de bisturi esterelizada em fluxo laminar e todos foram irradiados com luz UV (ultravioleta) em toda sua superfície;

A área de extração de ADNa e de realização da PCR são fisicamente separadas da área de eletroforese;

Todos os reagentes em todas as etapas foram aliquotados de maneira a serem utilizados somente uma vez;

Todo o material usado na etapa da extração assim como da PCR foram novos e jamais reutilizados;

Não foram usados controles positivos durante a realização da PCR; estes foram colocados posteriormente em laboratório separado ao de trabalho com ADNa;

Controles negativos foram sempre incluídos durante a realização da PCR;

A extração de ADNa das amostras positivas ao exame paleoparasitológico por microscopia ótica foi posterior a extração de ADN das amostras negativas ao microscópio ótico;

3.1.3.2 Amostras

As amostras selecionadas compreenderam coprólitos humanos e sedimentos provenientes de sítios arqueológicos do Velho e Novo Mundo e pertencem à coleção do laboratório de paleoparasitologia da ENSP-FIOCRUZ (Tabela 4).

Tabela 4: Amostras de sedimentos e coprólitos provenientes de sítios arqueológicos.

Nº da amostra ENSP	Sítio arqueológico (local)	Parasitos	Tipo de material	Datação AP (Antes do Presente)
1216a	Sítio do Meio (Brasil, PI)	Oxiurídeo	coprólito e sedimento	8800 AP
47	Lapa Pequena (Brasil, MG)	<i>Trichuris</i> sp	coprólito e sedimento	8000 – 7000 AP
213	Boqueirão Soberbo (Brasil, MG)	<i>Trichuris</i> sp	coprólito	4905 ± 85 - 1325 ± 60 AP
22	Gruta do Gentio II (Brasil, MG)	<i>Trichuris trichiura</i> , Ancilostomídeos	coprólito	3490 ± 120 a 430 ± 70 AP
24a	Gruta do Gentio II (Brasil, MG)	* <i>Capilaria</i> ?, Ascarídeo, Ancilostomídeos, Cestódeo	coprólito e sedimento	3490 ± 120 a 430 ± 70 AP
714	Tulán, San Pedro de Atacama (Chile)	<i>Trichuris trichiura</i> , <i>Enterobius vermicularis</i>	coprólito	3080 - 2950 AP
1380	Walraversijde (Bélgica)	<i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i>	sedimento	700 AP
1384	Walraversijde (Bélgica)	<i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i>	sedimento	700 AP
389	Lübeck (Alemanha)	<i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , Fasciola, <i>Diphylobothrium</i> sp	sedimento	600 AP

* ? dúvida quanto ao diagnóstico.

Quando disponível, usou-se o sedimento de análises paleoparasitológicas anteriores. Na maioria das amostras foram removidas superfícies e posteriormente irradiadas por UV por 10 minutos (Tabela 5, ANEXO 5). As amostras foram reidratadas em fosfato trissódico 0,5% e não passaram por sedimentação espontânea.

3.1.3.3 Metodologia

b) Extração de ADN

Coprólitos e/ou sedimento

Nas extrações de ADN foram usados os tratamentos físico-químico e o físico-Kit comercial - QIAamp® DNA Stool Min Kit (Qiagen) modificado descritos no item 3.1.2 para coprólitos experimentais. Adicionalmente três amostras (24as, 47s e 1216s) passaram pelo método de extração fenol-clorofórmio sem tratamento físico prévio, recebendo a partir de então a codificação (24as/sf, 47s/sf e 1216s/sf) (Tabela 5, ANEXO 5).

No tratamento físico-químico o período de incubação com proteinase K, DTT 1M, SDS 10% e tampão de digestão (10mM NaCl; 10mM Tris HCl pH 8.0; 2mM EDTA) foi de 72 horas. No primeiro dia usou-se 1,2 mg de proteinase K, 400 µl de tampão de digestão, 20 µl de DTT 1M, 100 µl de SDS 10%. Nas últimas 24 horas colocou-se mais 40 µl de DTT 1M e 2.4 mg de proteinase K. A eluição final na etapa de purificação foi feita em 70µl de água. As amostras que mostraram coloração escura após a purificação, passaram por uma segunda purificação.

Outras alterações foram feitas quando usado o Kit comercial para material fecal - QIAamp® DNA Stool Min Kit (Qiagen) modificado com tratamento físico prévio descrito no item 3.1.1.2 b). O tempo de incubação com movimentação da proteinase K a 55-60° C foi de 12 horas e a eluição final foi feita em 70µl da solução de eluição do Kit. Amostras que apresentaram coloração escura após a extração de ADN passaram por purificação em colunas Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante com eluição final em 70µl.

Ovos

Foram isolados 80, 50 e 30 ovos das amostras 389, 1380 e 1384 no laboratório de paleoparasitologia da ENSP-FIOCRUZ, seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente (Figura 8 A, B, C e D).

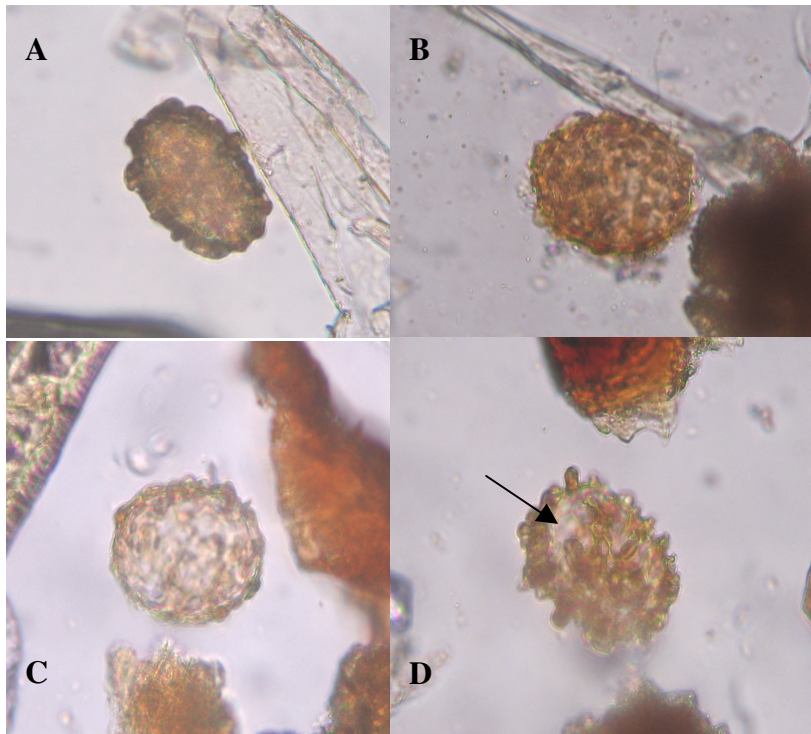


Figura 8 A, B, C e D: A - Ovo de *Ascaris lumbricoides* em aumento de 40X (amostra 1380). B - Ovo de *Ascaris lumbricoides* em aumento de 40X (amostra 389). C e D - Ovo de *Ascaris lumbricoides* em aumento de 40X (amostra 1384); C, ausência de conteúdo larval e D, a seta indica a quebra da casca do ovo.

Procedeu-se com o mesmo tratamento de extração de ADN físico-químico realizado com os ovos do parasito provenientes de amostras fecais atuais, com as seguintes modificações: o tempo de incubação com proteinase K, DTT 1M, SDS 10% e tampão de digestão (10 mM NaCl; 10mM Tris HCl pH 8.0; 2mM EDTA) foi de 72 horas. No primeiro dia usou-se 1,2 mg de proteinase K, 400 µl de tampão de digestão, 20 µl de DTT 1M, 100 µl de SDS 10% . Nas últimas

24 horas mais 40 µl de DTT 1M e 2.4 mg proteinase K foram adicionados às amostras. A eluição final na etapa de purificação foi feita em 70µl de água Milli-Q esterilizada.

Todos os ADN extraídos tanto de ovos, coprólitos e sedimentos foram quantificados em espectrofotômetro por absorbância no comprimento de onda de 260nm, como descrito anteriormente no item 3.1.1.2 c. Adicionalmente, os ADNs extraídos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8 % e corado com prata como descrito por Iñiguez (2002a).

c) PCR

Alvo molecular humano

Fez-se PCR para amplificação de ADN mitocondrial humano a fim de avaliar a qualidade do ADN antigo no material, usando o mesmo alvo molecular utilizado em amostras fecais e coprólitos experimentais de 92pb do gene citocromo oxidase II (*cox II*). As condições de PCR foram as mesmas descrita no item 3.1.1.2d exceto pelo número de ciclos (40) e pela concentração de ADN usada (25 - 495ng). Todas as PCRs foram acompanhadas de controles negativos e controle positivo (ADN humano atual), colocado posteriormente em laboratório separado do destinado ao trabalho com ADNa. Alternativamente, fez-se reamplificação das amostras, usando-se 3µl da primeira PCR como ADN molde nas mesmas condições anteriores, e/ou método de polimerização reconstitutiva que é composta de todos os reagentes da PCR, menos os oligonucleotídeos (Golenberg et al 1996). A PCR reconstitutiva foi feita em volume final de 25µl (10X de Tampão: 200mM Tris - HCl, 500mM KCl - Invitrogen, pH 8.4; 3 mM MgCl₂; 0.4mM do mix de dNTP), 2U *Taq* polimerase *Platinum*; 25 - 495ng de ADN das amostras (Iñiguez et al 2002). As reações foram submetidas a um ciclo inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 20 ciclos

de 94°C por 8 segundos, 55°C por 8 segundos e 72°C por 20 segundos em termociclador programável (PTC 100 60v, MJ Research).

Alvo molecular *Ascaris* sp

Fez-se inicialmente PCR para amplificação do fragmento do gene mitocondrial citocromo b por esse apresentar maior número de cópias no genoma que a região ITS 1. Usaram-se as condições anteriormente descritas no item 3.1.1.2 d), exceto pela temperatura de pareamento de 62°C e concentração de ADN usada (25 - 495ng). Adicionalmente, fez-se PCR reconstrutora antes da realização da PCR como descrito e/ou reamplificações usando-se como ADNa molde 3µl da primeira reação de PCR. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3% corado, visualizado, fotografado.

d) Clonagem dos produtos de PCR ADNa de *Ascaris* sp de coprólitos

Clonaram-se os amplicons correspondentes ao fragmento de 142pb do gene mitocondrial citocromo b de *Ascaris* sp extraídos das amostras. Utilizou-se o sistema *pGEM-T* and *pGEM Easy Vector System* (Promega) segundo o protocolo dos fabricantes. As ligações, incluindo o controle positivo da ligação, foram mantidas a 25° C por 1 hora, seguida de 12 horas a 4° C. A reação de transformação, incluindo controle positivo da transformação e ligação foi feita por choque térmico colocando-se 2 µl da ligação a 50 µl de células competentes que foram mantidas no gelo por 20 minutos, seguido de 1 minuto a 42° C e imediatamente 2 minutos no gelo (Sambrook et al 1989). Adicionou-se 600µl de meio SOC (Invitrogen), e a reação foi mantida a 37° C por 1 hora e 30 minutos a 150rpm. As transformações das amostras, controles positivos da ligação e da transformação foram espalhadas em placas de LB sólido contendo 20µl de Ampicilina (50mg/mL), 40µl X-gal (20mg/mL) e 4µl IPTG (200mg/mL). O controle positivo da

transformação foi espalhado em placas de LB sólido contendo 20µl ampicilina 50mg/mL e o controle positivo das células competentes em placas de LB sólido. Todas as placas foram mantidas em estufa a 37° C por aproximadamente 18 horas. As colônias selecionadas foram incubadas em 3mL de meio LB líquido contendo 3 µl Ampicilina (50mg/mL) a 37° C por aproximadamente 18 horas a 225 rpm. As culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos e o sedimento resuspendido em 500 µl de água milli-Q esterilizada. A suspensão foi submetida a choque térmico de banho-maria fervente (100°C) por 20 minutos e imediatamente submetida a congelamento (-20°C). Para o uso o material era descongelado à temperatura ambiente e centrifugado por 3 minutos a 14000 rpm. A seleção dos transformantes foi feita pela PCR para região cit b usando as mesmas condições descritas anteriormente, usando-se 5 µl do sobrenadante, produto do choque térmico descrito acima. Os produtos amplificados foram purificados e seqüenciados como descrito no item 3.1.1.2 d. Alternativamente foi usado o kit de extração de plasmídeo Wizard Plus SV Miniprepers DNA Purification System (Promega) seguido de seqüenciamento nucleotídico a partir dos oligonucleotídeos do plasmídeo: M13 forward 5'- CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG – 3' e M13 reverse 5' – GTAAAACGACGGCCAGT- 3'.

À análise das seqüências nucleotídicas foi feita com auxílio dos programas descritos no item 3.1.1.2 d. Adicionalmente, a tradução da seqüência de ADN do fragmento de cit b para a seqüência de proteína pelo código genético do genoma mitocondrial de invertebrados foi feito pelo programa GenDoc v 2.6.002. As seqüências nucleotídicas foram comparadas e alinhadas com as seqüências nucleotídicas modernas e antigas de *Ascaris sp* (Loreille et al 2001, X54253) incluindo as obtidas nesse trabalho (EF150649-53).

4 RESULTADOS

4.1 Amostras fecais atuais

Ovos

O tratamento de extração de ADN físico (choque térmico) e físico/químico (choque térmico e fenol-clorofórmio) proporcionou ADN suficiente para amplificação usando apenas um ovo para ambos os alvos moleculares, gene cit b e região ITS 1. Para região cit b obtiveram-se amplicons de 142 pb e para região ITS 1 amplicons de tamanhos esperados 139 pb e 407 pb (Figuras 9 e 10, Tabela 2).

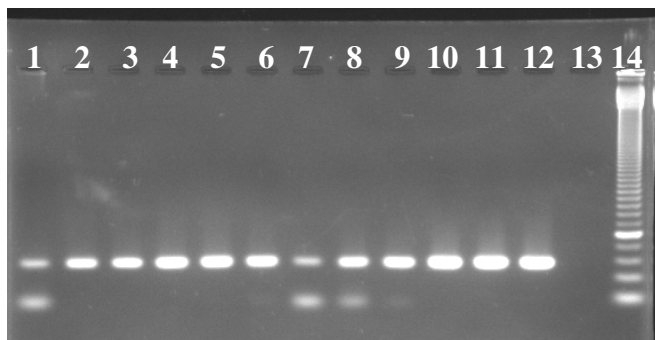


Figura 9. Produto da PCR do fragmento do gene cit b de ovos de *Ascaris lumbricoides* isolados de fezes. Eletroforese em gel de agarose 3%. Tratamento físico, pistas 1-6: amostras com 1, 5, 10, 30, 50 e 80 ovos, respectivamente. Tratamento físico-químico, pista 7-12: amostras com 1, 5, 10, 30, 50 e 80 ovos, respectivamente. Pista 13, controle negativo. Pista 14, marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen).

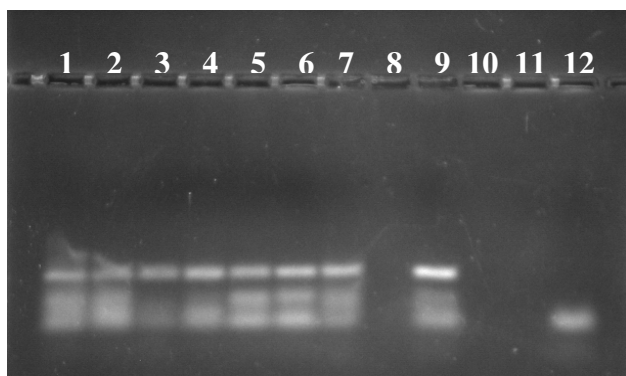


Figura 10. Produto da PCR da região ITS 1 de ovos de *Ascaris lumbricoides* isolados de fezes. Eletroforese em gel de agarose 3%. Tratamento físico, pistas 1-3: amostras com 1, 5 e 10 ovos, respectivamente. Tratamento físico-químico, pista 4-7: amostras com 1, 5, 10 e 50 ovos, respectivamente. Pista 9, marcador de peso molecular 139 pb. Pista 12, controle negativo.

Fezes

Nenhuma amplificação foi obtida sem o tratamento físico prévio de choque térmico, tanto pelo método fenol-clorofórmio como pelo Kit comercial para amostras fecais - QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) segundo protocolo recomendado pelo fabricante.

Treze das 14 (85,71%) amostras fecais positivas para *A. lumbricoides* pelo diagnóstico parasitológico geraram o fragmento esperado de 142 pb para o gene *cit b*, quando empregado o tratamento físico/fenol clorofórmio (Figura 11). PCR para o alvo molecular humano *cox II* das duas amostras (DL12 e DL18) que não geraram o fragmento esperado para *cit b*, somente a amostra DL18 gerou o fragmento de 92 pb (Figura 12).

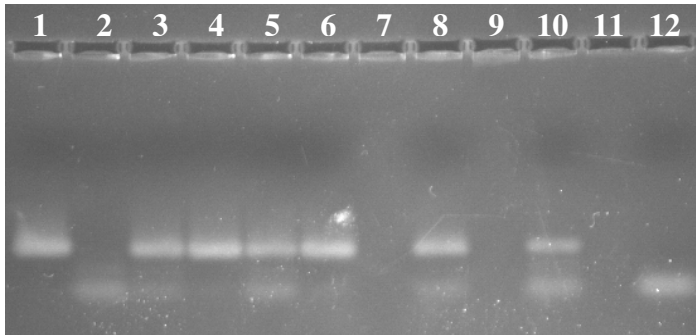


Figura 11. Produto da PCR do fragmento do gene *cit b* de *Ascaris lumbricoides* de fezes. Eletroforese em gel de agarose 3%. Tratamento físico/fenol-clorofórmio, pistas 1-6: amostras DL01, DL07, DL13, DL15, DL16, DL17, respectivamente. Pista 8: controle positivo. Pista 10: marcador de peso molecular 142 pb. Pista 12: controle negativo

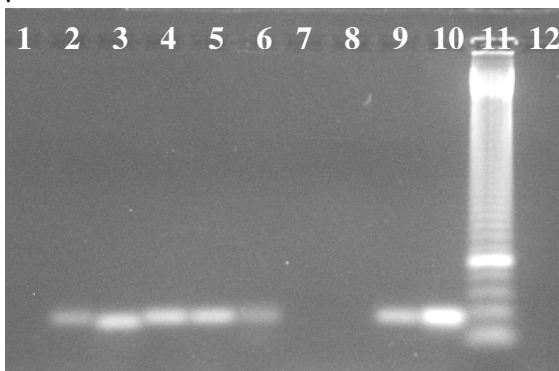


Figura 12. Produto da PCR do alvo molecular humano *cox II* de fezes e coprólitos experimentais. Eletroforese em gel de agarose 3%. Tratamento físico/fenol-clorofórmio, pistas 1-2: amostras DL12, DL18. Tratamento físico/Kit comercial, pistas 3-6: amostras DL04, DL08, DL14 e DL18, respectivamente. Tratamento físico/fenol-clorofórmio, pistas 7 e 8: coprólitos experimentais DL02-I e DL13-I (primeira purificação). Tratamento físico/Kit comercial, pista 9: amostra DL13-I. Pista 10: controle positivo. Pista 11: marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen). Pista 12: controle negativo

As amostras DL04 e DL08 somente amplificaram após polimerização reconstitutiva e/ou de uma segunda purificação do ADN extraído, gerando o fragmento esperado 142 pb (Figura 13).

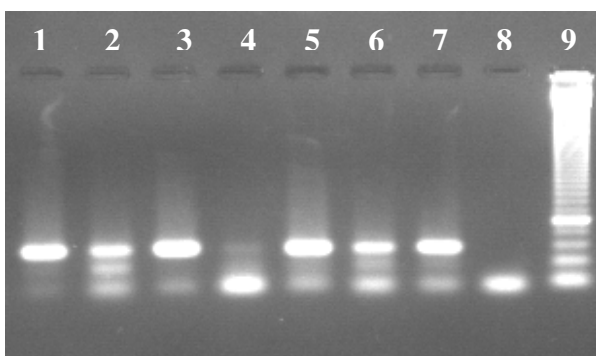


Figura 13. Produto da PCR do fragmento do gene *cit b* de amostras fecais que amplificaram somente após segunda purificação e/ou PCR reconstitutiva. Segunda purificação, pista 1 e 2: amostras DL04 e DL08, respectivamente. Segunda purificação e diluição das amostras, pista 3 e 4: DL04 e DL08, respectivamente. Segunda purificação e PCR reconstitutiva, pista 5 e 6: amostras DL04 e DL08, respectivamente. Pista 7, controle positivo. Pista 8, controle negativo. Pista 9, marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen).

Usando-se o tratamento físico/Kit comercial para material fecal - QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado 10/14 (71,14%) das amostras geraram fragmento de 142 pb (Figura 14). Todas as quatro amostras (DL04, DL08, DL14 e DL18) que não amplificaram o alvo molecular cit b geraram o fragmento esperado de 92 pb para o alvo molecular humano *cox II* (Figura 12).

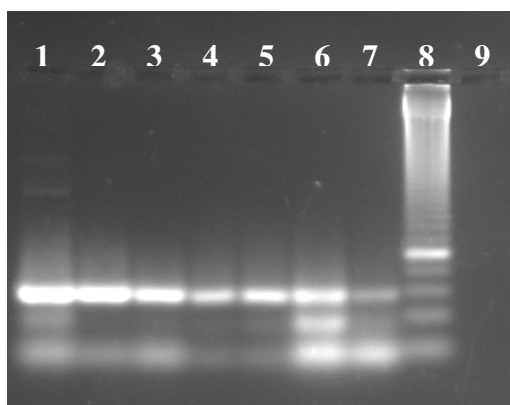


Figura 14. Produto da PCR do fragmento do gene cit b de *Ascaris lumbricoides* de fezes. Tratamento físico/Kit comercial, pistas 1-6: amostras: DL01, DL02, DL06, DL15, DL16 e DL17, respectivamente. Pista 7, controle positivo. Pista 8, marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen). Pista 9, controle negativo.

Quando o alvo molecular foi a região ITS 1, 9/14 amostras geraram fragmentos de 480 pb (Figura 15) e 3/14 geraram fragmentos de 407 pb produzido pela PCR semi-nested, quando usado a extração pelo método físico/fenol-clorofórmio. A amostra DL04 amplificou após o uso da polimerização reconstrutiva e/ou segunda purificação.

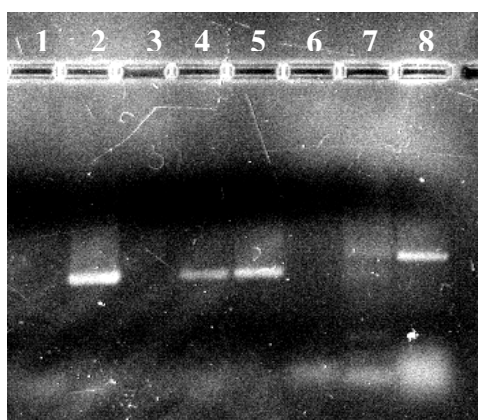


Figura 15. Produto da PCR da região ITS 1 de *Ascaris lumbricoides* de fezes. Eletroforese em gel de agarose 2,5%. Pista 1, controle negativo. Tratamento físico/fenol-clorofórmio, pistas 2-6: amostras DL01, DL04, DL12, DL13, DL18, respectivamente. Pista 7: controle positivo. Pista 8: marcador de peso molecular aproximadamente 600 pb.

Já quando o tratamento usado foi o físico/Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado 7/14 amostras geraram fragmentos de 407 pb pela PCR semi-nested. As duas amostras (DL07 e DL11) contendo apenas ovos de *T. trichiura* geraram fragmentos maiores que os esperados para *A. lumbricoides*. Apenas 2/14 gerou fragmento de 480 pb (Figura 16) (ver item 3.1.1.2).

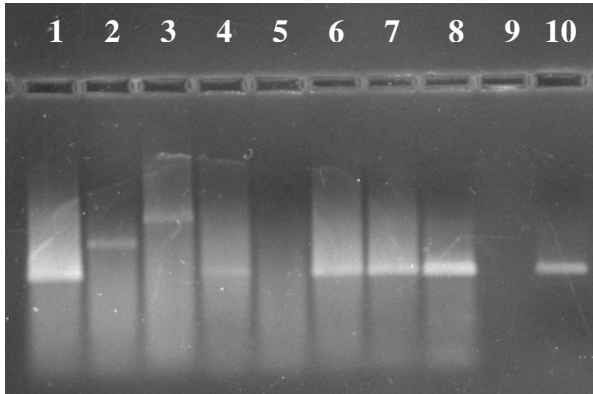


Figura 16. Produto da PCR da região ITS 1 de *Ascaris lumbricoides* de fezes. Eletroforese em gel de agarose 2,5%. Tratamento físico/ Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado, pistas 1-8: amostras DL03, DL07, DL11, DL12, DL14, DL15, DL16 e DL17, respectivamente. Pista 9: controle negativo. Pista 10: marcador de peso molecular de 407 pb.

Os resultados das PCRs para amostras fecais usando-se ambos os tratamentos de extração de ADN, físico/fenol-clorofórmio e físico/Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit - Qiagen modificado, e ambos alvos moleculares, gene cit b e região ITS 1, estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6: Amplificações das amostras fecais recentes positivas para ovos de helmintos.

Amostra	Parasitas	Tratamento de extração de ADN			
		cit b (142pb)		ITS 1 (480/407pb)	
		<u>FQ</u>	<u>FK</u>	<u>FQ</u>	<u>FK</u>
DL01	<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>	+	+	+	+
DL02	<i>A. lumbricoides</i> e <i>E. vermicularis</i>	+	+	+	+
DL03	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	+*	+*
DL04	<i>A. lumbricoides</i>	+•	-	+•*	-
DL05	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	+	-
DL06	<i>A. lumbricoides</i> e <i>E. vermicularis</i>	+	+	+*	+*
DL07	<i>T. trichiura</i>	-	-	-	-
DL08	<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>	+•	-	-	-
DL11	<i>T. trichiura</i>	-	-	-	-
DL12	<i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>	+♦	+	+	+*
DL13	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	+	+*
DL14	<i>A. lumbricoides</i>	+	-	+	-
DL15	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	+	+*
DL16	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	+	+*
DL17	<i>A. lumbricoides</i>	+	+	+	+*
DL18	<i>A. lumbricoides</i>	-	-	-	-
Total	Amplificações para <i>A. lumbricoides</i>	13	10	12	09

Legenda: FQ tratamento físico e químico (choque térmico e fenol-clorofórmio); FK tratamento físico/Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado; + PCR positivo; +• PCR positivo após PCR reconstrutiva e/ou segunda purificação; +♦ PCR positivo após diluição da amostra; +*PCR positivo semi-nested (407 pb); +•* PCR positivo semi-nested após PCR reconstrutiva e/ou segunda purificação; - PCR negativo.

O ensaio do RFLP mostrou o perfil de digestão esperado para *A. lumbricoides* de 144

pb e 263 pb (Figura 17).

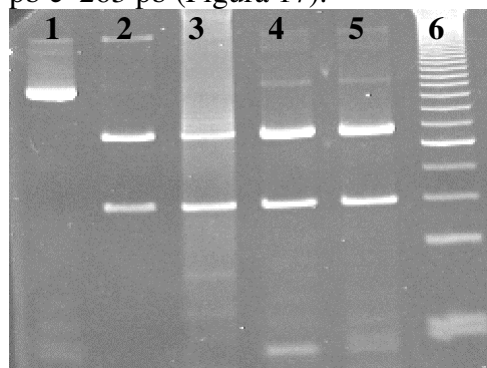


Figura 17: Perfil de restrição da região ITS 1 de *Ascaris lumbricoides* para amostras fecais. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Pista 1, amostra DL17 produto de PCR 407 pb não digerido. Pistas 2-5, amostras (DL13, 15, 16 e 17). Pista 6, marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen).

Análise das seqüências nucleotídicas

Todas as cinco seqüências nucleotídicas do fragmento de gene *cit b* dos isolados brasileiros mostraram o nucleotídeo T na posição 5522 característico de *A. lumbricoides* (Loreille et al 2001); diferentemente do nucleotídeo C 5522 peculiar do genoma mitocondrial de *Ascaris suum* (X54253). Por outro lado, para região ITS 1 dois tipos de seqüências nucleotídicas foram encontrados nos isolados brasileiros (Tabela 7). Na porção analisada, 4/5 seqüências nucleotídicas têm identidade total com o genótipo G1 (Zhu et al 1999, Peng et al 2003). A outra seqüência nucleotídica analisada possui uma deleção na posição 129 (Tabela 7) não observada em nenhuma outra seqüência de *A. suum* e *A. lumbricoides*. As seqüências nucleotídicas do fragmento do gene *cit b* e região ITS 1 dos isolados brasileiros foram depositadas no GenBank (EF150649-53 e EF1536919-23, respectivamente).

Tabela 7: Comparação das seqüências nucleotídicas da região ITS 1 *Ascaris* sp dos isolados brasileiros com as seqüências nucleotídicas de *A. lumbricoides* e *A. suum* disponíveis no GenBank.

***Variação nucleotídica na posição do alinhamento**

Número de acesso	Amostras	1	1	20	22	23	129	130	131	135	175	207	208	209	250	329
AB110019-21	<i>Al</i>	T	T	A	-	-	T	-	-	G	G	C	G	C	T	A
AJ554036/41 (G1)	<i>Al/As</i>	-	-	A	-	-	T	-	-	G	G	C	G	C	T	NA
EF153619	DL01	NA	NA	A	-	-	T	-	-	G	G	C	G	C	T	A
EF1536920/22-23	DL02 (3)	NA	NA	A	-	-	T	-	-	G	G	C	G	C	T	A
EF156921	DL04	NA	NA	A	-	-	-	-	-	G	G	C	G	C	T	A
AJ000895	<i>Al</i>	-	-	A	-	-	T	-	-	G	G	-	-	S	T	R
AJ554038/43 (G3)	<i>Al/As</i>	-	-	A	A	A	T	T	-	C	G	C	G	C	A	NA
AJ000896	<i>As</i>	-	-	R	A	A	T	T	T	C	G	-	-	S	A	A
AB110023	<i>As</i>	T	T	A	N	A	T	T	-	C	G	C	G	C	A	A
AB110022	<i>As</i>	T	T	A	A	A	T	T	-	C	G	C	G	C	A	A
AJ554037/42 (G2)	<i>Al/As</i>	-	-	A	A	A	T	T	-	S	G	C	G	C	T	NA
AJ554039 (G4)	<i>Al</i>	-	-	A	-	-	T	-	-	G	R	C	G	C	T	NA
AJ554040 (G5)	<i>Al</i>	-	-	A	-	-	T	-	-	S	G	C	G	C	W	NA

Legenda: □ similaridade entre as seqüências nucleotídicas; ■ diferenças nucleotídicas; *Al* *A. lumbricoides*; *As* *A. suum*; - deleção nucleotídica; NA não analisada; DL02 (3) correspondem a DL02, DL13 e DL18 (número de acesso EF1536920 e EF15366922-23). *posição em relação às seqüências nucleotídicas AB110019-21. G1-G5 (correspondem aos genótipos descritos por Peng et al 2003).

4.2 Coprólitos experimentais

Pelas análises microscópicas observou-se que a quantidade de ovos de *A. lumbricoides* dos coprólitos experimentais diminuiu quando comparada às respectivas amostras atuais, assim como o número de ovos quebrados aumentou.

Ovos

Os tratamentos físico e físico/químico disponibilizaram ADN suficiente para amplificação usando apenas 1 ovo quando o alvo molecular foi o gene *cit b*. Amplicons de 142 pb foram gerados (Figura 18).

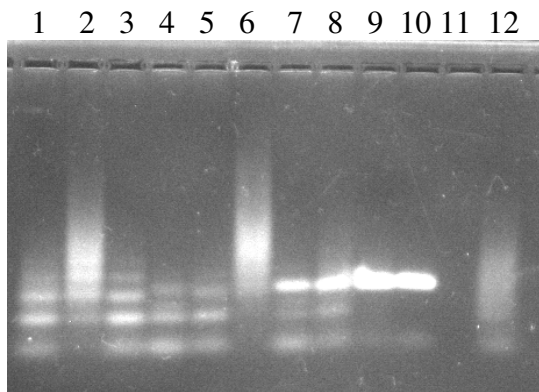


Figura 18. Produto da PCR do fragmento do gene *cit b* para ovos de *Ascaris lumbricoides* isolados de coprólitos experimentais. Eletroforese em gel de agarose 3%. Tratamento físico, pistas 1-9 (1, 1, 5, 5, 10, 30, 50, e 80 ovos). Pista 9, controle positivo. Pista 10 marcador de peso molecular de 142 pb. Pista 12, controle negativo.

Quando o alvo molecular foi a região ITS 1, o tratamento físico foi sensível para disponibilizar ADN suficiente para amplificação a partir de 5 ovos. Usando-se o método físico - químico, amplicons de 407 pb (PCR *semi-nested*) foram conseguidos usando-se apenas 1 ovo. O resultado do seqüenciamento nucleotídico revelou identidade total com a seqüência nucleotídica obtida das fezes para ambos os alvos moleculares (amostra analisada DL01 - I), mostrando que o processo de dessecação induzida não interferiu na composição nucleotídica da seqüência.

Sedimento

Duas de cinco amostras (DL02-I e DL13-I) extraídas pelo método físico/fenol-clorofórmio permaneceram escuras após a purificação (Figura 12). Foi feita uma segunda

purificação dessas amostras. Obtiveram-se amplicons de 142 pb gene *cit b* para 4/5 coprólitos experimentais (amostras DL01-I, DL04-I, DL13-I e DL18-I), quando usado o tratamento físico-químico. PCR para alvo molecular humano da amostra DL02-I não gerou o fragmento esperado de 92 pb.

Quatro dos cinco coprólitos experimentais (amostras DL01-I, DL02-I, DL04-I e DL18-I), quando usado o Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado geraram o fragmento de 142 pb para gene *cit b*. PCR para o alvo molecular humano *cox II* da amostra DL13-I gerou o fragmento de 92 pb esperado (Figura 12).

Usando a região ITS 1 como alvo molecular, amplicons de 580 pb de 1/5 coprólitos experimentais (DL01-I) e amplicons de 407 pb (PCR *semi-nested*) de 3/5 coprólitos experimentais (DL02, 04 e 13-I) foram obtidos quando usado o tratamento físico-químico. O RFLP dos amplicons de 407 pb mostrou o perfil esperado para *A. lumbricoides*. Quando o tratamento aplicado foi o físico/Kit comercial modificado, 1/5 coprólitos experimentais (DL01-I) gerou fragmento de 480 pb e 2/5 (DL04-I e DL18-I) geraram fragmento de 407 pb (PCR *semi-nested*). Os resultados estão resumidos na Tabela 8.

Tabela 8: Amplificações dos coprólitos experimentais com ovos de *A. lumbricoides*.

Amostras	Tratamento de extração de ADN			
	cit b		ITS 1	
	FQ	FK	FQ	FK
DL01-I	+	+	+	+
DL02-I	-	+	+	-
DL04-I	+	+	+	+
DL13-I	+	-	+	-
DL18-I	+	+	-	+
Total 5	3	4	4	3

Legenda: FQ tratamento de extração de ADN físico/ químico (choque térmico e fenol-clorofórmio); FK tratamento de extração de ADN físico/ Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado; +PCR positivo, +*PCR *semi-nested* positivo, - PCR negativo.

4.3 Material arqueológico

Coprólitos e sedimento

Seis de treze amostras (47s, 47s/sf, 213, 1216, 1216s e 1216s/sf) que passaram pelo tratamento físico/fenol-clorofórmio foram purificadas novamente, sendo que a amostra 47s/sf ainda permaneceu escura. Pela extração de ADN usando o tratamento físico/Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado, 3/10 amostras (47, 47s, 1216) foram purificadas novamente, permanecendo escuras as amostras 47s e 1216. As concentrações do ADN extraído de todos coprólitos e sedimentos estão na Tabela 9.

Tabela 9: Concentrações do ADN das amostras arqueológicas.

	*Amostra	Abs. 260nm	DNA[ng/μl]	
Negativas ao microscópio ótico para <i>A. lumbricoides</i>	22f	0,022	55,4	
	22c	0,025	62	
	24a	0,004	9,3	
	24as	0,040	98,9	
	24as/sf	0,038	94,7	
	47	0,027	68,1	
	47s	0,019	47,7	
	47s/sf	0,096	240,3	
	213	0,002	4,3	
	714	0,023	57,4	
	1216	0,008	20,8	
	1216s	0,003	8,0	
	1216s/sf	0,003	8,2	
	PMO	22f	0,002	5,0
		22c	0,009	23,3
24a		0,002	5,2	
24as		0,002	4,2	
47		0,030	83,6	
47s		0,107	267,4	
213		0,010	25,6	
714		0,011	26,3	
1216		0,072	179,3	
1216s		0,014	36,1	
389		0,010	25,6	
389 (30 ovos)		0,006	15,7	
389 (50 ovos)		0,006	15,6	
389 (80 ovos)		0,013	32,7	
Físico/Fenol-Clorofórmio		1380	0,019	47,3
	1380 (30 ovos)	0,006	14,5	
	1380 (50 ovos)	0,010	25,8	
	1380 (80 ovos)	0,005	13,1	
	1384	0,009	23,1	
	1384 (30 ovos)	0,010	25,3	
	1384 (50 ovos)	0,008	19,6	
	1384 (80 ovos)	0,010	24,1	
FK	389	0,011	27	
	1380	0,008	18,9	
	1384	0,032	78,9	

Legenda, * as informações das amostras segundo esta codificação estão no (ANEXO 5: Tabela 5). PMO: amostras positivas ao microscópio ótico para *A. lumbricoides*. FK: tratamento físico/Kit comercial (choque térmico/ QIAamp® DNA Stool Mini Kit - Qiagen). FQ: tratamento físico-químico (choque térmico/fenol-clorofórmio). Abs. Absorbância no comprimento de onda.

Todas as amostras negativas e positivas para *A. lumbricoides* ao exame paleoparasitológico por microscopia ótica geraram amplicons de 92 pb para o alvo molecular humano *cox II*. Usando-se o método físico e químico (choque térmico e fenol-clorofórmio) descritos no item 3.1.3.2 b) 1/13 amostras (22c) só amplificou após reamplificação. Para o método físico e Kit QIAamp® DNA Stool Min Kit (Qiagen) modificado descrito, 2/13 amostras (24as e 1216s) amplificaram após reamplificação e 3/13 amostras (47, 47s e 1384) após PCR reconstitutiva (Figura 19).

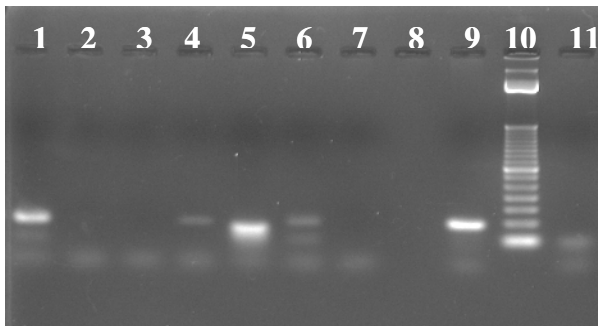


Figura 19. Produto da PCR para alvo molecular humano mitocondrial *cox II* de coprólitos e sedimentos arqueológicos. Eletroforese em gel agarose M 3%. Reamplificação de PCR, pista 1-7: amostras 22as, 47, 47s, 1216s (ADN extraído pelo método físico - Kit comercial) e 22c, 47s/sf (ADN extraído pelo método físico - químico) e 1384 (ADN extraído pelo método físico - Kit comercial). Pista 9, controle positivo. Pista 10 marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen). Pista 11, controle negativo.

Para o alvo molecular gene *cit b* de *Ascaris* 1/10 das amostras (1216) negativas ao exame paleoparasitológico por microscopia ótica gerou fragmento de 142 pb quando o método usado foi choque térmico e fenol-clorofórmio (Figura 20).

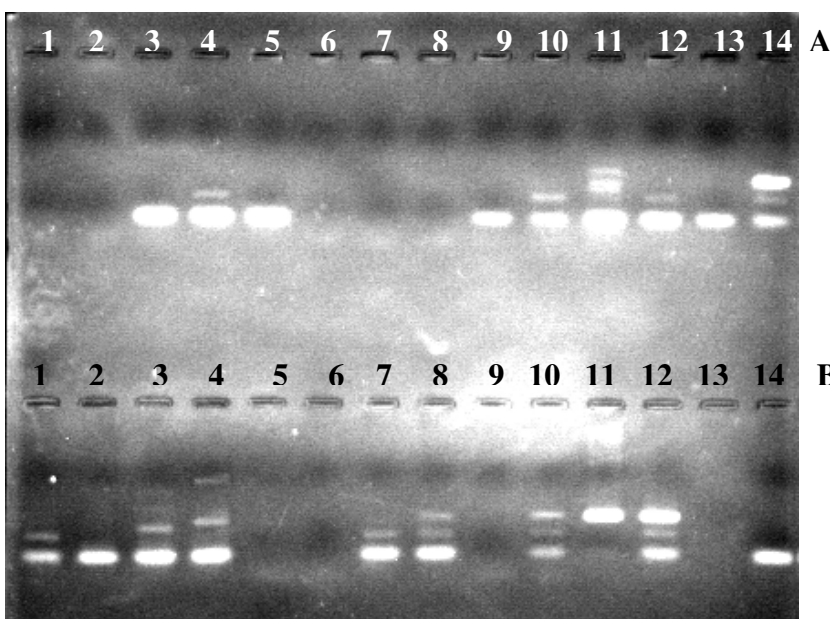


Figura 20. Produto da PCR para alvo molecular de *Ascaris* sp *cit b* de coprólitos e sedimentos arqueológicos. Eletroforese em gel agarose M 3%. A, tratamento de extração de ADN físico-químico, pista 1-13: amostras 22c, 22f, 24a, 24as, 47, 47s, 47s/sf, 213, 714, 1216, 1216s e 1216s/sf, respectivamente. Pista 14 marcador de peso molecular de 142 pb. B, tratamento de extração de ADN físico - Kit comercial modificado, pista 1-10: amostras 22c, 22f, 24a, 24as, 47, 47s, 213, 714, 1216 e 1216s, respectivamente. Pista 11, controle positivo. Pista 12, marcador de peso molécula de 142 pb. Pista 14, controle negativo.

Quando o método usado foi o Kit comercial modificado 3/10 amostras (24a, 714 e 1216s) geraram o fragmento de 142 pb. PCR reconstrutiva foi aplicada ao ADNa extraído por ambos os métodos de tratamento (Figura 20). Após reamplificação a amostra 22f extraída pelo método físico/Kit comercial modificado gerou o fragmento esperado de 142 pb.

Para as amostras positivas para *A. lumbricoides* ao exame paleoparasitológico por microscopia ótica, 389 e 1380 amplificaram o fragmento de 142 pb após PCR reconstrutiva quando o método usado foi choque térmico - fenol/clorofórmio; e a amostra 1380, quando se usou o método choque térmico - Kit comercial modificado (Figura 21).

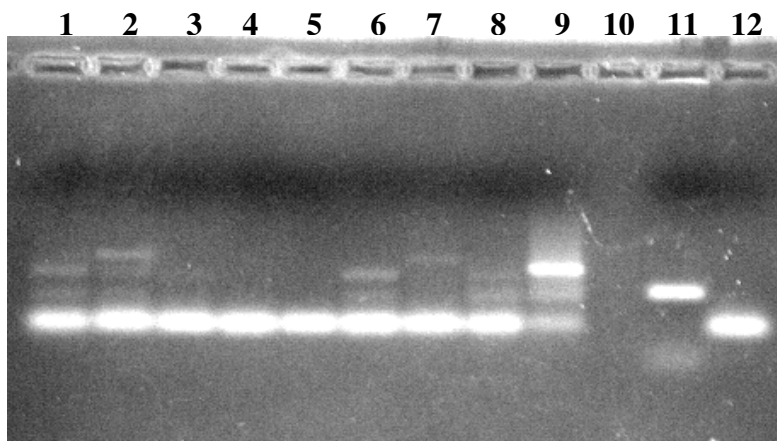


Figura 21. Produto da PCR para alvo molecular humano mitocondrial *cox II* de amostras arqueológicas. Eletroforese em gel agarose M 3%. Tratamento Físico químico, pistas 1-4: amostras 389, 389 diluição 1:9, 1380, 1380 diluição 1:9, respectivamente. Tratamento Físico – Kit comercial modificado, pistas 5 e 6: amostras 1380, 1380 diluição 1:9, respectivamente. Pista 7 e 8: 389 80 ovos e 1384 80 ovos. Pista 9, controle positivo. Pista 11, marcador de peso molecular de 92 pb. Pista 12, controle negativo.

Após reamplificação a amostra 389 amplificou quando usado o método choque térmico e Kit comercial modificado. A amostra 1384 não amplificou ao se usar ambos os métodos de extração de ADN. Os resultados das PCRs para coprólitos e sedimentos usando-se ambos os alvos moleculares (humano *cox II* e *Ascaris* gene *cit b*) e ambos métodos de extração (choque térmico e fenol-clorofórmio; choque térmico e Kit comercial modificado) encontram-se resumidos na Tabela 10.

Tabela 10: Amplificações dos sedimentos e coprólitos das amostras arqueológicas.

Amostras	Tipo de material usado	Tratamento de extração do ADNa			
		Alvo humano cox II		Alvo <i>Ascaris cit b</i>	
		FQ	FK	FQ	FK
22c	coprólito	+ R	+	-	-
22f	coprólito	+	+	-	+ PCR-R e R
24a	coprólito	+	+	-	+PCR-R
24as	sedimento	+	+R	-	-
47	coprólito	+	+PCR-R	-	+ PCR-R e R
47s	sedimento	+	+ PCR-R	PCR-R e R	-
213	coprólito	+	+	-	-
714	coprólito	+	+	-	+PCR-R
1216	coprólito	+	+	+PCR-R	
1216s	sedimento	+	+R	+PCR-R	+PCR-R
389	sedimento	+	+	+PCR-R	+PCR-R e R
1380	sedimento	+	+	+PCR-R	+PCR-R
1384	sedimento	+	+PCR-R	-	-
Total 13		13	13	5	7

Legenda: FQ tratamento de extração de ADN físico/ químico (choque térmico e fenol-clorofórmio). FK tratamento de extração de ADN físico/ Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado +: PCR positivo; -: PCR negativo, +R: PCR positivo após reamplificação, +PCR-R: PCR positivo após PCR reconstitutiva, +PCR-R e R: PCR positivo após PCR reconstitutiva e reamplificação.

Das 100 colônias analisadas, foram recuperados clones para cit b gene das amostras (22f, 47, 714, 1216s, 389 e 1380) (Figura 22).

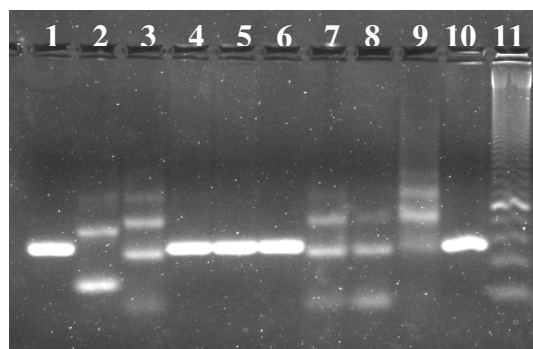
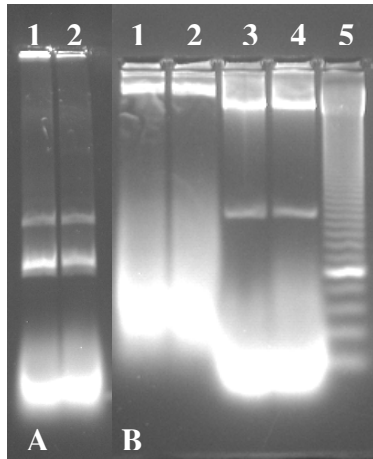


Figura 22. Produto da PCR para alvo molecular gene cit b de *Ascaris* sp dos produtos clonados a partir de coprólitos e sedimentos arqueológicos. Eletroforese em gel agarose M 3%. Tratamento físico/Kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) modificado, pistas 1-10: amostras 22f, 24a, 24a, 47, 47, 714, 714, 714, 714 e 1216s, respectivamente. Pista 11, marcador de peso molecular 50pb (Invitrogen).

A análise por eletroforese e RFLP dos controles positivos da transformação e ligação do Kit mostrou o tamanho de fragmento esperado (Figura 23 A e B).



Fotos 23 A. Plasmídeo total dos controles positivos da ligação de clonagem. Eletroforese em gel de agarose 1%. Pista 1 e 2: plasmídeo total dos controles positivos da ligação.

23 B. RFLP dos controles positivos da ligação de clonagem. Eletroforese em gel de agarose 3%. Pista 1 e 2 Plasmídeo dos controles positivos da ligação clonagem, não digerido. Pistas 3 e 4 plasmídeos controles positivos, digeridos com a enzima de restrição *EcoR* I. Pista 5, marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen).

O resultado do seqüenciamento nucleotídico dos produtos clonados gerou: três seqüências para amostra 1380, uma seqüência para amostra 389, uma seqüência para amostra 22f, duas seqüências para amostra 47, uma seqüência para amostra 714 e uma seqüência para amostras 1216s.

Ovos

O método de extração usado (choque térmico - fenol/clorofórmio) mostrou sensibilidade suficiente para detectar apenas 30 ovos na amostra 1380, 50 ovos na amostra 1384 e 80 ovos na amostra 389. As amplificações a partir de 80 ovos foram conseguidas após PCR reconstitutiva e as com 30 e 50 ovos só foram possíveis usando-se PCR reconstitutiva e reamplificação (Figuras 24 e 25). Os resultados se encontram resumidos na Tabela 11 e as concentrações do ADN extraído dos ovos estão na Tabela 9.

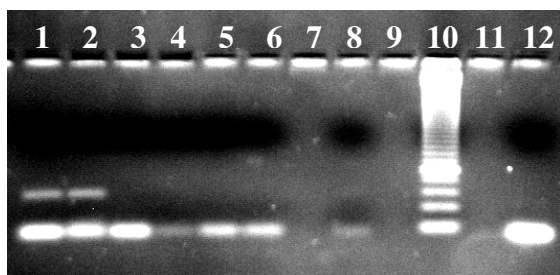


Figura 24. Produto da PCR para alvo molecular gene cit b de ovos de *Ascaris* sp isolados de sedimento arqueológico. Eletroforese em gel agarose M 3%. Pistas 1-3: amostras 389 80 ovos, 1380 80 ovos e 1384 80 ovos, respectivamente. Tratamento choque térmico-fenol/clorofórmio, pistas 4-6: amostras 389, 1380 e 1384, respectivamente. Pista 8, controle positivo. Pista 10, marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen). Pista 12, controle negativo.

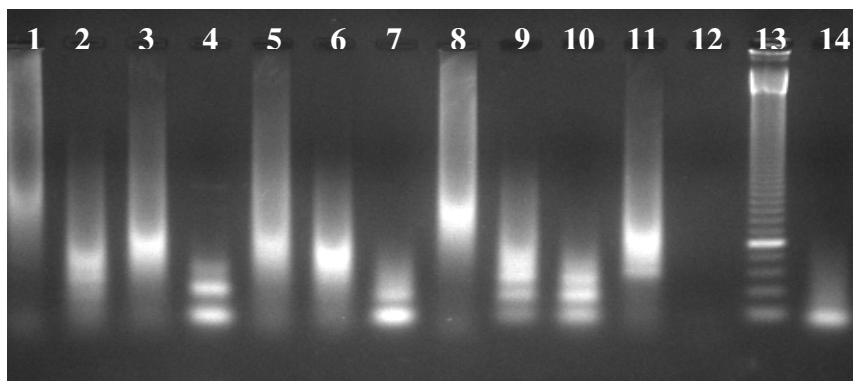


Figura 25. Produto da PCR para alvo molecular gene cit b de ovos de *Ascaris* sp isolados de sedimento arqueológico Eletroforese em gel de agarose M 3%. Pistas 1-11: amostras 389 (30 ovos), 389 (50 ovos), 1380 (30 ovos), 1380 (50 ovos), 1384 (30 ovos), 1384 (50ovos), 1380 (10 ovos), 389 (30 ovos diluição 1:9), 1380 (30 ovos diluição 1:9), 1384 (50 ovos diluição 1:9), 389 (80 ovos). Pista 13, marcador de peso molecular 50 pb (Invitrogen). Pista 14, controle negativo.

Tabela 11: Amplificações para ovos de *A. lumbricoides* isolados de sedimentos arqueológicos.

Amostras	Alvo molecular <i>Ascaris</i> sp cit b
389 (30 ovos)	-
389 (50 ovos)	-
389 (80 ovos)	+PCR-R
1380 (30 ovos)	+PCR-R e R
1380 (50 ovos)	+PCR-R e R
1380 (80 ovos)	+PCR-R
1384 (30 ovos)	-
1384 (50 ovos)	+PCR-R e R
1384 (80 ovos)	+PCR-R e R
Total 9	6

Legenda: -: PCR negativo, +PCR-R: PCR positivo após PCR reconstutora, +PCR-R e R: PCR positivo após PCR reconstitutiva e reamplificação.

O resultado do seqüenciamento nucleotídico dos produtos clonados gerou 3 seqüências para amostra 1380 ovos e duas seqüências para amostra 389 ovos e uma para 1384 ovos. Uma seqüência para amostra 1380 ovos por sequenciamento nucleotídico direto foi gerada.

Análise das seqüências nucleotídicas

Todas as 16 seqüências nucleotídicas antigas obtidas do fragmento do gene *cit b* apresentam na posição 5522 (X54253), o nucleotídeo T, característico de *A. lumbricoides*, enquanto em *Ascaris suum* essa posição é ocupada por um nucleotídeo C. Nove das seqüências nucleotídicas antigas analisadas possuem diferenças nucleotídicas não observadas nas seqüências nucleotídicas modernas tanto de *A. lumbricoides* quanto de *A. suum*, sendo que algumas dessas diferenças se repetem em amostras de sítios arqueológicos diferentes e com datações diferentes. Sete das seqüências nucleotídicas antigas analisadas possuem identidade total com a seqüência de *A. lumbricoides* moderna (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação das seqüências nucleotídicas de fragmento do gene cit b de *Ascaris* sp das amostras arqueológicas analisadas neste estudo com seqüências nucleotídicas modernas e antiga de *Ascaris* sp.

Amostras	Posição no genoma mitocondrial de <i>A. suum</i> X54253						
	5489	5492	5522	5531	5554	5555	5562
<i>A. suum</i> , moderno X54253	A	T	C	G	C	T	G
<i>A. lumbricoides</i> , moderno Loreille et al 2001	A	T	T	G	C	T	G
<i>A. lumbricoides</i> , moderno EF150649-53 Loreille et al 2001	A	T	T	G	C	T	G
<i>Ascaris</i> sp antigo (Namur, Bélgica) Loreille et al 2001	G	T	T	A	C	T	G
389 ovos (clone 1)	A	C	T	G	C	T	G
389 ovos (clone 2)	A	T	T	G	C	T	G
389 sedimento (clone 1)	A	T	T	G	G	T	A
1380 ovos (clone 1)	A	T	T	G	G	T	G
1380 ovos (clone 2)	A	T	T	G	A	C	G
1380 ovos (clone 3)	A	T	T	G	C	T	G
1380 ovos	A	T	T	G	C	T	G
1380 sedimento (clones 1, 2 e 3)	A	T	T	G	C	T	G
1384 ovos (clone 1)	A	T	T	G	G	T	G
22f (clone 1)	A	T	T	G	G	T	G
47 (clone 1)	A	C	T	G	C	T	G
47 (clone 2)	A	T	T	G	C	T	G
714 (clone 1)	A	C	T	G	C	T	G
1216s (clone 2)	A	T	T	G	G	T	G

Legenda:

- Similaridade entre as seqüências nucleotídicas.
- Nucleotídeo característico de *A. suum*.
- Nucleotídeo característico de *A. lumbricoides*.
- Diferenças nucleotídicas únicas entre seqüências antigas e atuais.
- Diferenças nucleotídicas entre seqüências antigas e atuais compartilhadas entre duas ou mais seqüências antigas.
- deleção nucleotídica.

A tradução da seqüência de ADN do fragmento de cit b para a seqüência de proteína, mostrou que 5/16 seqüências antigas possuem um aminoácido (S) na posição 31 no alinhamento e 1/16 um aminoácido (N) nesta mesma posição, que é ocupada por um aminoácido (T) nas seqüências modernas. Uma dessas dezesseis seqüências também apresentou um aminoácido (T) na posição 34, enquanto essa é ocupada por um aminoácido (A) nas seqüências modernas. Resultando em duas substituições sinônimas e três não sinônimas (Figura 26).

Figura 26: Alinhamento das seqüências de aminoácidos feito a partir das seqüências nucleotídicas do fragmento do gene cit b de *Ascaris* sp das amostras arqueológicas analisadas neste estudo com seqüências nucleotídicas modernas e antiga de *Ascaris* sp.

	5	15	25	35	45
As, moderno X54253	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
Al, moderno Loreille et al 2003	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
Al, moderno EF150649-53	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
Asp antigo Loreille et al 2003	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
389 ovos (clone 1)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
389 ovos (clone 2)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
389 sedimento (clone 1)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	SFLTFYYSND	GALAFLS
1380 ovos (clone 1)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	SFLAFYYSND	GALAFLS
1380 ovos (clone 2)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	NFLAFYYSND	GALAFLS
1380 ovos (clone 3)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
1380 ovos	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
1380 sedimento (clones 1,2 e 3)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
1384 ovos (clone 1)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	SFLAFYYSND	GALAFLS
22f (clone 1)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	SFLAFYYSND	GALAFLS
47 (clone 1)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
47 (clone 2)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
714 (clone 1)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	TFLAFYYSND	GALAFLS
1216s (clone 1)	VSLPSSKVL	YGWNFGSMLG	MVLGFQILTG	SFLAFYYSND	GALAFLS

Legenda: similaridade entre as seqüências de aminoácidos; diferenças de aminoácidos entre as seqüências modernas e antigas compartilhadas entre duas ou mais seqüências; diferenças de aminoácidos únicas entre as seqüências modernas e antigas; *As Ascaris suum*, *Al Ascaris lumbricoides*, *Asp Ascaris* sp.

O diagnóstico paleoparasitológico molecular mostrou-se aproximadamente 166,66 % mais sensível em detectar o parasito *A. lumbricoides* quando comparado ao diagnóstico paleoparasitológico por microscopia ótica (Tabela 13).

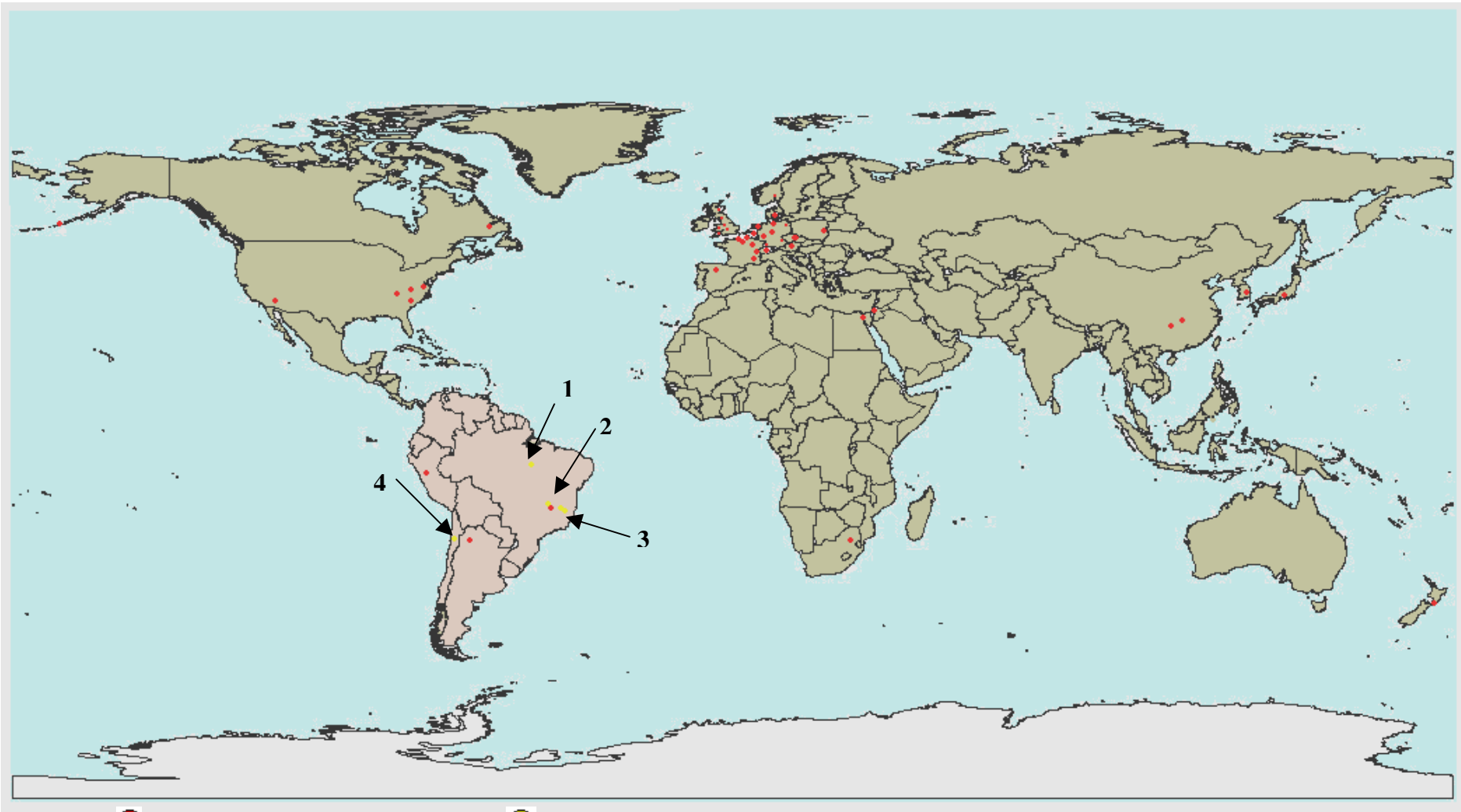
Tabela 13: Comparabilidade da eficiência de diagnóstico paleoparasitológico de *A. lumbricoides* por microscopia ótica e por diagnóstico paleoparasitológico molecular.

Amostras	DMO	DM	DMS
22c	-	-	-
22f	-	+	+
24a	?	+	-
24as	?	-	-
47	-	+	+
47s	-	-	-
213	-	-	-
714	-	+	+
1216	-	-	-
1216s	-	+	+
389	+	+/+	+
1380	+	+/+	+
1384	+	+*	+
Total 13	3	8	7

Legenda: DMO diagnóstico por microscopia ótica, DM diagnóstico molecular, DMS diagnóstico molecular com resultado de seqüenciamento nucleotídico, + diagnóstico positivo; - diagnóstico negativo, ? Ascarídeo, +* positiva para ovos isolados. +/+ positivo para ovos isolados e sedimento. Sítios arqueológicos e datações das amostras (Tabela 4).

O uso do diagnóstico paleoparasitológico molecular permitiu a identificação do parasito *A. lumbricoides* em sítios arqueológicos sul-americanos, onde ainda não havia sido evidenciado. Mostrou-se com o diagnóstico paleoparasitológico molecular que o parasito estava presente na América do Sul há mais de 8000 anos. O mapa da nova paleodistribuição para *A. lumbricoides* está na Figura 27.

Figura 27. Nova paleodistribuição de *Ascaris lumbricoides* incluindo os resultados deste estudo.



Legenda: ● diagnóstico por microscopia ótica; ● diagnóstico molecular. Os sítios arqueológicos onde foram identificada a presença do parasito neste estudo estão indicados por setas. 1: Sítio do Meio, PI; 2: Gruta do Gentio II, MG; 3: Lapa Pequena, MG; 4: Tulán, San Pedro de Atacama, Chile.

5 DISCUSSÃO

5.1 Diagnóstico molecular de *A. lumbricoides* em amostras fecais

A maior parte de estudos moleculares envolvendo o parasito *A. lumbricoides* provém de isolados de países asiáticos, principalmente da China, país com mais de 500 milhões de pessoas infectadas (Zhu et al 1999, 2000, Peng et al 2003, 2005, 2006). O interesse desses estudos advém do fato de infecção cruzada entre as espécies humana e do suíno já ter sido relatada (Anderson 2001). A preocupação principal é a resistência aos anti-helmínticos observada em parasitos de várias espécies animais, dentre elas os suínos, nas mais diversas partes do mundo (Anderson 2001, Coles et al 2006). Portanto, é importante saber se a espécie humana infecta-se, e com que frequência, com o parasito de suíno. As espécies que parasitam animais são mais propensas a se tornarem resistentes aos anti-helmínticos, pois a taxa de resistência é determinada principalmente pela alta frequência e intensidade do tratamento que é maior nos animais quando comparadas a população humana (Prichard 2001). A possibilidade da população humana ser infectada com uma espécie de parasito resistente aos anti-helmínticos é um ponto importante para os programas de controle da ascaríase. Por isso, é preciso entender a própria epidemiologia da infecção, sendo essencial às ferramentas de técnicas moleculares (Peng et al 2006).

Os estudos moleculares de *Ascaris sp* têm usado larvas e/ou vermes adultos, ou um *pool* de ovos isolados através de técnicas parasitológicas de flotação (Szymanski et al 1996, Zhu et al 1999 e 2000, Ishwata et al 2004, Peng et al 2003, 2005, Nejsun et al 2005, 2006). Não se aplicaram ainda técnicas moleculares para diagnóstico de *Ascaris sp* em material fecal, o que dificulta estudos, principalmente nos países como o Brasil, em que o anti-helmíntico empregado destrói os vermes adultos e/ou larvas antes que esses sejam expelidos.

Pesquisas moleculares que usaram ovos isolados de nematóides têm considerado o uso de tratamentos físico como a utilização de: nitrogênio líquido, ultra-som, pérolas de vidro, choque térmico combinado com extração química, fenol-clorofórmio, dentre vários outros Kits comerciais disponíveis (Zhu et al 2000, Loreille et al 2001, Šlapeta et al 2002, Harmon et al 2006). No entanto, pesquisas moleculares envolvendo helmintos parasitos são ainda escassas quando comparadas a outros grupos de organismos (Lukes et al 2005).

Neste trabalho mostrou-se que ambos os tratamentos de extração de ADN (tratamento físico por choque térmico e físico-químico: choque térmico - fenol clorofórmio) foram eficientes para disponibilizar ADN suficiente para PCR, sendo sensível para detectar apenas um ovo usando ambos os alvos moleculares (cit b gene e região ITS 1). A eficiência do tratamento físico usado poderá reduzir os custos com a extração de ADN, assim como o tempo de trabalho em pesquisas que envolvam grande número de amostras, já que seria necessário isolamento de apenas um ovo.

Vários nematóides como *Necator americanus*, *Ancylostoma* sp, *E. vermicularis*, *Oesophagostomum bifurcum*, *Strongylus vulgaris*, *Cyathostomum catinatum*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus longibursatus* ou *Cylicostephanus goldi.*, dentre outros, tiveram ADN extraídos e amplificados diretamente de fezes animais e humanas (Hung et al 1999, Verweij et al 2001, Iñiguez 2002, Traub et al 2004). A maioria desses estudos propõe diagnósticos e caracterização molecular para as espécies supracitadas.

Neste estudo, inicialmente a extração de ADN das amostras fecais foi feita usando-se o tratamento químico ou Kit comercial sem tratamento físico prévio, não se obtendo resultados satisfatórios. Os ovos de *Ascaris* sp são muito resistentes ao meio externo, sendo protegidos por uma casca de aproximadamente 4,5 µm de espessura, composta de quatro camadas que de fora para dentro são: uma casca impermeável a substâncias externas (exceto gases e solventes de lipídeos), uma membrana vitelina, uma camada de quitina rígida e uma

camada lipídica resistente à dessecação e a penetração de substâncias polares (Quilés et al 2006). Por isso acreditamos que o tratamento físico foi essencial para quebra dos ovos e conseqüentemente liberação de ADN para as amplificações.

Das amostras positivas para *A. lumbricoides* ao exame parasitológico, somente 1/14 amostras (DL18) não amplificou o alvo molecular cit b, aplicando-se o tratamento físico-químico, e 4/14 (DL04, DL08, DL14 e DL18) não amplificaram quando o tratamento usado foi o físico/Kit comercial. As amostras DL04 e DL08, PCR positivo pelo tratamento físico-químico, além de constatar durante a análise parasitológica através de microscopia ótica a pouca quantidade de ovos, na extração de ADN necessitaram de segunda purificação e/ou PCR reconstitutiva para gerar os amplicons alvos. Assim como para as amostras DL04 e DL08, o método físico-Kit comercial não se mostrou eficiente na recuperação de ADN do parasito da amostra DL14, já que essas amostras não apresentavam inibidores, pois amplicons usando-se o alvo molecular humano *cox II* foram gerados.

Para o alvo molecular região ITS1, somente 2/14 amostras positivas para *A. lumbricoides* (DL18 e DL08) não amplificaram quando usado o tratamento físico-químico, sendo que a amostra DL18 já não havia amplificado para o alvo gene cit b e a DL08 havia necessitado de segunda purificação e/ou PCR reconstitutiva para gerar o amplicom esperado. Quando usado o tratamento físico - Kit comercial 5/14 amostras (DL04, DL05, DL08, DL14 e DL18) não amplificaram, sendo que quatro delas já não haviam amplificado para o alvo gene cit b.

Além dos problemas específicos já pontuados, a região ITS 1 apresenta menos cópias no genoma quando comparada à região mitocondrial cit b, talvez por isso mais amostras não tenham amplificado quando usado esse alvo molecular. Os resultados apontam que alternativas como reamplificação, segunda purificação, PCR reconstitutiva e diluições do ADN devem ser usadas principalmente para o método físico - Kit comercial que se mostrou

eficiente na remoção de inibidores, mas com baixa recuperação de ADN quando comparado ao método físico-químico. Pelos bons resultados para ambas as metodologias de extração de ADN empregadas neste estudo, recomendamos também o uso do tratamento físico-kit comercial para diagnóstico em amostras fecais devido à toxicidade dos reagentes do método fenol-clorofórmio.

O ensaio do RFLP da região ITS 1 para diferenciar as espécies de *Ascaris* sp já havia sido aplicado por outros pesquisadores em vermes adultos (Zhu et al 1999). Neste estudo, nós demonstramos que a metodologia RFLP proposta ao ADN extraído de amostras fecais, pode ser aplicado também em isolados brasileiros, como uma alternativa para diagnóstico rápido, poupando tempo e gastos com seqüenciamento nucleotídico, principalmente em pesquisas que envolvam grande número de amostras.

O resultado do seqüenciamento nucleotídico para o fragmento do gene *cit b* mostrou que os isolados brasileiros correspondem à espécie *A. lumbricoides* pela presença do nucleotídeo T na posição 5522 quando comparado a *A. suum* (número de acesso X54253) (Loreille et al 2001). Apesar do pouco número de seqüências nucleotídicas analisadas para região ITS 1, a maioria corresponde ao genótipo G1, o mais prevalente na espécie humana. Dentro dos cinco genótipos de *A. lumbricoides* descritos, o genótipo G1 foi o mais encontrado em hospedeiros humanos em todos os estudos realizados que incluem países como a China, Japão e Bangladesh (Zhu et al 1999, Peng et al 2003, Ishiwata et al 2004). Portanto nossos resultados mostram que como no resto do mundo, aparentemente o G1 é o mais encontrado na população humana brasileira. Embora tenha alta similaridade com o G1, o outro tipo de seqüência nucleotídica encontrada possui uma deleção na posição 129, não observada em nenhuma outra seqüência nucleotídica de *A. suum* ou *A. lumbricoides*. No momento estamos trabalhando na verificação desta substituição nucleotídica em outros isolados brasileiros. Nenhum outro genótipo foi observado. A afinidade por um/ou outro hospedeiro tem sido

confirmada por estudos de infecção experimental. Suínos infectados com ovos do G3, o genótipo mais prevalente em suínos, estabeleceram infecção, não ocorrendo o mesmo com o G1 (Peng et al 2006).

Atualmente estamos na fase de seqüenciamento nucleotídico da região ITS 1, para genotipagem dos outros isolados deste estudo. Iremos incluir em nossas pesquisas os marcadores *cox1* e *nad1* que têm mostrado maior discriminação das espécies (Peng et al 2005). No entanto é preciso aumentar o número de amostras e se possível, incluir amostras fecais de suínos.

5.2 Coprólitos experimentais

Coprólitos experimentais elaborados a partir de fezes humanas contendo ovos de *T. trichiura* e ancilostomídeos foram desenvolvidos em estudo paleoparasitológico para avaliar os efeitos da dessecação sob a morfologia dos ovos e, conseqüentemente, o diagnóstico da espécie pela morfometria (Confalonieri et al 1988, Araújo 1988). Este estudo mostrou que na maioria das amostras ocorriam alterações mínimas na morfologia dos ovos e que não comprometiam a identificação dos parasitos intestinais analisados.

Posteriormente, com o desenvolvimento das ferramentas de diagnóstico molecular, coprólitos experimentais foram desenvolvidos para simular a dessecação e aproximar ao máximo possível dos coprólitos provenientes de sítios arqueológicos e assim aplicar a técnica para padronizar antes de aplicá-la no material arqueológico (Iñiguez 1998). Após inoculação de *Vibrio cholerae* e *Bacillus sphaericus* em fezes frescas e posterior dessecação artificial conseguiu-se recuperação de material genético através da técnica de PCR, somente de *Bacillus sphaericus*. A justificativa dos autores foi por essa ser uma bactéria esporuladora e Gram-positiva (Iñiguez, 1998).

Em nosso trabalho observamos que o número de ovos diminuiu após a dessecação induzida e o número de quebras intensas aumentou consideravelmente quando comparado às amostras atuais correspondentes. Posteriormente pretendemos avaliar a quantidade e a intensidade das quebras desses ovos com validação estatística. Interessantemente, a amostra DL04-I que já apresentava pouca quantidade de ovos no material fresco e dificuldades de amplificação enzimática, o número de ovos diminuiu drasticamente após dessecação. Nessa amostra em específico, foi necessário o preparo de três lâminas para que se observasse um ovo, mostrando assim que o mesmo poderia ocorrer com os coprólitos durante as análises paleoparasitológicas.

A metodologia padronizada nas amostras fecais se adequou bem ao trabalho com os coprólitos experimentais. Para o tratamento físico-químico usando o alvo gene *cit b*, somente uma das amostras não amplificou (DL02-I), mas é uma das amostras que necessitou de uma segunda purificação e também não amplificou para o alvo molecular humano *cox II*, revelando que a amostra ainda continha inibidores. A amostra DL13-I somente amplificou depois de uma segunda purificação. Já para o alvo molecular ITS 1, trabalhamos com ADN diluído e semi-nested, aumentando assim a quantidade de ADN bem como diluindo os inibidores, possibilitando a amplificação da amostra DL02-I.

Pelo método físico-kit apenas uma amostra (DL13-I) não amplificou quando o alvo molecular usado foi o *cit b*. Para o alvo molecular ITS 1 duas amostras (DL02-I e DL13-I) que já haviam necessitado de semi-nested no material atual não amplificaram.

Como observado em outros trabalhos com coprólitos experimentais a dessecação induzida interferiu na recuperação de ADN de algumas amostras (Iñiguez et al 1998, 2002a). Algumas das fezes frescas que tinham amplificado para *cit b* e ITS 1 não amplificaram quando transformadas em coprólitos experimentais. Estratégias como segunda purificação e diluições das amostras, assim como, semi-nested que já havia sido usado nas amostras fecais,

foram essenciais para as ampliações.

Porém, as modificações da metodologia padronizada nas amostras fecais para o trabalho com coprólitos experimentais foram mínimas, quando comparada ao estudo de Iñiguez et al (2002a), que trabalhou com coprólitos experimentais elaborados a partir de fezes humanas contendo ovos de *E. vermicularis*. Acreditamos que isso foi devido principalmente a alta resistência dos ovos de *A. lumbricoides* quando comparada aos ovos menos resistentes do parasito *E. vermicularis*. Pois embora a dessecação tenha diminuído a quantidade de ovos e aumentado às quebras destes, muitos ainda permaneceram intactos preservando o ADN das larvas contida nos ovos.

Ambas as metodologias padronizadas nas amostras fecais e adaptadas aos coprólitos experimentais tiveram excelente rendimento, já que todas as amostras amplificaram para ambos os alvos moleculares usando-se um e/ou outro método de extração de ADN. O RFLP das amostras assim como o seqüenciamento nucleotídico, comprovaram não ter havido nenhuma alteração na seqüência nucleotídica das amostras.

5.3 Diagnóstico paleoparasitológico molecular de *A. lumbricoides* em coprólitos

O único estudo com ADN antigo de *A. lumbricoides* usou de 100-300 ovos isolados, de amostra de latrina do século XIV, proveniente do sítio arqueológico de Places d'Armes em Namur, Bélgica, devido principalmente as dificuldades do trabalho direto com coprólitos. (Loreille et al 2001). No entanto achados de ovos de *Ascaris* sp em amostras do período pré-colombiano da América do Sul são muito raros e em baixíssima quantidade.

O diagnóstico molecular proposto neste estudo, usando o tratamento físico-químico revelou sensibilidade suficiente para detectar o alvo molecular do fragmento do gene cit b em apenas 30 ovos de *Ascaris* sp. Este resultado é de grande importância para o estudo de

coprólitos provenientes de sítios arqueológicos da América do Sul. Como as amostras provêm de sítios arqueológicos e/ou camadas diferentes, os processos tafonômicos aos quais foram submetidas podem ter sido diferentes, assim como a qualidade do ADN recuperado pode diferir para cada amostra. Não necessariamente a evidência de muitos ovos significa boa qualidade de ADN. Isso pode ser evidenciado pelas fotos da microscopia ótica, onde a maioria dos ovos recuperados não apresenta evidências de larvas no interior, havendo muitas cascas nitidamente vazias (Figuras 8 C e D).

Para o sedimento de uma das amostras positivas não foi possível amplificação do fragmento do gene *cit b* de *Ascaris* sp, para ambas as metodologias de extração de ADN aplicadas. Acreditamos que o problema não está em inibidores da reação de PCR, já que a mesma amplificou para ADN mitocondrial humano. Possivelmente, o problema está na baixa qualidade e pouca concentração de ADN antigo disponível de *Ascaris* sp nessa amostra. Estudos que tem associado fatores tafonômicos e qualidade de ADN recuperado têm apontado que mesmo as amostras provenientes de mesmo local passam por processos tafonômicos diferentes. Cada amostra tem suas particularidades e passaram por processos diferentes que vão desde o processo de fossilização à pós escavação e armazenagem do material, logo cada amostra tem um histórico de fossilização, sendo, portanto, única (Pruvost et al 2007).

Os resultados do diagnóstico paleoparasitológico tradicional das amostras provenientes dos sítios arqueológicas sul-americanos, selecionadas para este estudo, não identificaram o parasito *A. lumbricoides* (Ferreira et al 1980, 1982 e 1983, Gonçalves et al 2003). No entanto o diagnóstico paleoparasitológico molecular mostrou que os achados de *Ascaris* sp podem ser mais freqüentes do que os exames paleoparasitológicos tradicionais têm apontado. Isto, provavelmente se deva ao baixíssimo número de ovos preservados nas amostras.

Além de todos os cuidados tomados para o trabalho com ADN antigo, 9/16 seqüências

nucleotídicas obtidas neste estudo diferem das modernas, afastando a possibilidade de contaminação. O gene *cit b* é altamente conservado entre as espécies, por isso acreditamos que algumas das seqüências nucleotídicas não tenham sofrido alteração no intervalo de tempo estudado e tenham tido identidade total com o fragmento do gene *cit b* de *A. lumbricoides* moderno. Apesar das diferenças nucleotídicas encontradas, como todas apresentaram o nucleotídeo T5522, sugerimos a presença de *A. lumbricoides* nos coprólitos estudados.

Previamente, ovos de *Ascaris* sp e outros parasitos foram identificados nas amostras provenientes do sítio de Walraversijde (Bélgica), datadas do século XVI (Fernandes et al 2005). Nesse estudo, as análises estatísticas das medidas de ovos de *Trichuris* sp associadas aos ovos de *Ascaris* sp mostraram que a espécie de *Trichuris* sp era *T. trichiura*. Atestando assim, a origem humana do material e consequentemente classificando a espécie de *Ascaris* sp como *A. lumbricoides*. Nosso estudo de diagnóstico molecular confirma a identificação da espécie *A. lumbricoides* nestas amostras medievais.

Em que pesem as argumentações de Fonseca (1972) sobre a ausência de *A. lumbricoides* na população pré-colombiana ser um fator indicativo de origem transpacífica a partir de grupos pré-históricos polinésios, inicialmente não parecia coerente que somente o parasito *T. trichiura* estivesse presente no período pré-colombiano da América, já que o ciclo de transmissão é tão semelhante ao de *A. lumbricoides*. Some-se a isso a associação parasitária, encontrada na maioria dos demais sítios arqueológicos do mundo. Ao mesmo tempo, a forte resistência da casca dos ovos de *A. lumbricoides* parecia indicar que esse parasito estaria também presente na América do Sul, já que os ovos de *T. trichiura* se preservaram. No entanto, o que se observa nos coprólitos sul-americanos é uma baixíssima quantidade de ovos desses parasitos quando comparados a outros sítios arqueológicos.

Estudos envolvendo coprólitos humanos de sítios arqueológicos brasileiros, tais como Pedra Furada no Piauí, que possuíam ovos de ancilostomídeos, têm revelado fortes evidências

da existência de polens de plantas medicinais com potencial anti-helmíntico. Os estudos sugerem o uso dessas plantas para controle da infecção (Chaves e Renault-Miskovsky 1996, Chaves e Reinhard 2003 e 2006). O uso de plantas medicinais, somado aos fatores tafonômicos e de ordem temporal, poderiam ter contribuído para baixa quantidade de ovos encontrada nessas amostras. Resultados palinológicos preliminares em uma das amostras aqui estudadas (47, Lapa Pequena, MG), revelaram a existência de dois gêneros de plantas medicinais, *Justicia* sp e *Eupatorium* sp (Figura 28 A, B e C). Espécies *Eupatorium* sp possuem potencial larvicida comprovado cientificamente e são usadas na medicina popular como vermífugo (Schossler et al 2006). Some-se a isso o fato de trabalhos que avaliaram a eficácia de drogas anti-helmínticas contra os parasitos *A. lumbricoides* e *T. trichiura* sempre terem apontado eficiência de praticamente 100% na destruição do parasito *A. lumbricoides* e baixa eficiência na eliminação de *T. trichiura* (Muchiri et al 2001, Legesse et al 2002, Zani et al 2004, Saathoff et al 2004).

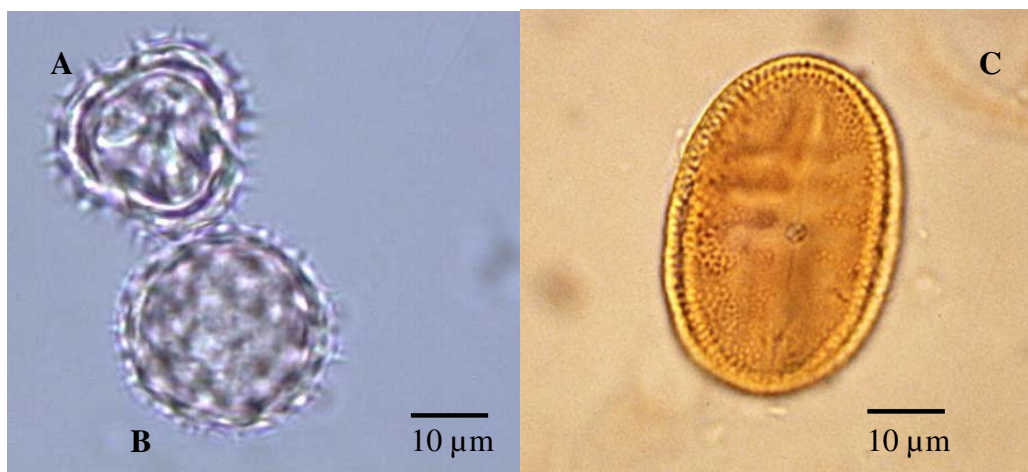


Figura 28 A, B e C. A/B: *Eupatorium* sp, A: vista polar, B: vista equatorial (Fonte: <http://rge.fmrp.usp.br/polen/banco.htm>). C: *Justicia* sp, vista equatorial (Fonte: Sérgio Miranda Augusto Chaves).

Atualmente tem sido muito estudado o uso de fungos nematófagos para controle biológico de helmintos parasitos de animais como bovinos, caprinos, eqüinos, suínos, dentre outros (Larsen 1999, Mota et al 2003). Tais fungos, que fazem parte do meio ambiente natural, agem principalmente no material fecal, promovendo a quebra de ovos dos parasitos

intestinais (Mota et al 2003). Varias espécies desses fungos têm sido encontradas naturalmente em cidades próximas às regiões onde ficam os sítios arqueológicos de onde provêm as amostras estudadas, tais como Arinas (Ribeiro et al 1999) próxima a Unaí onde fica o sítio arqueológico Gruta do Gentio II, Janaúba e Porteirinha (Ribeiro et al 2003) próximas a cidade de Varzelândia, onde fica o sítio arqueológico Boqueirão Soberbo e Montes Claros onde fica o sítio arqueológico Lapa Pequena. Esses fungos também poderiam estar presentes em tempos passados, agindo diretamente na quebra de ovos de nematódeos e contribuindo para diminuição da quantidade desses ovos. Temos verificado em nossas amostras a existência de esporos de fungos. Existem diversos estudos que classificam esses esporos em material até mesmo paleontológico (Carvalho 2003), devido principalmente ao alto nível de preservação dos mesmos e diferenças morfológicas e de coloração. Futuramente temos a intenção de verificar se os esporos de fungos encontrados em nossas amostras pertencem ao grupo de fungos nematófagos.

Além desses fatores, estudos experimentais têm apontado que em determinadas concentrações de amônia e pH associadas principalmente a altas temperaturas não só ocorre inativação de larvas de *A.suum*, *A. lumbricoides* e *Trichuris muris* como há destruição de seus ovos (Ghiglietti et al 1995, Pecson e Nelson 2005). Portanto esses fatores poderiam estar contribuindo para o baixo número de ovos encontrados nas amostras dos sítios arqueológicos estudados.

Nosso estudo pode vir a somar às demais pesquisas que tentam esclarecer a origem e evolução da infecção por *Ascaris* sp (Anderson 2001, Loreille et al 2001, Loreille e Bouchet 2003). Uma vez que nosso estudo mostrou uma nova paleodistribuição para o parasito *A. lumbricoides*, onde achados na América do Sul pré-colombiana que se limitavam a Huarmey Valley no Peru, são mais frequentes do que se pensava. A presença do parasito foi verificada pela primeira vez, em diferentes sítios arqueológicos temporalmente e geograficamente

distantes como: Sítio do Meio – PI (8800 AP); Lapa Pequena e Gruta do Gentio II – MG (3490 ± 120 a 430 ± 70 AP); e Tulán, São Pedro do Atacama, Chile (3080 - 2950 AP). Especificamente na Gruta do Gentio II já havia sido verificada a presença de ovos de ascarídeos (Gonçalves et al 2003). Nosso estudo confirma a presença de *A. lumbricoides* nessa região. Adicionalmente nosso estudo evidencia a presença do parasito em período muito anterior ao que os estudos paleoparasitológicos por microscopia ótica têm relatado. Nós verificamos a presença do parasito em coprólito datado de 8800 AP em Sítio do Meio, Piauí. O achado mais antigo relatado era o do sítio arqueológico Huarmey Valey, Peru datado de 2277 ± 181 AC (Patrucco et al 1983).

A maioria das amostras provenientes dos sítios arqueológicos sul-americanos do nosso estudo, previamente estudadas por microscopia ótica havia evidenciado ovos de *T. trichiura*, próprio do hospedeiro humano. Nos testes moleculares, a maioria dessas amostras foi positiva para *A. lumbricoides*. Confirma-se, portanto, com uso das técnicas de biologia molecular, a presença de infecção por *A. lumbricoides* em populações pré-colombianas na América do Sul assim como a existência da associação parasitária *A. lumbricoides* - *T. trichiura*.

No entanto esse é um estudo preliminar que envolveu uma pequena amostragem, mas outros marcadores moleculares, tais como ITS 1, *cox1* e *nad1* serão incluídos na continuidade deste trabalho, assim como o número de amostras abrangerão outros sítios arqueológicos das Américas, especialmente na região austral da Patagônia, onde recentemente se registraram ovos de ascarídeos em coprólitos humanos (Fugassa et al 2006).

6 CONCLUSÕES

Nesse estudo nós estabelecemos pela primeira vez metodologias de diagnóstico parasitológico molecular para *A. lumbricoides*, a partir de material fecal e mostramos que estas são aplicáveis aos coprólitos experimentais e diretamente a coprólitos.

Diagnóstico parasitológico molecular de *A. lumbricoides* em amostras fecais

O tratamento físico (choque térmico) prévio à extração química do ADN é essencial para o sucesso das metodologias.

O tratamento de extração de ADN pelo método físico/fenol-clorofórmio foi mais eficiente que o tratamento físico/Kit comercial modificado.

Ambos os tratamentos de extração de ADN: físico e físico/fenol-clorofórmio disponibilizaram ADN suficiente para PCR usando-se apenas um ovo para os dois alvos moleculares.

O ensaio de RFLP para diferenciar as espécies *A. lumbricoides* e *A. suum* pode ser usado em ADN extraído de amostras fecais de isolados brasileiros.

O trabalho gerou as primeiras seqüências nucleotídicas de ITS 1 de *A. lumbricoides* da América do Sul.

Os isolados brasileiros de *A. lumbricoides* correspondem ao genótipo G1, o mais prevalente na população humana.

Coprólitos experimentais

A dessecação induzida diminuiu a quantidade de ovos e aumentou o seu número de quebras.

A metodologia aplicada a coprólitos experimentais permitiu identificar que estratégias como: diluições, purificações e *nested* PCR proporcionam a recuperação e amplificação do ADN degradado.

Material arqueológico

As modificações introduzidas na metodologia como PCR reconstrutiva, reamplificação e purificações adicionais foram essenciais para recuperação e amplificação de ADNa de fragmento do gene *cit b* de *Ascaris* sp.

Não houve diferença na eficiência entre os dois métodos de extração do ADN antigo

A sensibilidade do diagnóstico paleoparasitológico molecular foi de 30 ovos.

O diagnóstico paleoparasitológico molecular foi capaz de identificar o parasito em amostras negativas ao exame paleoparasitológico por microscopia ótica.

Deve-se fazer o exame paleoparasitológico por microscopia ótica previamente ao exame paleoparasitológico molecular.

Todas as seqüências nucleotídicas obtidas são de *A. lumbricoides*.

A presença do parasito *A. lumbricoides* foi verificada em diversos sítios arqueológicos sul-americanos desde o nordeste do Brasil até o norte do Chile.

A presença de *A. lumbricoides* no continente sul-americano é de pelo menos 8800 AP.

MAPA 1 – Distribuição paleogeográfica de *Trichuris trichiura*

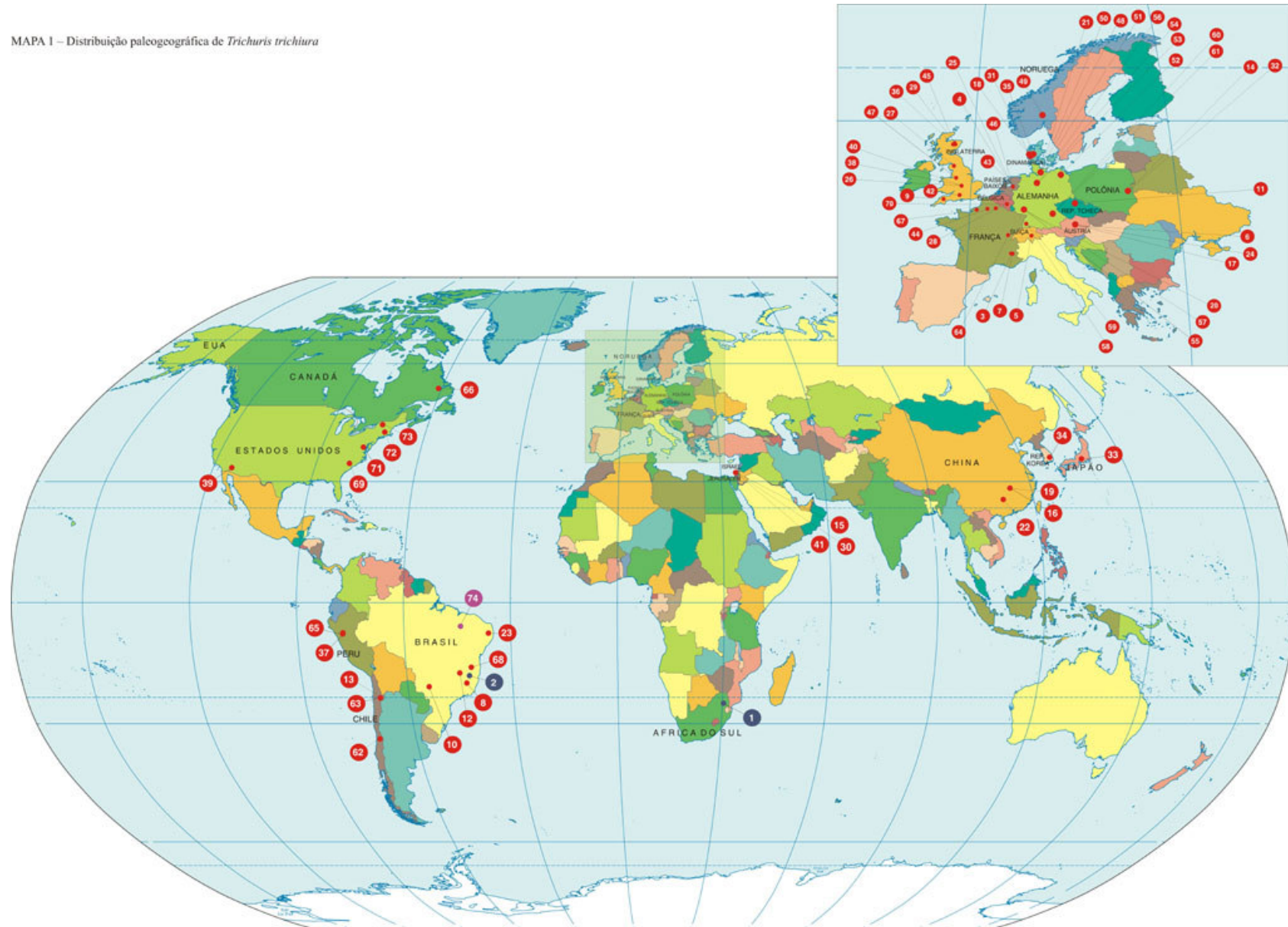


Figura 3: Paleodistribuição de *Ascaris lumbricoides* através de diagnóstico por microscopia ótica.

Sítio arqueológico/múmia (País) Datações	Sítio arqueológico/múmia (País) Datações	Sítio arqueológico/múmia (País) Datações	Sítio arqueológico/múmia (País) Datações
1 Grand Grotte, Arcy-sur-Cure, Yonne (França) 30, 160 ± 140 – 24, 660 ± 330 AP	19 Lindow Man, Manchester (Inglaterra) 1900 AP	37 Amsterdam (Países Baixos) 630 – 575 AP	55 Newport, Rhole Isand (EUA) 300 AP
2 Kruger Cave, Rustenburg (África do Sul) * 10, 000 – 7000 AP	20 Bobigny (França) 1900 AP	38 Worcester (Inglaterra) 600 AP	56 Namur (Bélgica) 300 AP
3 Clairvaux, Jura (França) * 5600 AP	21 York (Inglaterra) ** 1900 - 1800 AP	39 Oslo (Noruega) 600 AP	57 Williamsburg, Virginia (EUA) 280 AP
4 Arbon, Thurgau (Suíça) * 5384 – 5370 AP	22 Karwinden Man, antiga Prússia (Polónia) 1500 AP	40 Lübeck (Alemanha) 600 AP	58 Wellington (Nova Zelândia) 150 – 200 AP
5 Chalain, Jura (França) * 4700 – 4440 AP	23 Fujiwara-Kyo (Japão) 1400 – 1290 AP	41 Montbeliard (França) 600 – 500 AP	<input type="checkbox"/> Saqqara (Egito) 2715 - 2656 AP; Harter et al 2003.
6 Huarmey Valley 4277 BC ± 181 AP	24 Chilgok-gun, Taegu-city (Rep. Korea) 1332 - 1065 AP	42 Schleswig (Alemanha) Idade Medieval	<input type="checkbox"/> *El Potrero de Santa Lucía, Catamarca (Argentina) 470 ± 200 AC a 310 ± 90 AD; Pau e tal 2005.
7 Somerset (Inglaterra) 4100 – 2600 AP	25 Ribe (Dinamarca) 1250 - 1200 AP	43 Berlin (Alemanha) Idade Medieval	<input type="checkbox"/> St Isidoro Collegiate-Basilica, Leon (Espanha) Século X-XIII; Hidalgo-Argüelo et al 2003.
8 Hulin, Central Moraiva (Rep. Tcheca) 3600 – 3500 AP	26 York (Inglaterra) 1200 – 1000 AP	44 Braunschweig (Alemanha) Idade Medieval	
9 Gentio Cave, Minas Gerais (Brasil) 3490 ± 120 – 430 ± 70 AP	27 Antelope House, Arizona (EUA) 1100 – 750 AP	45 Hameln (Alemanha) Idade Medieval	
10 Upper Salts Cave, Kentucky (EUA) 3125 – 2290 AP	28 Winchester (Inglaterra) 1000 AP	46 Höxter (Alemanha) Idade Medieval	
11 Drobintz girl, antiga Prússia (Polónia) 2600 AP	29 Elden Pueblo, Arizona (EUA) 930 - 750 AP	47 Göttingen (Alemanha) Idade Medieval	
12 Hallsatt (Áustria) 2300 AP	30 Winchester (Inglaterra) ** 900 AP	48 Marburg (Alemanha) Idade Medieval	
13 Múmia PUM II (Egito) 2200 AP	31 Adak Island, Alaska (EUA) 840 ± 40 AP	49 Freiburg (Alemanha) Idade Medieval	
14 Big Bone Cave, Tennessee (EUA) 2177 ± 145 AP	32 Acre (Israel) 800 AP	50 Breisach (Alemanha) Idade Medieval	
15 Bremerhaven (Alemanha) 2100 – 1500 AP	33 Utrecht (Países Baixos) 800 – 700 AP	51 Regensburg (Alemanha) Idade Medieval	
16 Hallein, Salzburg (Áustria) 2000 AP	34 Southampton (Inglaterra) 800 – 700 AP	52 Landshut (Alemanha) Idade Medieval	
17 Valkenburg on Rhine (Países Baixos) 1958 – 1900 AP	35 Paris (França) 700 – 600 AP	53 Newfoundland (Canadá) ** 400 AP	
18 Winchester (Inglaterra) ** Idade Romana	36 York (Inglaterra) 700 – 500 AP	54 Marly-le-Roy, Yveline (França)** 400 - 300 AP	

Legenda: * diagnóstico incerto; **origem humana incerta; achados que não constam no mapa.

Numeração em ordem cronológica. Fonte: modificado de Gonçalves et al 2003; Leles et al 2004.