

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



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

por

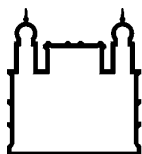
Daniela Leles de Souza

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

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

Segunda orientadora: Prof^a. Dr^a. Alena Mayo Iñiguez

Rio de Janeiro, julho de 2010.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta tese, intitulada

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

apresentada por

Daniela Leles de Souza

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello

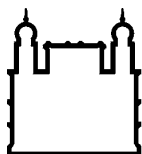
Prof. Dr. Marcelo Luiz Carvalho Gonçalves

Prof. Dr. Francisco Inácio Pinkusfeld Monteiro Bastos

Prof. Dr. Luiz Fernando Rocha Ferreira da Silva

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

Tese defendida e aprovada em 26 de julho de 2010.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



A U T O R I Z A Ç Ã O

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

Rio de Janeiro, 26 de julho de 2010.

Daniela Leles de Souza

CG/Fa

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

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

- S729 Souza, Daniela Leles de
Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer, 1761). / Daniela Leles de Souza. Rio de Janeiro : s.n., 2010.
218 f. il., tab., mapas
- Orientador: Araújo, Adauto José Gonçalves de
Iñiguez, Alena Mayo
Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010
1. *Ascaris* - parasitologia. 2. *Ascaris* – genética. 3. *Trichuris* - parasitologia. 4. *Trichuris* - genética. 5. Doenças parasitárias - história. 6. Paleopatologia. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.9

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

páginas

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Parasitos intestinais transmitidos pelo solo

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

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

1.1.2 *Ascaris* sp.

O parasito

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

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

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

Breves dados sobre a morfologia dos vermes adultos e ovos

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

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

Ciclo biológico

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

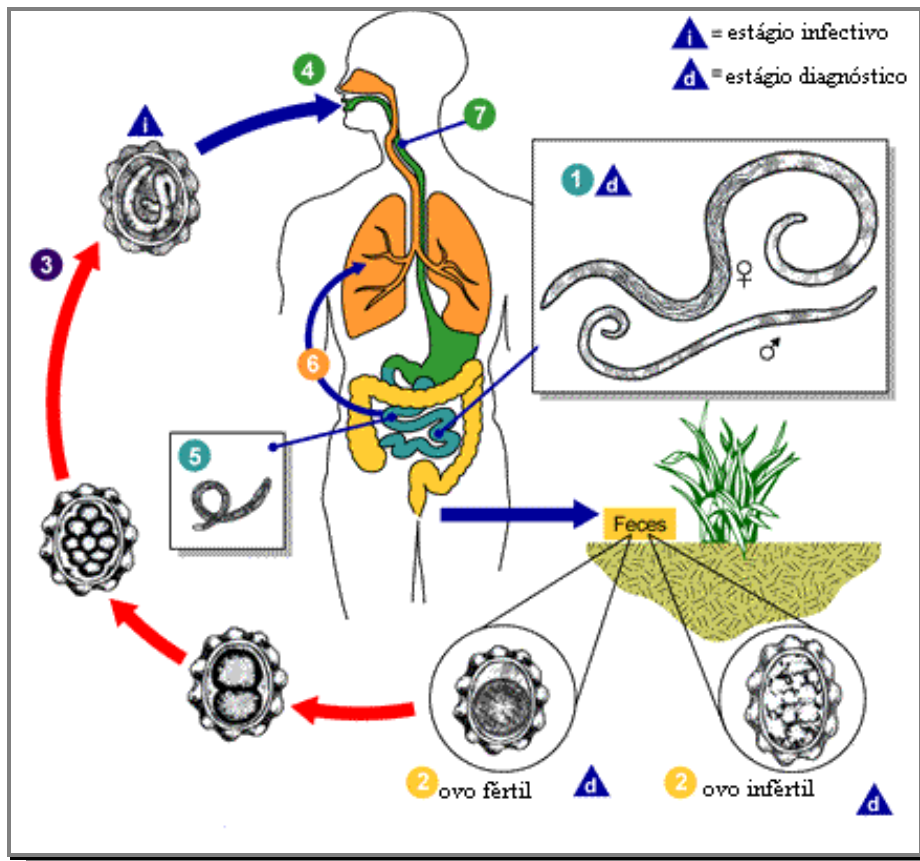


Figura 1: Esquema do ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*.

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

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

Distribuição geográfica

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

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

Patologia

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

Tratamento

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

Importância para saúde coletiva

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

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

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

1.1.3 *Trichuris* sp.

O parasito

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

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

Breves dados sobre a morfologia dos vermes adultos e ovos

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

Ciclo biológico

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

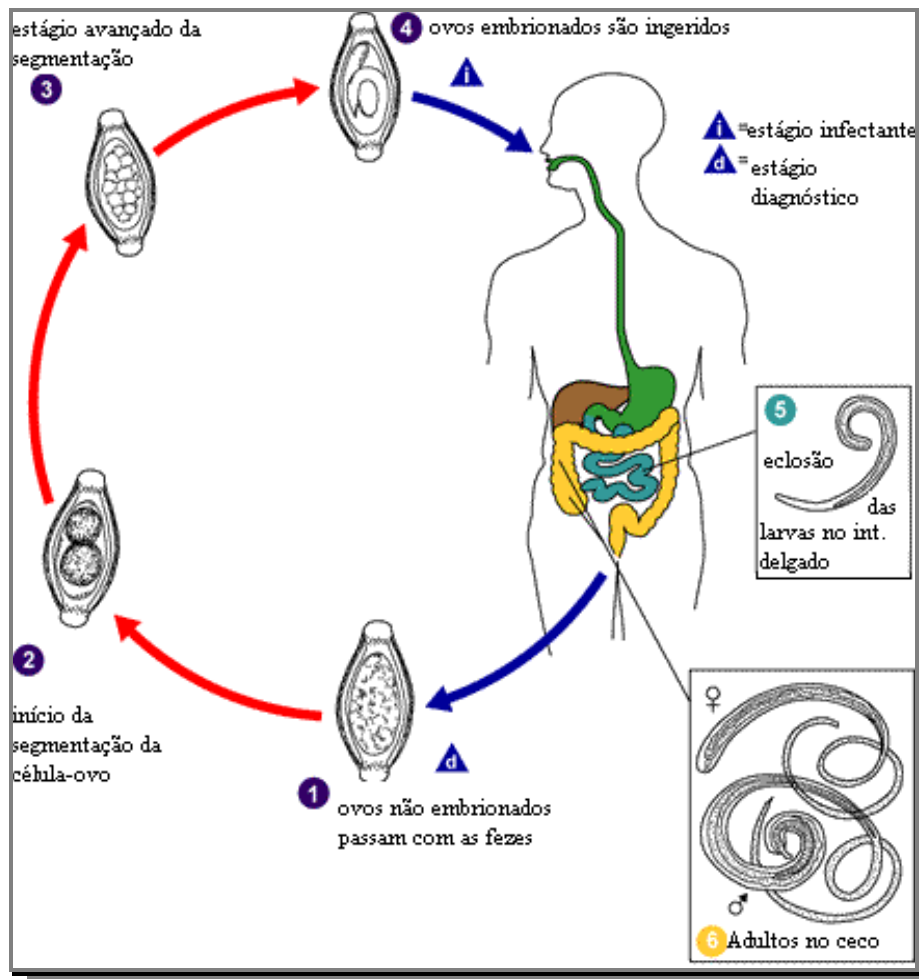


Figura 2: Esquema do ciclo biológico de *Trichuris trichiura*.

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

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

Distribuição geográfica

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

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

Patologia

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

Tratamento

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

Importância para saúde coletiva

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

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

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

1.2 Diagnóstico parasitológico tradicional e suas limitações.

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

1.3 Diagnóstico molecular de helmintos.

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

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

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

Fonte: modificado de Lukes et al. 2005.

1.3.1 Epidemiologia molecular de *Ascaris* sp.

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

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

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

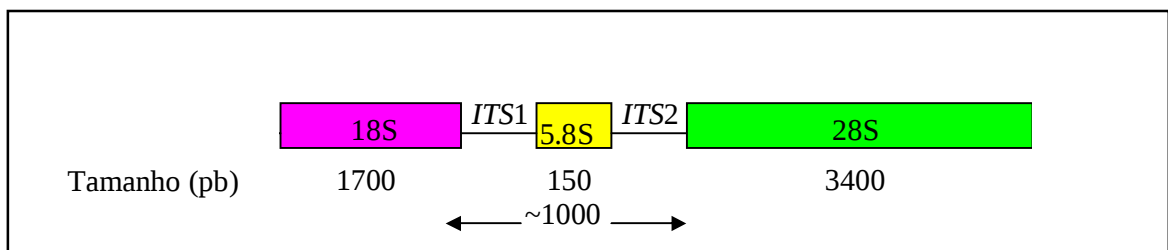


Figura 3: Esquema dos genes rRNA e regiões espaçadoras da maioria dos nematóides.

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

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

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

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

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

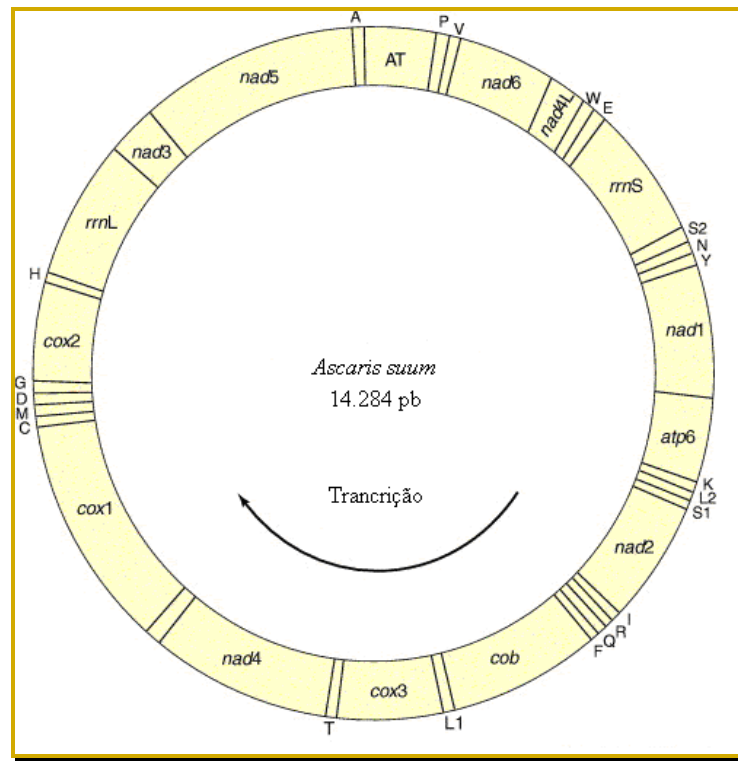


Figura 4. Genoma mitocondrial de *Ascaris suum*. Forma circular e tamanho de 14.284 pb (número de acesso no Genbank X54253). Contêm 12 genes protéicos (*cox1-3*, *nad1-6*, *nad4L*, *cob*, *atp6*), dois genes ribossomais e 20 genes transportadores. A seta indica o sentido da transcrição.

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

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

1.3.2 Epidemiologia molecular de *Trichuris* sp.

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

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

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

1.4 Paleoparasitologia

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

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

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

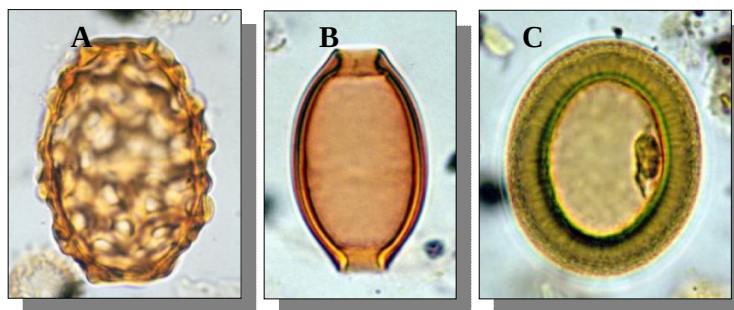


Figura 5. Ovos de parasitos. A: *Ascaris lumbricoides*. B: *Trichuris trichiura*. C: *Taenia* sp.
Fonte: Matsui et al. 2003.

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



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

Fonte: Pessoa 1948.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

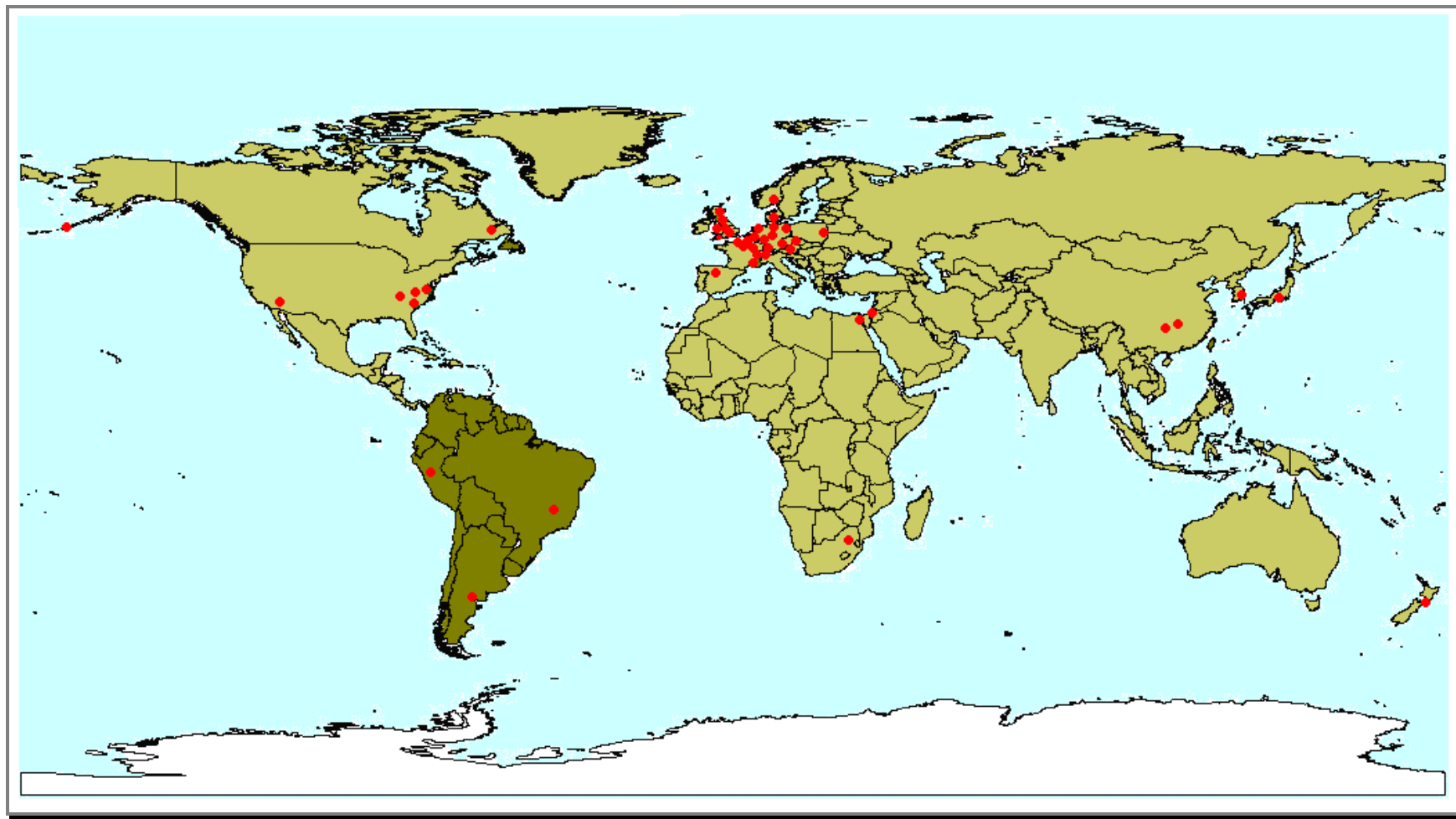
No entanto, quando se observam períodos de tempo e localidades específicas no passado, a distribuição desses parasitos se apresenta de maneira distinta. No período pré-colombiano achados de *A. lumbricoides* são raros na América do Sul (Gonçalves et al. 2003, Leles et al. 2004). O achado mais antigo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

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

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

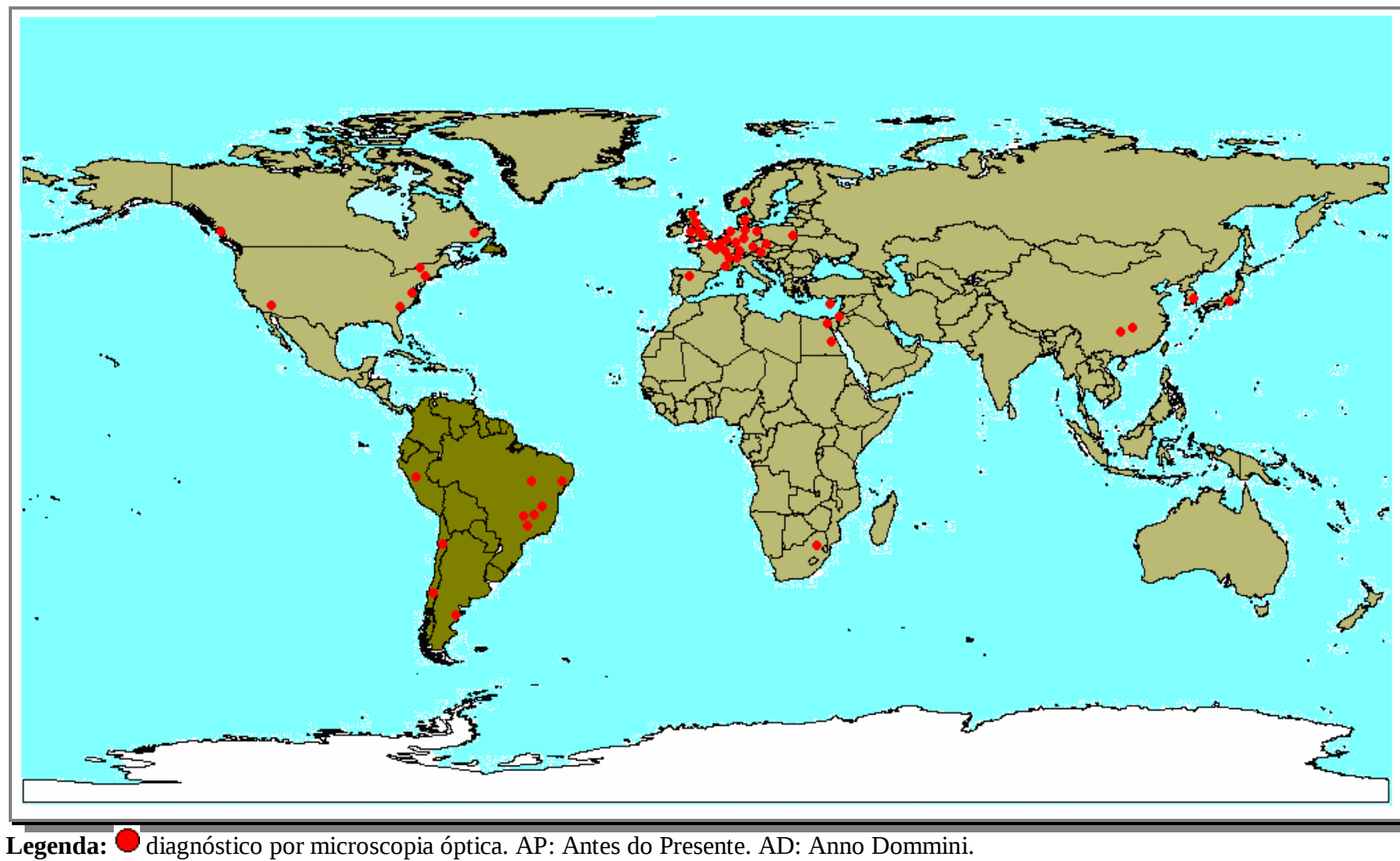
maculo com pólvora, pimenta, dentre outros. Entretanto, o termo “verme” em português seiscentista poderia se referir à diferentes organismos ou parasitos, como helmintos, larvas de insetos e outros. Porém, é importante ressaltar que este quadro clínico era muito comum no Brasil colonial, uma vez que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

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



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

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



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

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

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

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

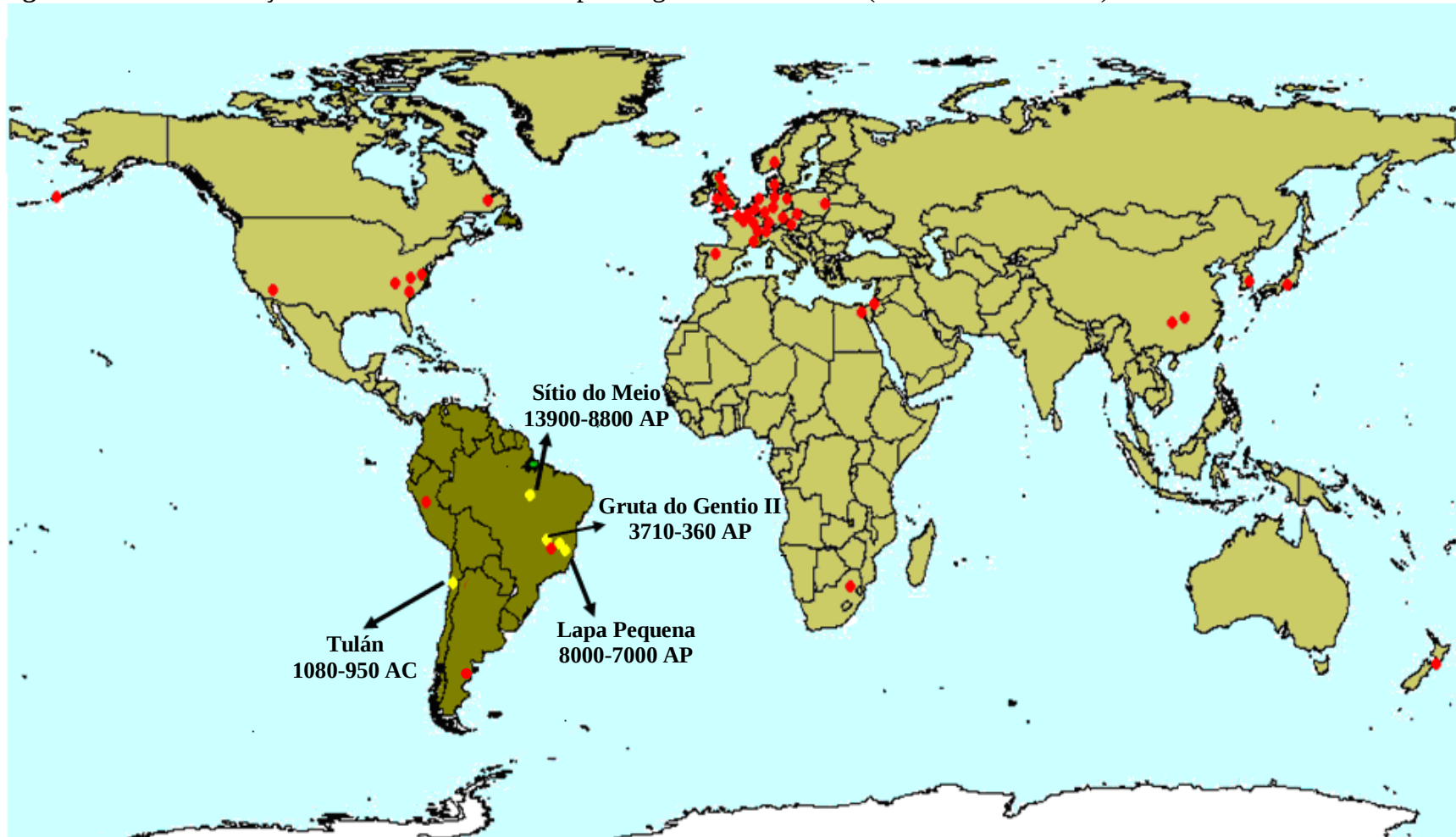
Sítios arqueológicos	País	Diagnóstico por microscopia óptica		Diagnóstico molecular	Datação	Referências
		<i>T. trichiura</i>	<i>Ascaris</i> sp.	<i>Ascaris</i> sp.		
Sítio do Meio, PI	Brasil	-	-	+	8800±60 AP	Gonçalves et al. 2003
Lapa Pequena, MG	Brasil	+	-	+	8800-7000 AP	Gonçalves et al. 2003
Boqueirão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

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

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

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

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



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

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

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

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

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

3.2 Objetivos Específicos

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

3 MATERIAIS E MÉTODOS

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

3.1.1 Amostras fecais atuais

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

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

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

3.1.2 Metodologia

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

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

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

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

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

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

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

3.2.1 Amostras atuais

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

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

Tabela 5: Amostras deste estudo.

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

3.2.2 Metodologia

Tratamento prévio das amostras

Fezes: inicialmente as amostras foram codificadas e imediatamente estocadas a -20°C . Posteriormente, foi feita sedimentação espontânea das fezes, segundo a técnica de Lutz (1919).

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

Extração de DNA

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

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

PCR

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

Tabela 6: Oligonucleotídeos e combinações usadas nas amplificações.

	Oligonucleotídeos	Sequências	Tamanho dos produtos da PCR em pares de base (pb)	Referências
Ascaris sp.	<i>cox1</i> As-Co1F forward As-Co1R reverse	5'-TTTTTTGGTCATCCTGAGGTTTAT-3' 5'-ACATAATGAAAATGACTAACAAC-3'	± 430 pb	Peng et al. 2005
	As-Co1F forward *Cox1R reverse	5'-TTTTTTGGTCATCCTGAGGTTTAT-3' 5'-GCCCCGAGAGTCAAGATCCAT-3'	± 200 pb	Peng et al. 2005 *
	*Cox1F forward As-Co1R reverse	5'-GGATCTTGACTCTCGGGCTTA-3' 5'-ACATAATGAAAATGACTAACAAC-3'	± 250 pb	Peng et al. 2005 *
	<i>nad1</i> MH5F forward As-NDR reverse	5'-TATGAGCGTCATTTATTGGG-3' 5'-GCATCACAATAGCCAACAAATAC-3'	± 400 pb	Peng et al. 2005
	MH5F forward *NAD1R reverse	5'-TATGAGCGTCATTTATTGGG-3' 5'-CAGAAAACCCAATCAAACACA-3'	± 270 pb	Peng et al. 2005 *
	*NAD1F forward As-NDR reverse	5'-CTCCTCTGAATTCTTCGAAA-3' 5'-GCATCACAATAGCCAACAAATAC-3'	± 280 pb	Peng et al. 2005 *
Humano	<i>cox2</i> Paabo A Paabo C	5'-ATGCTAAGTTAGCTTTACAG-3' 5'-ATTCCCCTAAAAATCTTTGA-3'	± 90 pb	Pääbo 1990

*Desenhados para este estudo.

Sequenciamento nucleotídico

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.4.1 Amostras

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

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

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

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

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

*Diagnóstico por microscopia óptica. - diagnóstico negativo.

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

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

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

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

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

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

3.4.2 Metodologia

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

Tratamento prévio

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

Extração do DNA

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

PCR

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

Tabela 9: Oligonucleotídeos e combinações usadas no material arqueológico.

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

*Desenhados para este estudo.

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

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

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

Hibridização

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

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

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

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

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

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

A

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

B

	1
A	Sonda <i>Trichuris</i>

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

Análises complementares

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

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

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

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

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

4 RESULTADOS

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

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

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

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

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

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

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

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

Genbank				Genótipos e Hospedeiros de H1N1 das Isoladas de Pássaros e de Humanos																								Referências	
Genbank	Genótipos	País	Hospedeiro	*1 2 0	1 2 4	1 2 7	1 2 8	1 2 9	1 3 0	1 3 3	1 5 0	1 5 5	1 5 6	1 6 7	1 7 3	1 8 3	2 0 3	2 0 5	2 0 6	2 0 7	2 1 8	2 2 9	2 3 1	2 3 3	2 3 8	2 4 8	Referências		
AJ554036	G1	Ba/Br/Ja/Ch	H/P	T	T	T	-	-	G	G	T	A	T	A	G	T	G	C	G	C	T	T	C	T	A	T	Peng et al. 2003 Leles et al. 2009 Ishiwata et al. 2004		
AJ554037	G2	Ch	H/P	.	.	.	T	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Peng et al. 2003 Ishiwata et al. 2004	
AJ55403	G3	Ja/Ch	H/P	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	Peng et al. 2003 Ishiwata et al. 2004		
AJ554039	G4	Ch	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Peng et al. 2003		
AJ554040	G5	Ch	H	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	W	Peng et al. 2003		
EF153621	G6	Br	H	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Leles et al. 2009		
AJ000895	Al	Au	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	-	-	.	.	.	.	.	.	.	Zhu et al. 1999		
AJ000896	As	RU/Di	P	.	.	.	T	T	.	C	.	.	.	.	.	.	S	-	-	.	.	.	.	.	.	A	Zhu et al. 1999		
GQ339794	H1	Br	H	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Este estudo		
EU635686	H2	Br	H	.	.	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	Este estudo		
EU635687	H3	Br	H	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Este estudo		
EU635688	H4	Br	H	.	.	-	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Este estudo		
GQ339795	H5	Br	H	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Este estudo		
GQ339796	H6	Br	H	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Este estudo		
GQ339797	H7	Br	H	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	Este estudo		
GQ339798	H8	Br	H	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	Este estudo		
GQ339799	H9	Br	H	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	Este estudo		
EU635694	H10	Br	H	.	.	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	Este estudo		
EU635695	H11	Br	H	.	.	-	.	.	T	.	.	G	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	Este estudo		
GQ339800	H12	Br	H	-	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	Este estudo		
GQ339801	H13	Br	H	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Este estudo		

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

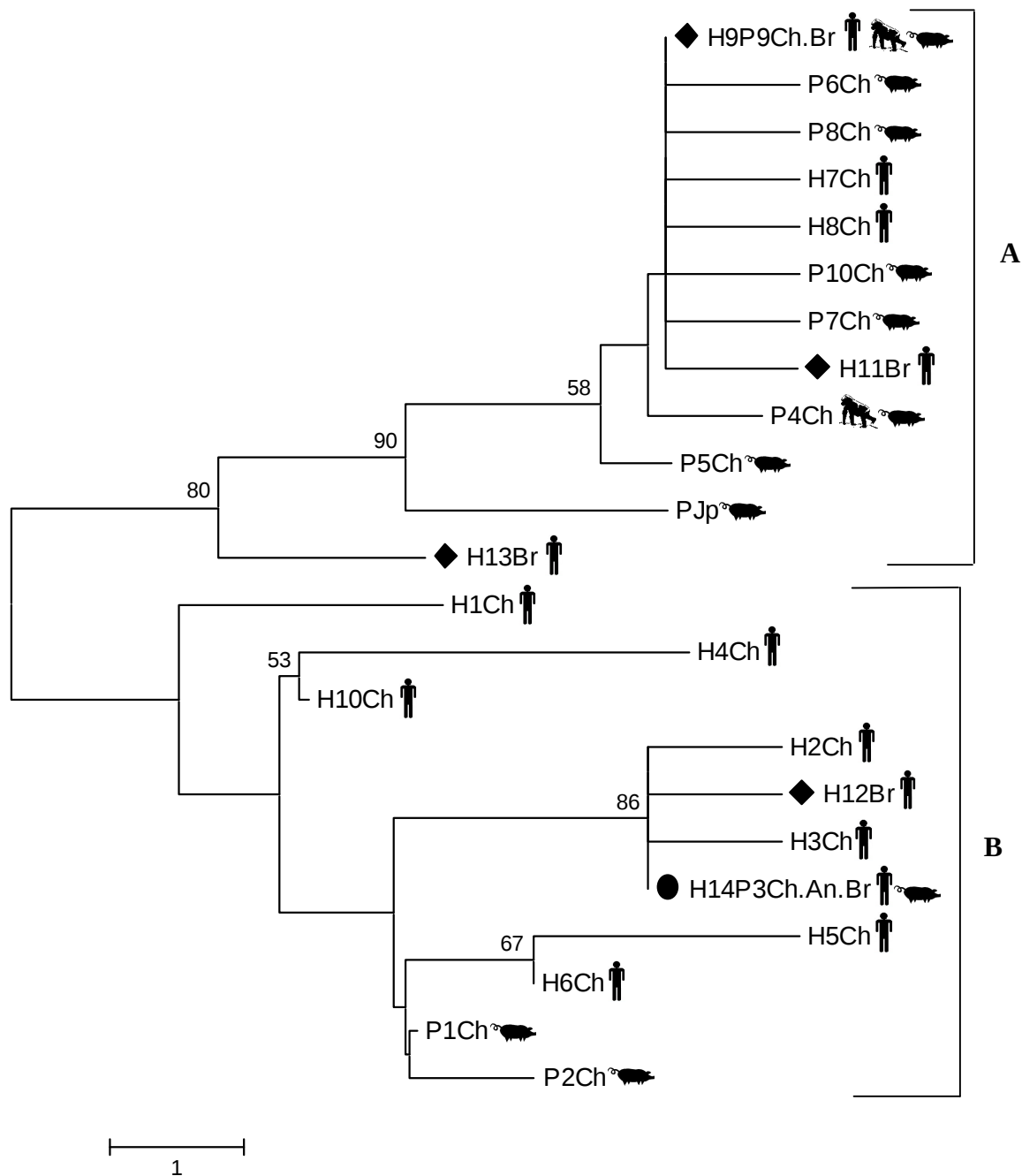


Figura 12: Árvore *Neighbor-Joining* (NJ) inferida para o gene *cox1* (384 pb) de *Ascaris* spp. Suportada por *bootstrap* de 1000 réplicas. Somente valores $\geq 50\%$ são mostrados. Ch: China, Jp: Japão, Br: Brasil e An: Angola. Círculo preto: haplótipos encontrados nas regiões norte e sudeste do Brasil.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

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

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

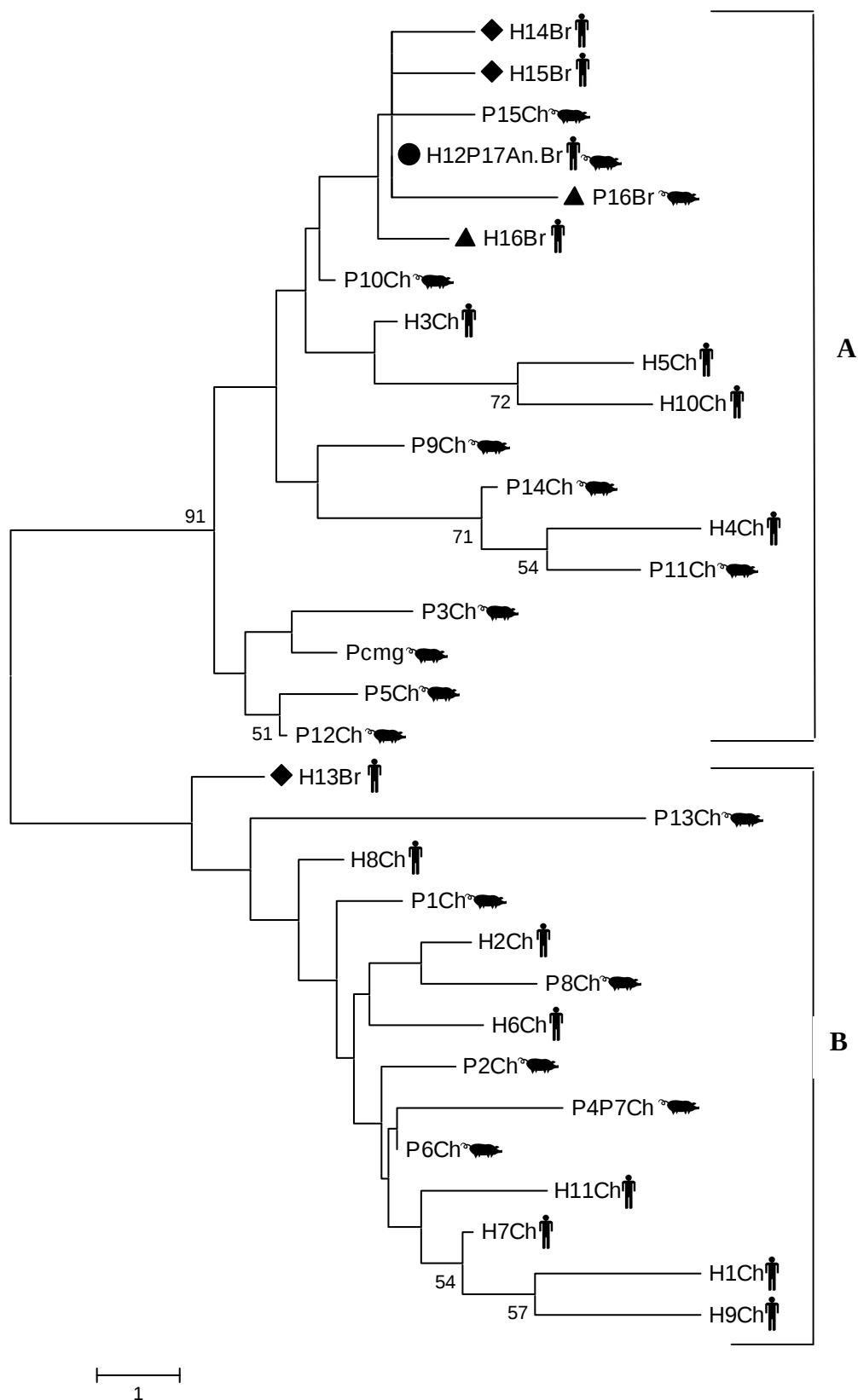


Figura 13: Árvore *Neighbor-Joining* (NJ) inferida para o gene *nad1* (357 pb) de *Ascaris* spp. Suportada por *bootstrap* de 1000 réplicas. Somente valores $\geq 50\%$ são mostrados. Ch: China, Br: Brasil e An: Angola. Círculo preto: haplótipos encontrados nas regiões norte e sudeste do Brasil. Losango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

3.3 Diagnóstico molecular de *Trichuris* sp.

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

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

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

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

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

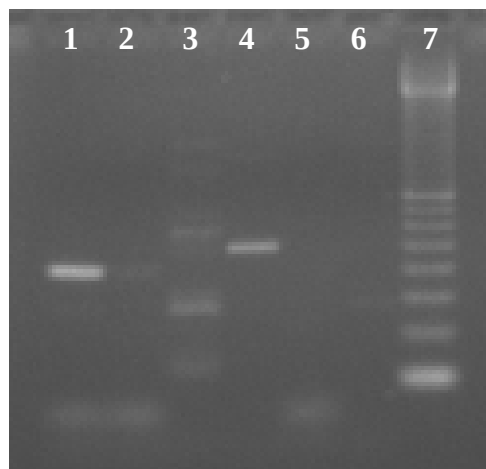


Figura 14. Resultado da PCR para o gene 18S rRNA de *Trichuris trichiura*. Pistas 1-4: amostras de ovos isolados de *Trichuris trichiura*, Pistas 1 e 2 fragmento de 409 pb, Pista 3 amplificação inespecífica, Pista 4 fragmento de 496 pb. Pistas 5-6: controles negativos. Pista 7: marcador 100 pb (Invitrogen).

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

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

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

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

Ascaris sp.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

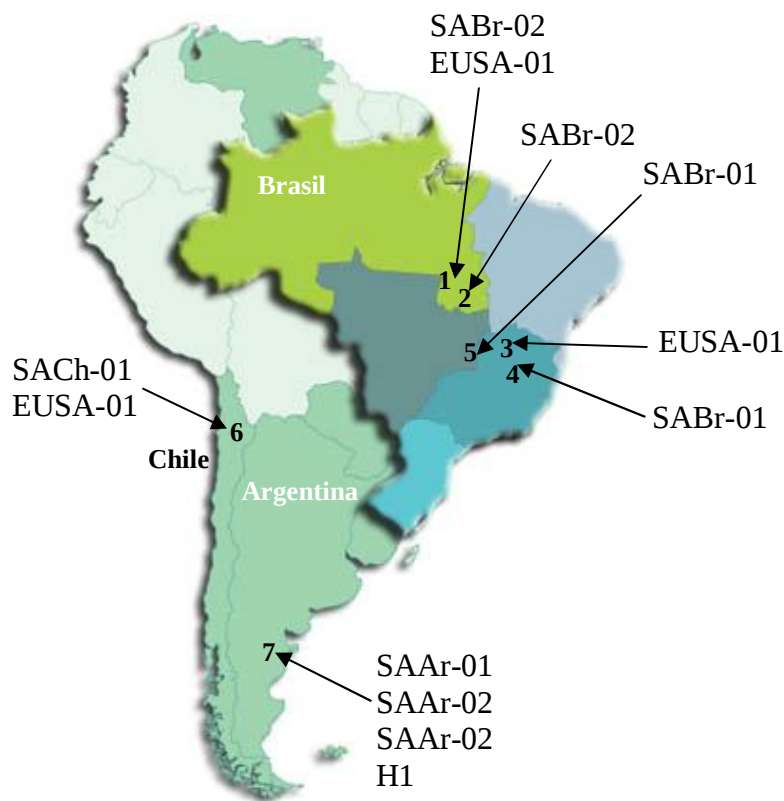
Tabela 17C: Haplótipos do gene *cytb* de *Ascaris* sp. definidos para o material arqueológico.

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

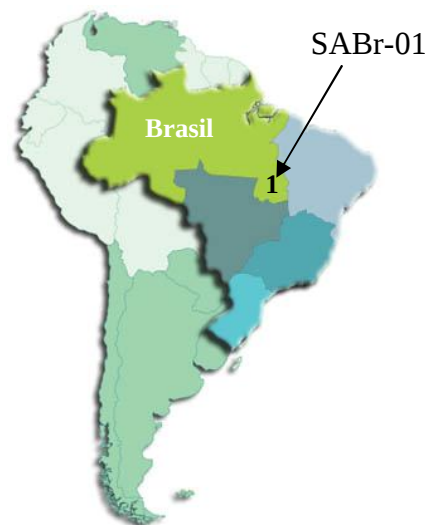
(*): Posição no genoma completo de *A. suum* (X54253). (**): haplótipo também encontrado em material moderno. (.): similaridade com a sequência de referência. (-): deleção. ND: não determinado.

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

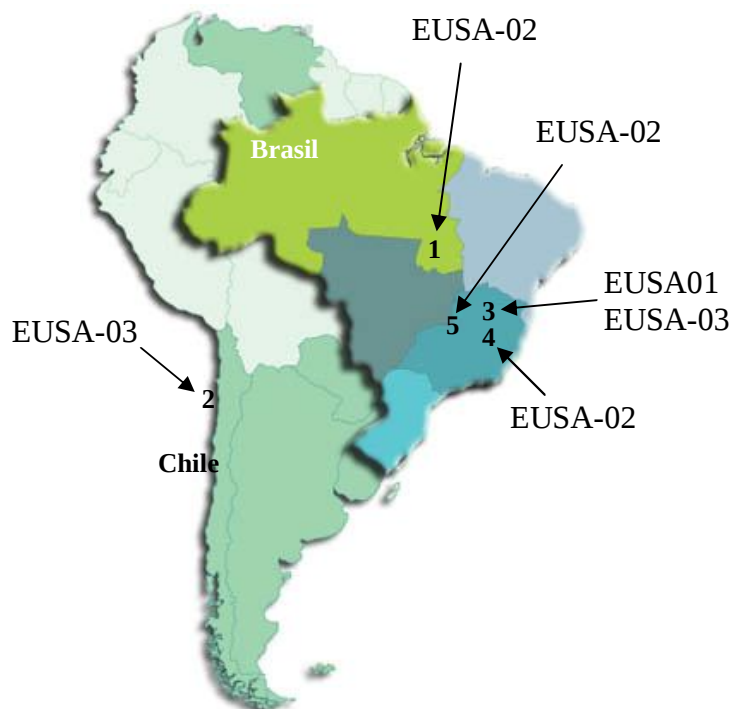
Gene *nad1*



Gene *cox1*



Gene *cytb*



Sítios arqueológicos (datações AP):

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

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

Hibridação

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

Ascaris sp.

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

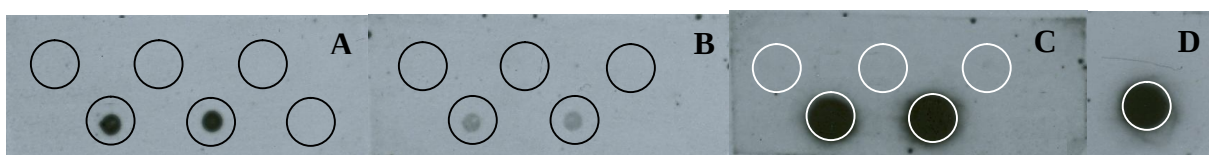


Figura 19. Resultado da Hibridação dos controles positivos e negativos para *Ascaris* sp e *Trichuris* sp. **A:** *cytb*, **B:** *cox1* e **C:** *nad1* para *Ascaris* sp. **D:** 18S para *Trichuris* sp. Esquema da aplicação das amostras (Figuras 11A e B).

Trichuris sp.

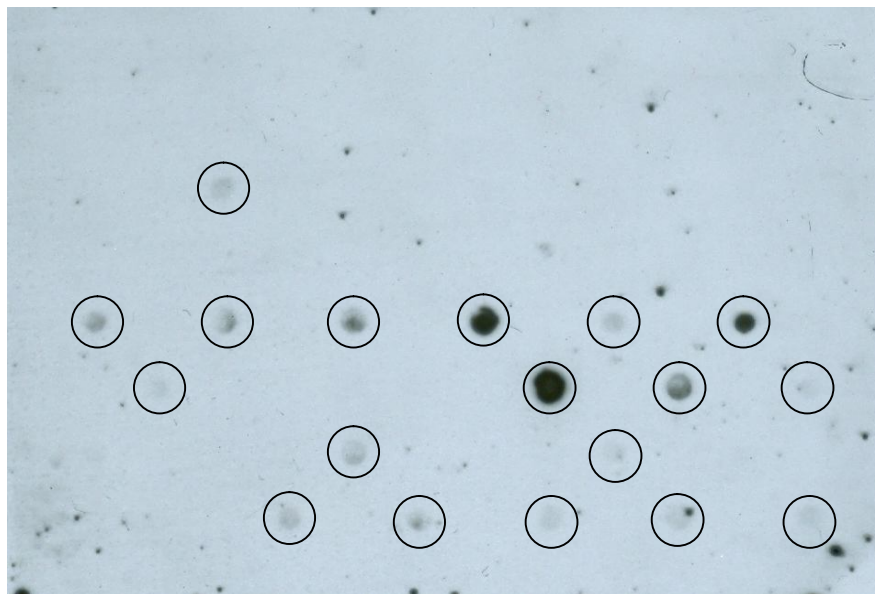
Dezessete amostras dos sítios arqueológicos da América do Sul hibridaram com o fragmento do gene 18S rDNA de *Trichuris* sp. usado como sonda (Figura 20A-D). O controle positivo da sonda gerou o sinal esperado (Figura 19 D, Tabela 18).

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

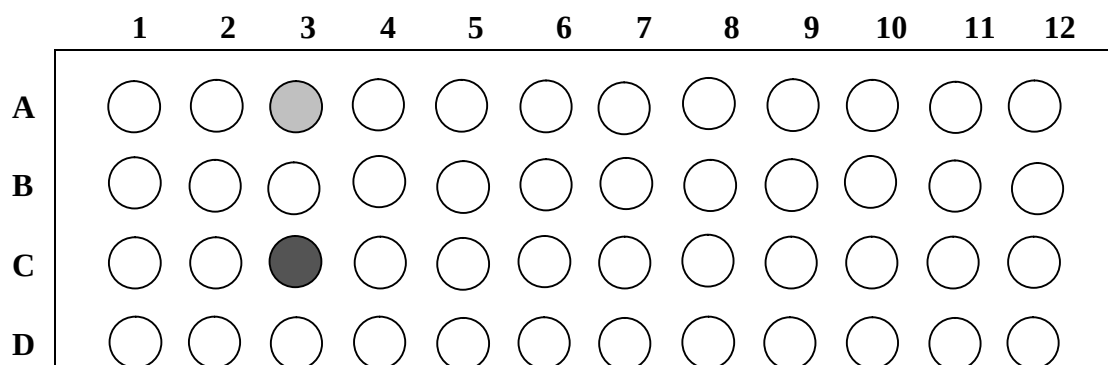
A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

B



C

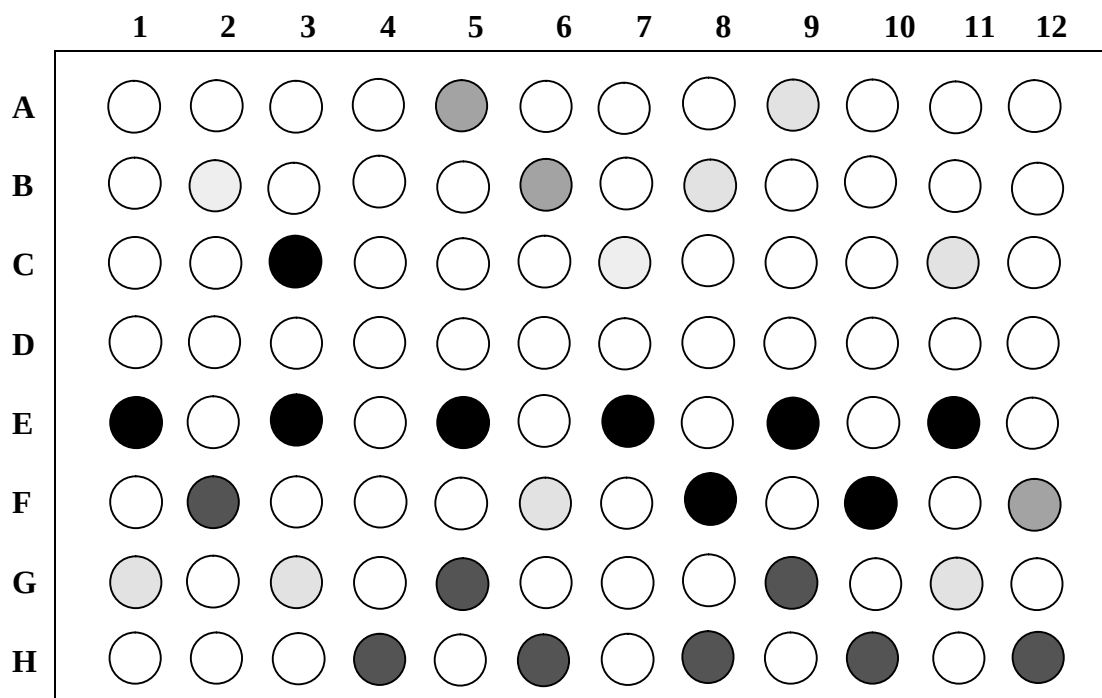


D

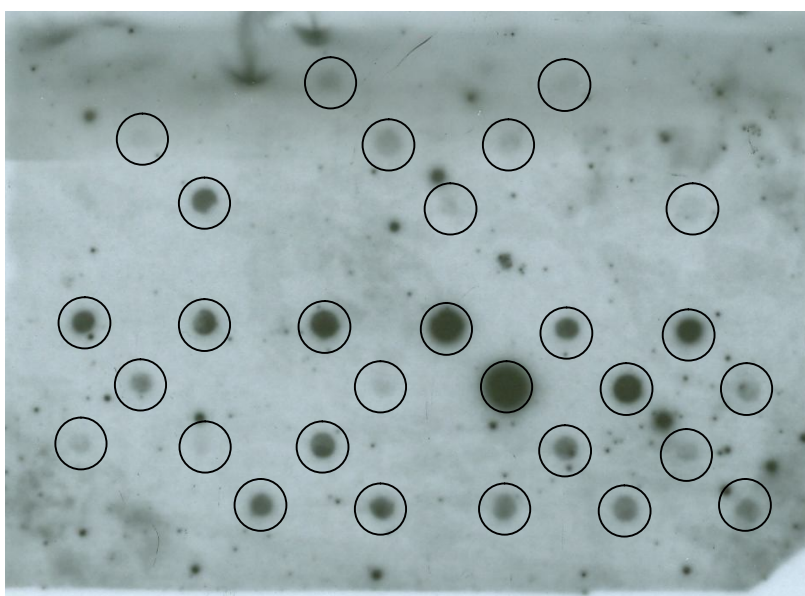


Figura 17. Resultado da hibridação com o fragmento do gene *cox1* de *Ascaris* sp. **A e C:** Esquema do resultado da hibridação. **B e D:** Resultado da revelação da hibridação. Intensidade do sinal emitido pela hibridação (cinza claro: fraco, cinza escuro: médio e preto: forte). Amostras aplicadas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

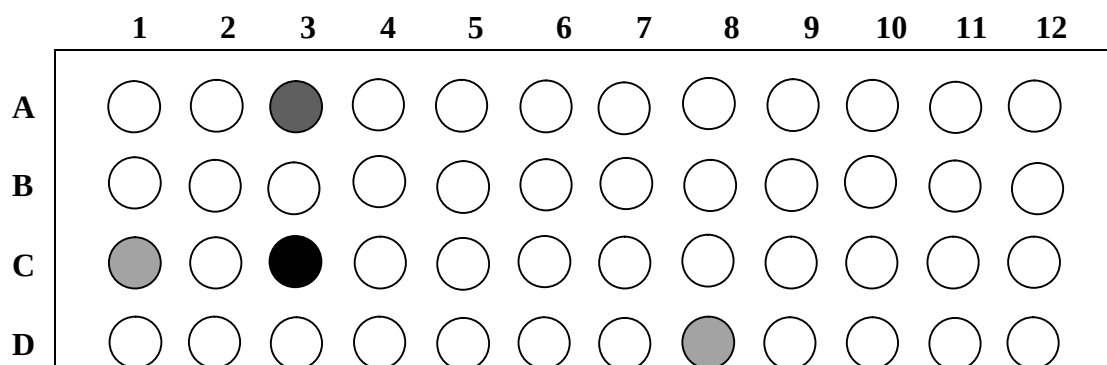
A



B



C



D

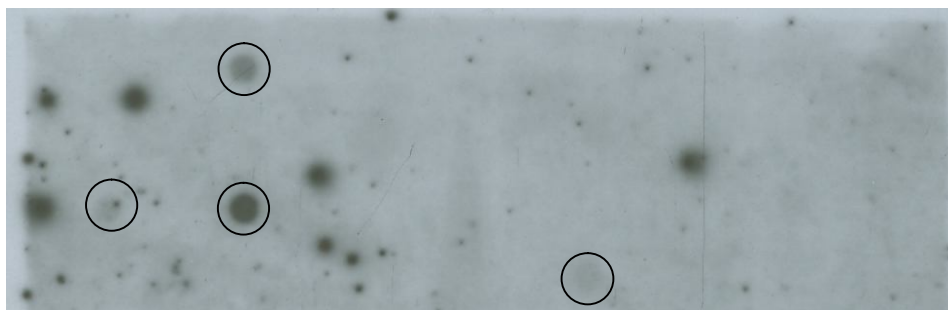
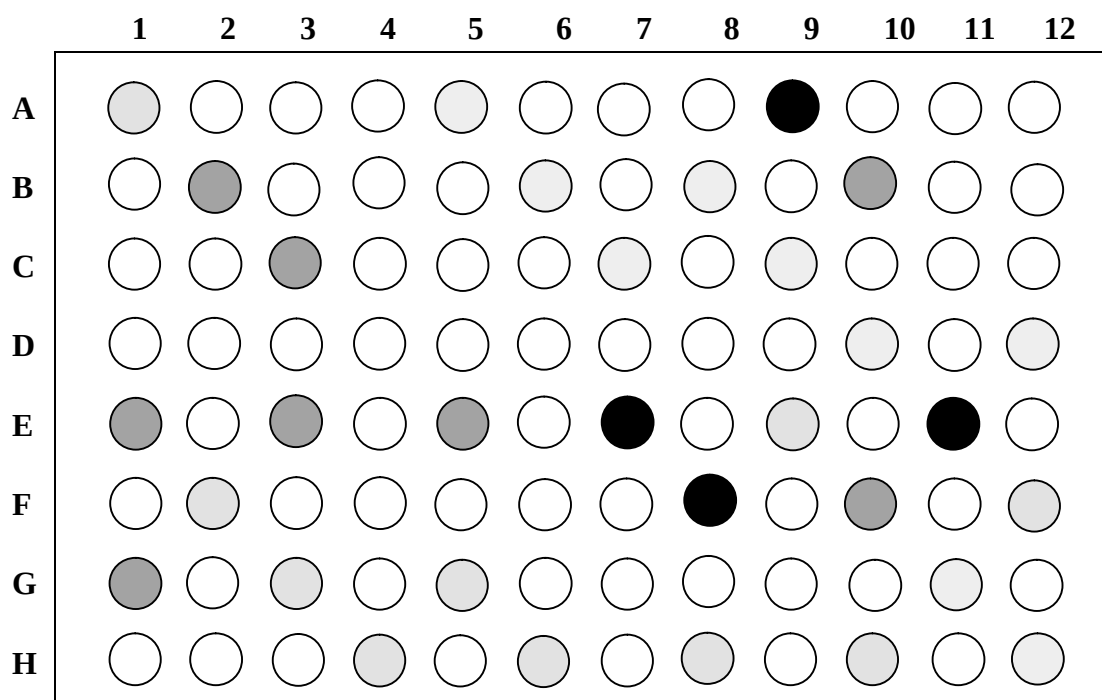
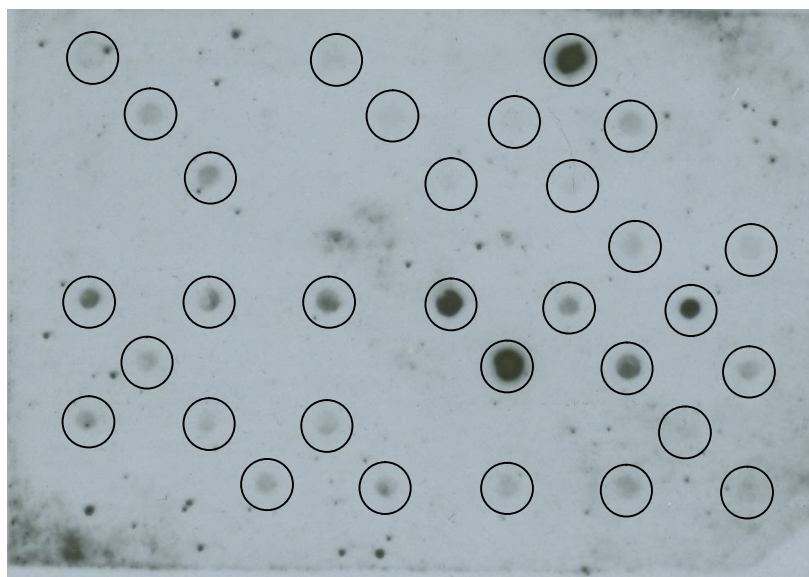


Figura 18. Resultado da hibridação com o fragmento do gene *nad1* de *Ascaris* sp. **A e C:** Esquema do resultado da hibridação. **C e D:** Resultado da revelação da hibridação. Intensidade do sinal emitido pela hibridação (cinza claro: fraco, cinza escuro: médio e preto: forte. Amostras aplicadas (Figuras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

A



B



C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												

D

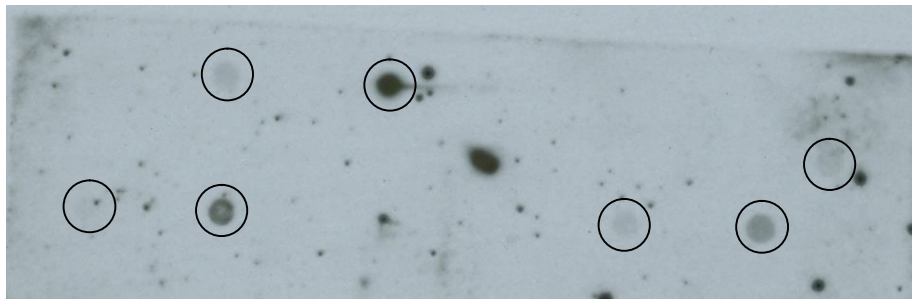
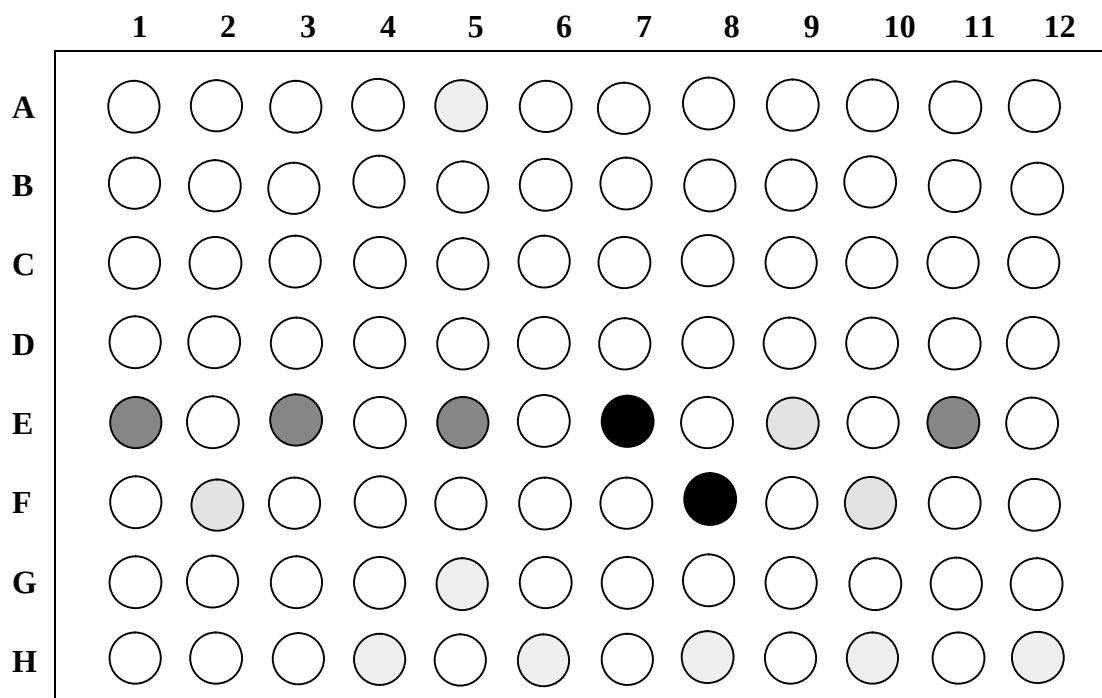
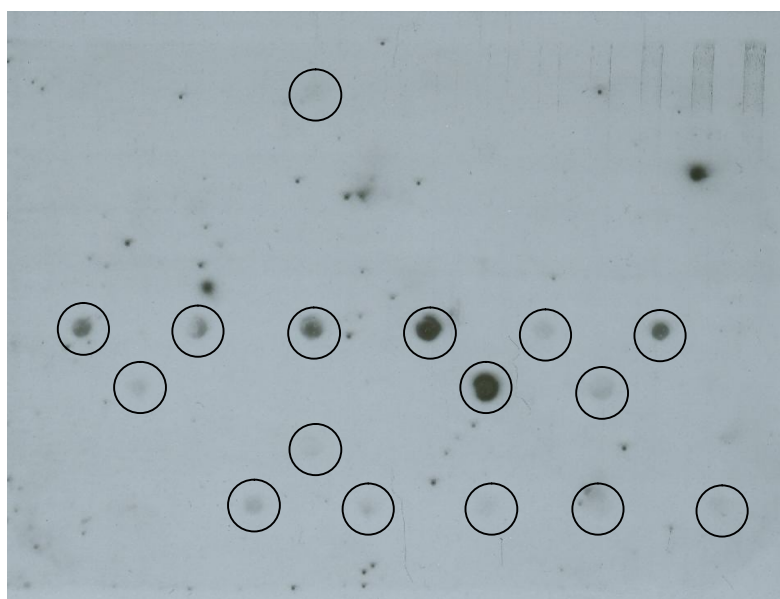


Figura 20. Resultado da hibridação com o fragmento do gene 18S rDNA *Trichuris* sp. **A e C:** Esquema do resultado da hibridação. **B e D:** Resultado da revelação da hibridação. Intensidade do sinal emitido pela hibridação (cinza claro: fraco, cinza escuro: médio e preto: forte). Aplicação das amostras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

A



B



C

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												

D



Análises de resultados da hibridação de ácidos nucleicos e PCR

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

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

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

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

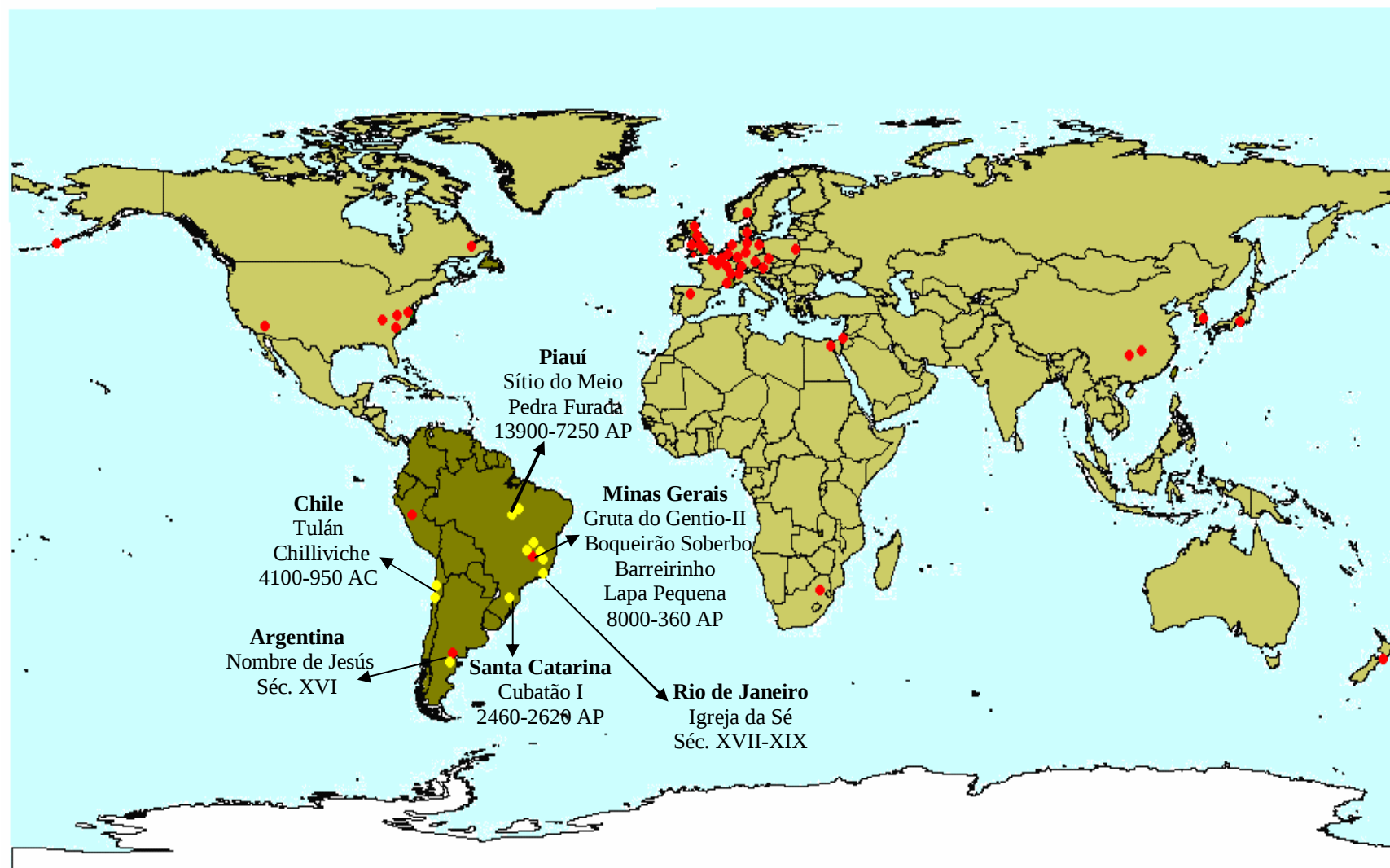
Legenda. LP: Lapa Pequena, BS-I: Boqueirão Soberbo I, GG-II: Gruta do Gentio II (MG). BPF: Boqueirão da Pedra Furada, S: Sítio do Meio (PI). Cubatão I (SC). Igreja da Sé (RJ).

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

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

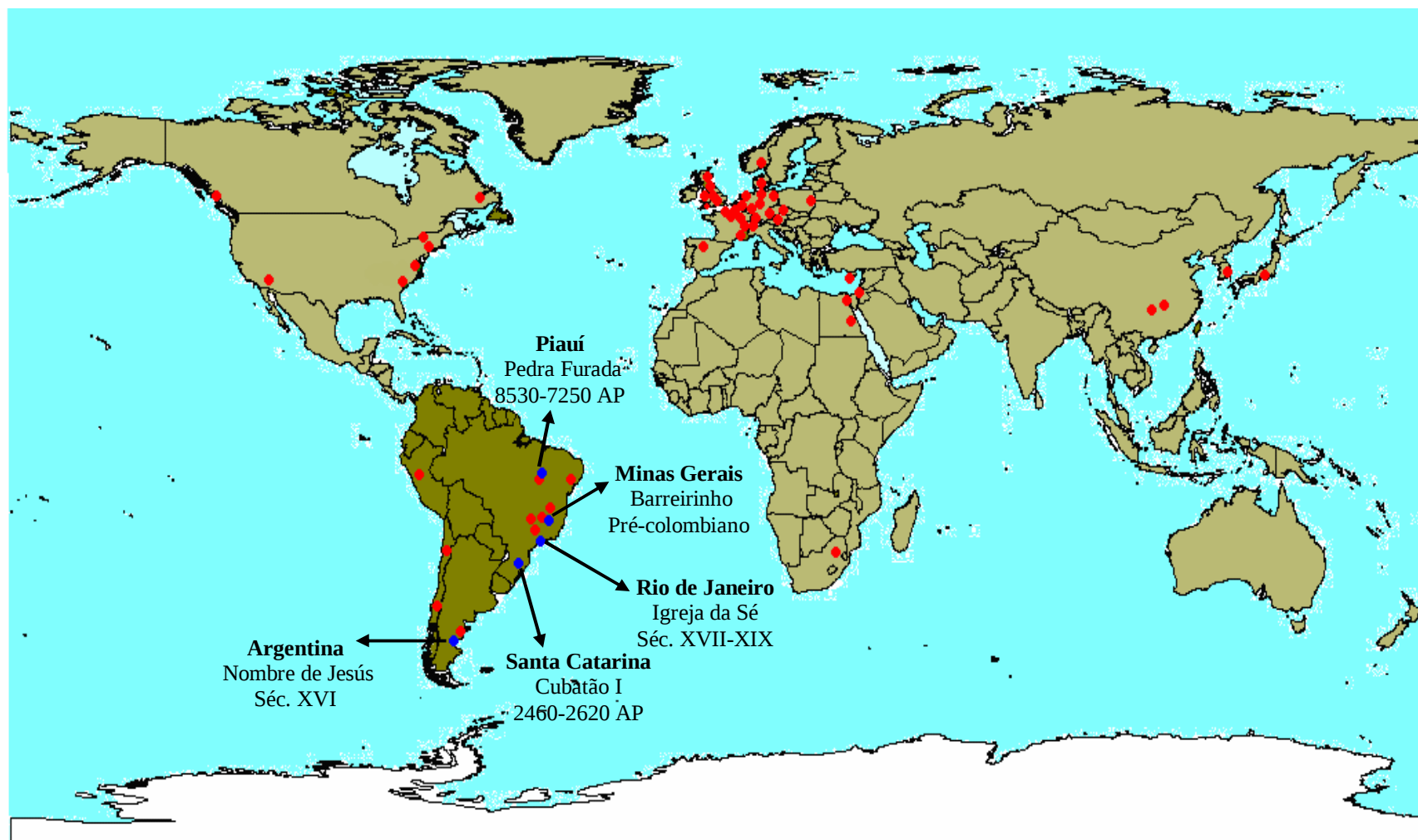
Legenda. Tulán/San Pedro de Atacama, Tilliviche (Chile). H: Homem de Galera. NJ: Nombre de Jesus/Patagônia (Argentina). Lü: Lübeck (Alemanha). Wal: Walraversijde (Bélgica).

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



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

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



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

Análises complementares

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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



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

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



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

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

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

5.3 Diagnóstico molecular de *Trichuris* sp.

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

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

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

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

Quanto ao ensaio molecular da PCR

Ascaris sp.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trichuris sp.

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

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

Comparando-se os ensaios moleculares: PCR e hibridação

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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



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

Foto: Alena Mayo Iñiguez

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(1) Ação de fungos nematófagos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(4) Influência do ambiente e de aspectos tafonômicos

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

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

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

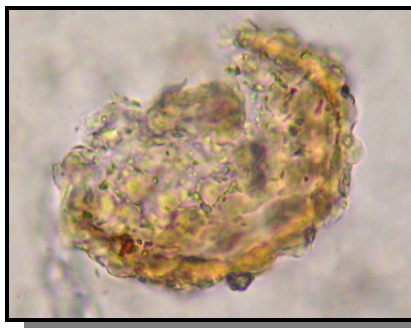


Figura 27: Ovo quebrado de *Ascaris* sp. em material da Patagônia (XVI).
Fonte: Fugassa et al. 2006.

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

Outros aspectos

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

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

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

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

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

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

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

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

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

6.3 Diagnóstico molecular de *Trichuris* sp.

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

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

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

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

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

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

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

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

7 ASPECTOS ÉTICOS

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

Material fecal é examinado rotineiramente em instituições de saúde. O material usado nesta pesquisa se destinou única e exclusivamente à extração de DNA do parasito e não do hospedeiro humano e/ou suíno. As amostras fecais usadas nesta pesquisa, procedentes da cidade do Rio de Janeiro – RJ, são as mesmas usadas na dissertação de mestrado defendida nesta instituição e, portanto à época com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer Nº. 03/06, CAAE: 0003.0.031.000.6). As amostras provenientes da cidade de Santa Isabel do Rio Negro - AM são parte de outro projeto intitulado: “Estudo das condições de saúde da população de Santa Isabel do Rio Negro incluindo intervenção para tratamento em massa das helmintíases intestinais” coordenado por Dr. Neves MB e Dr. Costa-Carvalho FA do Instituto Oswaldo Cruz, aprovado pelo comitê de ética (parecer Nº. CAAE 0011.0.009.000-03).

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

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

8 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

infections among school children in Loum, Cameroon. *Tropical Medicine and International Health* 8: 975-986.

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

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

ANEXOS

ANEXO I



Short communication

Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in BrazilDaniela Leles^{a,b}, Adauto Araújo^a, Ana Carolina Paulo Vicente^b, Alena Mayo Iñiguez^{b,*}^a Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz (ENSP-FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil^b Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 November 2008

Received in revised form 19 March 2009

Accepted 26 March 2009

Keywords:

Ascaris sp.

Fecal samples

Molecular diagnosis

ITS1 genotypes

Brazilian isolates

cytb

ABSTRACT

It is estimated that 120 million people are infected by *Ascaris lumbricoides* in Latin America, but few genomic studies have been conducted. We tested protocols for DNA extraction to obtain an *Ascaris* sp. molecular diagnosis from human feces, with the emphasis on PCR specificity and sensitivity. *Ascaris* sp. was detected in 100% of positive fecal samples using physico-chemical DNA extraction and the *cytb* gene and ITS1 as molecular targets. The method was sufficiently sensitive to detect *Ascaris* sp. from one isolated egg or four eggs in a fecal sample. Regarding the PCR specificity, there was no cross-reactivity when applied to *Trichuris trichiura*-positive fecal samples or in *Ascaris* sp. samples also positive to *T. trichiura* or *Enterobius vermicularis*. The ITS1 sequence analysis revealed two genotypes among the sample: the G1 genotype, the most prevalent in humans, and a new genotype, G6, described for the first time in Brazilian samples.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ascaris lumbricoides (L.) infects nearly 1.4 billion people worldwide (Crompton, 1999). *Ascaris suum* (Goeze, 1782), a parasite of swine, with the same transmission mechanism (fecal/oral), affects millions of pigs and is responsible for substantial economic losses in many countries (O'Lorcain and Holland, 2000). The absence of morphological characteristics distinguishing between the two species, and because cross-infection has been recorded (Anderson, 1995; Nejsum et al., 2005), make it important to identify the risk of swine as a potential reservoir of *Ascaris* genotypes that can infect humans. Regions of nuclear DNA [Internal Transcribed Spacer (ITS)] and mitochondrial DNA (mtDNA), cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*), NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) and, recently, microsatellite markers have been examined for *Ascaris* and *Ascaris* genotype identification (Zhu et al., 1999; Peng et al., 2003, 2005; Criscione et al., 2007).

PCR-RFLP were applied to determine the ITS1 restriction patterns from *Ascaris* populations in humans and swine (Anderson, 1995; Zhu et al., 1999). Peng et al. (2003) used SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) and identified five *Ascaris* ITS1 genotypes (G1–G5) of human origin and three from (pigs G1–G3), therefore shared genotypes between hosts. They examined the frequency of *Ascaris* genotypes in relation to host species and geographical origin based on a large cohort of human and pig *Ascaris* from six endemic regions in China. The results showed that genotype G1 frequently occurred in humans, and genotype G3 was predominant in pigs, while the other three genotypes were detected at lower frequencies in both hosts (G2, G4 and G5 in humans and G2 in pigs). These distributions suggest a special host affiliation (Peng et al., 2003).

Previous studies have used adult or larval worms and/or pooled egg samples, but these materials are not always readily available. The aim of the present study was to establish a method that would allow molecular diagnosis of *Ascaris* sp. from feces as an alternative source of *Ascaris* sp. material. We tested two protocols for DNA extraction, with the emphasis on PCR sensitivity to eggs and

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 8168; fax: +55 21 2260 4282.
E-mail address: alena@ioc.fiocruz.br (A.M. Iñiguez).

Table 1

Fecal samples screened for parasites from patients at the Health Center, Rio de Janeiro, Brazil.

Samples	Parasites	Eggs (g ⁻¹)	# EP-C ^a	# EP-CK ^b
DL01 ^c	<i>Ascaris lumbricoides</i>	18,400	2,760	3,680
	<i>Trichuris trichiura</i>	23 ^d	4 ^d	5 ^d
DL02 ^c	<i>Ascaris lumbricoides</i>	2,737	411	547
	<i>Enterobius vermicularis</i>	23 ^d	4 ^d	5 ^d
DL03	<i>Ascaris lumbricoides</i>	23	4	5
DL04	<i>Ascaris lumbricoides</i>	23	4	5
DL05	<i>Ascaris lumbricoides</i>	1,380	207	276
DL06	<i>Ascaris lumbricoides</i>	15,732	2,360	3,146
DL07–DL11 ^e	<i>Trichuris trichiura</i>	23–46	4–12	5–15
DL12	<i>Ascaris lumbricoides</i>	989	148	198
DL13	<i>Ascaris lumbricoides</i>	6,095	914	1,219
DL14	<i>Ascaris lumbricoides</i>	1,242	186	248
DL15	<i>Ascaris lumbricoides</i>	11,500	1,725	2,300
DL16	<i>Ascaris lumbricoides</i>	9,200	1,380	1,840
DL17	<i>Ascaris lumbricoides</i>	12,466	1,870	2,493

^a Number of eggs in physico-chemical DNA extraction (150 µl).

^b Number of eggs in physical-commercial kit (200 µl).

^c Samples positive for two parasites.

^d EPG in *T. trichiura* or *E. vermicularis*.

^e *T. trichiura* negative control samples (5).

specificity to the species. We also determined the ITS1 genotypes in Brazilian isolates and identified a new ITS1 genotype.

2. Materials and methods

Human feces were collected from patients at the Health Center in Rio de Janeiro, Brazil and screened microscopically for *Ascaris* sp. eggs and other intestinal parasites (Table 1). Parasitological diagnosis was performed using the Kato–Katz technique (Hell-Tec kit), and the calculation of number of eggs per gram of feces (EPG) was obtained by multiplying the total number of eggs on the slide by the factor 23 (Katz et al., 1972) (Table 1). To assess PCR sensitivity to the number of eggs, 1, 5, 10, 30, 50 and 80 *Ascaris* eggs were isolated by microscopy. *Ascaris* sp. samples also positive to *Enterobius vermicularis* or *Trichuris trichiura*, as well as 5 samples positive only for *T. trichiura*, were used as PCR specificity controls (Table 1). The series of 1, 5 and 10 isolated eggs were put into a 0.2 µl PCR tube with 6 µl of ddH₂O and 30, 50 and 80 isolated eggs in 50 µl of ddH₂O. Eggs and samples of feces were subjected to alternate boiling and freezing (100 °C and liquid nitrogen) for five cycles. Following this physical treatment, DNA extraction from feces was conducted in two ways. (1) Physico-chemical, in which 150 µl of sample was sub-

jected to the DNA extraction protocol (Proteinase K digestion/phenol–chloroform DNA extraction/DNA purification) previously employed by Iñiguez et al. (2002); and (2) physical-commercial kit, in which 200 µl of sample was treated with the commercial kit QIAamp[®] DNA Stool Mini kit (Qiagen), with modifications (Proteinase K digestion at 55–60 °C for 4 h). DNA extraction from the isolated eggs was performed by the physical treatment and by the physico-chemical DNA extraction protocol. PCR reagents were added directly into PCR tubes with 1, 5 and 10 treated eggs and 5 µl of the supernatant from 30, 50 and 80 treated eggs were added to PCR reaction.

Human DNA PCR was performed (Pääbo, 1990) to assess the presence of PCR inhibitors common in feces (Kohn and Wayne, 1997). To amplify 142 bp of the *Ascaris* cytochrome *b* (*cytb*) gene, the primers and PCR conditions described by Loreille et al. (2001) were used. To amplify and identify the *Ascaris* ITS1 genotypes (480 bp), the primers, XZ5F and XZ1R were used with the PCR conditions described by Zhu et al. (1999). Alternatively a semi-nested PCR which yielded an ITS1 fragment of 407 bp was applied in samples negative to ITS1 PCR of the 480 bp fragment, using XZ5F and NC13R primers with the conditions described above. In the PCR–RFLP assay, ITS1 products of 407 bp were digested with Hae III (Invitrogen). The *Ascaris* ITS1 profile of the 2-banded restriction pattern (144/263 bp) corresponds to genotype sequences G1/G4; the 3-banded restriction pattern (277/144/36 bp) to G3; and the 4-banded restriction pattern (277/263/144/36 bp) to G2/G5 (Peng et al., 2003). PCR products were directly sequenced using Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) in a 3100 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) as recommended by the suppliers. PCR products were also cloned into the pGEM-T Easy Vector System (Promega) and three clones from each sample were sequenced. Bio Edit v5.0.9 (Department of Microbiology, North Carolina State University, USA), GeneDoc v2.6.002 and DAMBE v4.2.13 were used for editing and sequence analysis. The nucleotide sequences from this study were deposited in GenBank database (EF150649–EF150653, EU073131–EU073134, EF1536919–EF15361923).

3. Results

DNA extraction by physical and physico-chemical treatments of *Ascaris* eggs (5, 10, 30, 50, 80) successfully yielded PCR amplifications with both *cytb* and ITS1 targets, including amplification of a single egg isolate (Fig. 1A;

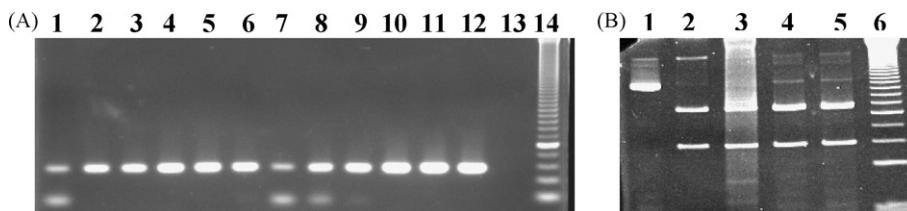


Fig. 1. (A) Agarose gel electrophoresis 3% of *cytb* gene PCR amplifications from isolated eggs of human *Ascaris*. Physical treatment of DNA extraction, lanes 1–6: samples of 1, 5, 10, 30, 50 and 80 eggs, respectively. Physico-chemical treatment, lanes 7–12: samples of 1, 5, 10, 30, 50 and 80 eggs, respectively. Lane 13: PCR negative control. Lane 14: 50 bp DNA ladder (Invitrogen). (B) Restriction profile from ITS1 region of *Ascaris* sp. from feces of human origin. Lane 1: sample undigested. Lanes 2–5: samples digested with Hae III. Lane 6: 50 bp DNA ladder (Invitrogen).

Table 2Methods of DNA extraction and PCR molecular diagnosis from a series of isolated eggs and from fecal samples positive for *Ascaris* sp. by microscopy.

DNA extraction method ^a	<i>cytb</i>	ITS1	Nested 407 bp	Total
	142 bp	480 bp		
Physical (eggs)	6 ^b /6 (100.0%)	6/6 (100.0%)	–	6/6 (100.0%)
Physico-chemical (eggs)	6 ^b /6 (100.0%)	6/6 (100.0%)	–	6/6 (100.0%)
Physico-chemical (feces)	12/12 (100.0%)	8/12 (66.7%)	4/4 (100%)	12/12 (100.0%)
Physical-commercial kit (feces)	10/12 (83.3%)	2/12 (16.7%)	7/10 (70.3%)	9/12 (75.0%)

^a Physical treatment corresponds to boiling and freezing, physico-chemical treatment was boiling and freezing and DNA extraction following [Iniguez et al. \(2002\)](#) and physical-commercial kit treatment corresponds to boiling and freezing and commercial kit QIAamp[®] DNA Stool Mini kit (Qiagen) with modifications.

^b 6 series of isolated eggs numbering 80, 50, 30, 10, 5, and one isolated egg. (%)—the percent of positive samples with the molecular diagnosis using different methods and targets as indicated.

Table 2). DNA extracted from feces was positive for human mtDNA PCR, showing a lack of PCR inhibitions, with the exception of 2 samples extracted through physico-chemical treatment that required a second step of DNA purification. The results of DNA extraction from feces and its amplification are shown in **Table 2**. Diagnosis based on *cytb* detected *Ascaris* in 100% of positive fecal samples using DNA extraction by the physico-chemical method and 83% using the commercial kit (**Table 2**). Considering the ITS1 target, *Ascaris* was also 100% detected using the physico-chemical method but only 75% using the physical-commercial kit (see ITS1 Total, **Table 2**).

Besides the sensitivity to detection of isolated eggs (100%), the molecular diagnosis was also sensitive enough to detect as few as 4 *Ascaris* sp. eggs in fecal material (4–2760 eggs) with both molecular targets, using physico-chemical DNA extraction. However, with the physical-commercial kit, 2 samples (DL04 and 05) using *cytb* and 3 samples (DL04, 05 and 14) using the ITS1 target were negative (**Table 2**). Regarding specificity, we did not observe primer cross-reactivity to *T. trichiura* control samples or to samples positive to two parasites (*A. lumbricoides* and *T. trichiura* or *A. lumbricoides* and *E. vermicularis*). A PCR–RFLP assay showed the ITS1 2-banded restriction pattern, which corresponded to genotypes G1/G4 (**Fig. 1B**). The sequencing analysis showed that 11/12 ITS1 corresponded to genotype G1. In contrast, the DL04 sequence showed a deletion of nucleotide T at position 127 (**Fig. 2**), which has not been previously observed in *Ascaris* sp. ITS1 genotypes from either humans or pigs. To confirm ITS1 genotypes, the ITS1 polymorphism T127del, and their distribution in the samples, ITS1 amplicon cloning was

carried out with analysis of three cloned sequences for each of the 12 samples. The results confirmed the T127del polymorphism in three clones from the DL04 sample and, interestingly, in one clone from each of the samples DL15 and DL17. These results identified genotype G6 in 3 samples as well as the presence of two genotypes G1/G6 in the same fecal sample (**Fig. 2**). In the remaining samples the clone analysis confirmed the genotype G1. The sequence analysis of the *cytb* gene fragment (142 bp) revealed that all Brazilian isolates were identical and exhibited the nucleotide T from *A. lumbricoides* ([Loreille et al., 2001](#)) instead of C from *A. suum* at position 5522 (GenBank X54253).

4. Discussion

Light microscope confirmation of parasite eggs in fecal samples is the standard technique to diagnose *Ascaris* intestinal infections. However, this approach is limited when species differentiation is necessary. Nearly 8% of the *A. lumbricoides* world infection is in Latin American countries ([O’Lorcain and Holland, 2000](#)), where there is also increasing anthelmintic resistance in pastoral species ([Coles et al., 2006](#)). Furthermore, due to anthelmintic use, it has been difficult to obtain adult worms from the Brazilian human population. However, genetic data from South America are lacking. The molecular diagnostic tool developed enables *Ascaris* identification from fecal samples and has revealed a new *Ascaris* genotype circulating in the region.

Human and other animal feces have been used as a source of DNA to achieve species-specific molecular

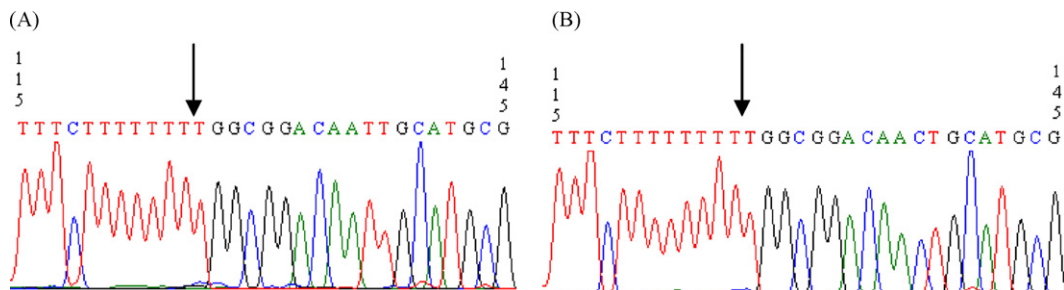


Fig. 2. DNA sequence chromatogram of ITS1 region comprising the polymorphism characteristic of *Ascaris* genotypes from Brazilian isolates. (A) G6 (DL04-c3) and (B) G1 (DL04-c6). The arrows indicate the deletion at position 127.

diagnosis for *Necator americanus*, *Ancylostoma* sp., *E. vermicularis*, *Oesophagostomum bifurcum*, *Ostertagia ostertagi*, taeniid worms, and other parasites (Verweij et al., 2001; Iñiguez et al., 2002; Traub et al., 2004; Harmon et al., 2006; Dyachenko et al., 2008). Some of these studies separated eggs from feces (by suspension or flotation) and some applied protocols to lyse eggs (ultrasonically, microwaving, boiling, freezing). *Ascaris* sp. eggs are protected by a four-layered shell, composed of a resistant lipid layer, a rigid chitinous layer, a vitelline membrane, and an almost impermeable external coat (Quilès et al., 2006). In this study we found that physical treatment applied to isolated eggs was sufficient to break their complex shell, and consequently free the DNA for amplification.

The best results for DNA extraction were obtained using physico-chemical treatment, which made it possible to diagnose 100% of fecal samples. The commercial kit, with the modification described here, was also efficient for *cytb* PCR (83.3%). With regard to PCR sensitivity, DNA extraction from *Ascaris* sp. eggs using physical or physico-chemical treatments provided DNA to determine nucleotide sequences from individual eggs. In this study the *cytb* fragment was excellent for detecting *Ascaris* sp. DNA but was not useful as a strong molecular marker to discriminate *Ascaris* sp. in feces. The PCR–RFLP analysis revealed identical patterns of G1 in all isolates (or the less probable genotype G4). The genotype G1, the most prevalent human genotype described, was then confirmed by nucleotide sequence analysis. However, the cloned analysis in 3 samples revealed a different ITS1 sequence haplotype, representing a new genotype, here called G6. Until now five *Ascaris* genotypes have been identified in humans and three in both humans and pigs, but the identification of a new genotype in samples from Brazil raises fundamental questions about genotype G6. It is essential to know its frequency in humans in other urban populations, its presence and frequency in pigs, as well as in rural human populations, where there is a close contact between the two hosts. The new genotype (G6) was found in 3 of 12 samples at a representative frequency of 25.0% compared to 91.6% for genotype G1. In spite of the short sequences analyzed, we have evidence that the *Ascaris* sp. molecular epidemiology in this region is similar to that in China where ITS1 genotype G1 is the most prevalent in humans. Further analysis, based on *Ascaris* isolated from Brazil and other South American countries, is needed to determine the presence and frequency of ITS1 genotypes, and their significance with regard to *Ascaris* epidemiology, diagnosis, and control.

In conclusion, in this study we described an *Ascaris* sp. molecular identification methodology using DNA extracted directly from feces, which is easily performed, not invasive, and highly specific and sensitive. The research also showed that, in addition to G1, a new ITS1 genotype of *Ascaris* is present in the Brazilian human population.

Acknowledgements

We thank Ary Carmo, Simone M.S. Lopez and Selma R. Lima for help with fecal examination, Koko Otsuki for technical assistance and PDTIS/FIOCRUZ genomic platform for sequencing. This study was supported by IOC/FIOCRUZ, CAPES, CNPq/PAPES-FIOCRUZ, and FAPERJ.

References

- Anderson, T.J.C., 1995. *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. *Parasitology* 110, 215–219.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Sanson-Himmels, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruyse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 31, 167–185.
- Criscione, C.D., Anderson, J.D., Sudimack, D., Peng, W., Jha, B., Williams-Blangero, S., Anderson, T.J., 2007. Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2669–2677.
- Crompton, D.W.T., 1999. How much human helminthiasis is there in the world? *J. Parasitol.* 85, 397–493.
- Dyachenko, V., Beck, E., Pantchev, N., Bauer, C., 2008. Cost-effective method of DNA extraction from taeniid eggs. *Parasitol. Res.* 102, 811–813.
- Harmon, A.F., Zarlenga, D.S., Hildreth, M.B., 2006. Improved methods for isolating DNA from *Ostertagia ostertagi* eggs in cattle feces. *Vet. Parasitol.* 135, 297–302.
- Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J., 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 14, 397–400.
- Kohn, M.H., Wayne, R.K., 1997. Facts from feces revisited. *Tree* 12, 223–227.
- Iñiguez, A.M., Vicente, A.C.P., Araújo, A., Ferreira, L.F., Reinhard, K., 2002. *Enterobius vermicularis*: specific detection by amplification of an internal region of 5S ribosomal RNA intergenic spacer and trans-splicing leader RNA analysis. *E. vermicularis*: specific detection by PCR and SL1 RNA analysis. *Exp. Parasitol.* 102, 218–222.
- Loreille, O., Roumat, E., Verneau, O., Bouchet, F., Hänni, C., 2001. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *Int. J. Parasitol.* 31, 1101–1106.
- Nejsum, P., Parker, E., Frydenberg, J., Roepstorff, A., Boes, J., Haque, R., Astrup, I., Jørgen, P., Sørensen, U.B.S., 2005. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1142–1148.
- O'Lorcain, P., Holland, C.V., 2000. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology* 121, 51–71.
- Pääbo, S., 1990. Amplifying ancient DNA. In: Innis, M.A., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, pp. 159–166.
- Peng, W., Yuan, K., Zhou, X., Hu, M., EL-Osta, Y.G., Gasser, R.B., 2003. Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Electrophoresis* 24, 2308–2315.
- Peng, W., Yuan, K., Hu, M., Zhou, X., Gasser, R.B., 2005. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic regions of China. *Electrophoresis* 26, 4317–4326.
- Quilès, F., Balandier, J.Y., Capizzi-Banas, S., 2006. In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris* eggs. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 249–255.
- Traub, R.J., Robertson, I.D., Irwin, P., Mencke, N., Thompson, R.C.A., 2004. Application of a species-specific PCR–RFLP to identify *Ancylostoma* eggs directly from canine faeces. *Vet. Parasitol.* 123, 245–255.
- Verweij, J.J., Pit, D.S.S., van Lieshout, L., Baeta, S.M., Dery, G.D., Gasser, R.B., Polderman, A.M., 2001. Determining the prevalence of *Oesophagostomum bifurcum* and *Necator americanus* infections using specific PCR amplification of DNA from faecal samples. *Trop. Med. Int. Health* 6, 726–731.
- Zhu, X., Chilton, N.B., Jacobs, E., Boes, J., Gasser, R.B., 1999. Characterization of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 29, 469–478.

ANEXO II



Short communication

ITS1 intra-individual variability of *Ascaris* isolates from BrazilDaniela Leles^{a,b}, Adauto Araújo^a, Ana Carolina Paulo Vicente^b, Alena Mayo Iñiguez^{b,*}^a Laboratório de Paleoparasitologia, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Brazil^b Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 August 2009

Received in revised form 30 September 2009

Accepted 3 October 2009

Available online 9 October 2009

Keywords:

Ascaris

Brazilian isolates

ITS intra-individual variability

Nematodes

Genetic characterization

Molecular diagnosis

ABSTRACT

The zoonotic potential of *Ascaris* infecting pigs has stimulated studies of molecular epidemiology with internal transcribed spacer 1 (ITS1) as the target. The aim of this study was to determine the value of *Ascaris* ITS1 as a molecular marker through assessing the intra-individual genetic diversity of *Ascaris* isolates from two geographical areas of Brazil. DNA was extracted from single isolated eggs, ITS1 PCR was performed, and the PCR products were cloned and sequenced. Clone analysis showed high ITS1 intra-individual variability revealed by 2–4 ITS1 genotypes/haplotypes per sample (egg). Two genotypes, G1 and G6, and 13 new haplotypes were detected and characterized. The most prevalent in humans, G1 and/or the Brazilian G6, were detected in all samples. Except for genotype G1, no relationship was observed between Brazilian ITS1 genotypes/haplotypes and those previously described in China, Bangladesh, Japan, United Kingdom, Australia, and Denmark, with respect to geographic origin or host affiliation. However, an association between the two geographically separated Brazilian ITS1 isolates was observed. The ITS1 intra-individual variability revealed in this study indicated that the use of this genetic region to discriminate human and pig *Ascaris* genotypes should be reconsidered.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

One of the major soil transmitted helminthiases (STHs) is the intestinal nematode *Ascaris lumbricoides* (L.), which is widely prevalent and has a cosmopolitan distribution [1,2]. Transmission is normally through the ingestion of infective *Ascaris* sp. eggs in contaminated soil and vegetables. A closely related species, *Ascaris suum* Goeze, infects pigs. Discrimination between *A. lumbricoides* and *A. suum* is difficult due to the absence of distinguishing morphological characteristics. Cases of cross-host infection have been reported in North America and Denmark [3,4]. Molecular epidemiology investigations have been proposed to determine if pigs are a potential reservoir of the *Ascaris* that infects humans [3–6]. Studies of genetic characterization and molecular diagnosis have used nuclear internal transcribed spacer 1 (ITS1), mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*), NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) targets, and recently, microsatellite markers [5–8]. Specifically, through the PCR–RFLP approach it was possible to identify ITS1 restriction patterns corresponding to *Ascaris* from human and pig hosts [7,9]. Genotype cross-infection was detected in North America by the presence in humans of the ITS1 pattern of *Ascaris* from pigs [9]. Similar results were observed in Denmark using ITS1 PCR–RFLP and AFLP approaches [4]. Using the SSCP technique, five ITS1 genotypes (G1–G5) were identified in human *Ascaris* and 3 in pig *Ascaris* (G1–G3) [5]. In six endemic regions of China, the genotype G1 frequently infected humans, and the genotype G3 was

predominant in pigs, while the other three genotypes were detected at lower frequencies in their respective hosts. These studies suggested that there is a particular host affiliation of ITS1 genotypes [5]. Recently, an ITS1 *Ascaris* analysis in Brazil detected G1 and also revealed the genotype G6 in the human population [10].

The aims of this research were to assess the ITS1 intra-individual variability in *Ascaris* isolates from Brazil and determine the value of this region as a molecular marker of human and pig *Ascaris*.

2. Material and methods

Human fecal samples positive for *A. lumbricoides* ($n = 9$) from Rio de Janeiro ($n = 7$) and Santa Isabel do Rio Negro ($n = 2$), Amazon, in southeast and northern Brazil, respectively, were analyzed (Table 1).

Table 1

Brazilian *Ascaris* samples, geographic origin, and ITS1 genotypes and haplotypes.

Samples	Geographic origin	Genotypes	Haplotypes
DL01	Rio de Janeiro—RJ, SE	G1/G6	–
DL02	Rio de Janeiro—RJ, SE	G1/G6	H1
DL04	Rio de Janeiro—RJ, SE	G6	H2–4
DL13	Rio de Janeiro—RJ, SE	G1	H5–6
DL15	Rio de Janeiro—RJ, SE	G1	H7
DL16	Rio de Janeiro—RJ, SE	G1	H8–9
DL17	Rio de Janeiro—RJ, SE	G6	H10–11
041–1	Santa Isabel do Rio Negro—AM, NO	G6	H12
104–5	Santa Isabel do Rio Negro—AM, NO	G1/G6	H13

RJ: Rio de Janeiro State, AM: Amazonas State, SE: Brazil southeast region, NO: Brazil north region.

* Corresponding author. Tel.: +55 21 3865 8168; fax: +55 21 2260 4282.

E-mail address: alena@ioc.fiocruz.br (A.M. Iñiguez).

Table 2
ITS1 polymorphic sites on genotypes/haplotypes of the *Ascaris* isolates from Brazil and worldwide.

Genbank	Genotypes/haplotypes	Country	Host	Nucleotide variation at alignment position									
				120	124	127	128	129	130	133	150	155	156
AJ554036	G1	Ba/Br/Ja/Ch	H/P	T	T	T	–	–	G	G	T	A	T
AJ554037	G2	Ch	H/P	.	.	.	T	.	.	S	.	.	.
AJ55403	G3	Ja/Ch	H/P	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.
AJ554039	G4	Ch	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AJ554040	G5	Ch	H	.	.	.	.	.	.	S	.	.	.
EF153621	G6	Br	H	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AJ000895	Al	Au	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
AJ000896	As	UK/De	P	.	.	.	T	T	.	C	.	.	.
GQ339794	H1	Br	H	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.
EU635686	H2	Br	H	.	.	–	.	.	.	.	.	.	C
EU635687	H3	Br	H	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.
EU635688	H4	Br	H	.	.	–	.	.	.	.	.	.	C
GQ339795	H5	Br	H	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GQ339796	H6	Br	H	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
GQ339797	H7	Br	H	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GQ339798	H8	Br	H	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GQ339799	H9	Br	H	.	–	.	.	.	.	.	.	.	.
EU635694	H10	Br	H	.	.	–	.	.	.	.	.	.	.
EU635695	H11	Br	H	.	.	–	.	.	T	.	.	G	C
GQ339800	H12	Br	H	–	.	.	.	.	.	.	.	.	.
GQ339801	H13	Br	H	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.

Numbers correspond to nucleotide position on reference sequence AJ554036 [5]. H: human, P: pig, Al: *A. lumbricoides* (without nomenclature), As: *A. suum* (without nomenclature), Ba: Bangladesh, Br: Brazil, Ch: China, Au: Australia, UK: United Kingdom, De: Denmark, Ja: Japan. S: nucleotide G or C, R: nucleotide A or G, W: nucleotide A or T. –: nucleotide deletion, dots: similar to reference sequence G1. ♥: in this paper.

To verify ITS1 intra-individual variability of *Ascaris*, DNA was extracted from a single egg isolated from each sample, and PCR was performed following the methodology of Leles et al. [10], using the primers XZ5 forward 5'-TGATGTAATAGCAGTCGGCG-3', XZ1 reverse 5'-GGAATGAACCCGATGGCGCAAT-3' and NC13 reverse 5'-GGCTGCG TTCTTCATCAT-3' [7]. To prove the intra-individual variability the PCR products were cloned into the pGEM-T Easy Vector System (Promega), and at least 3 clones for each sample were sequenced on both strands in a 3100 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) as described by the suppliers. Chromas v 1.45 (School of Health Science, Griffith University, Queensland, Australia), Bio Edit v 5.0.9 (Department of Microbiology, North Carolina State University, USA), and DAMBE v 4.2.13 were used for editing and sequence analysis. The nucleotide sequences from this study were deposited in the GenBank database under the accession numbers: EF1536919–23, EU635683–95, and GQ339794–GQ339801.

3. Results

Twenty eight ITS1 clones of isolated *Ascaris* eggs were obtained. Sequence analysis revealed 15 ITS1 sequence clones corresponding to 2 genotypes previously characterized, G1 and G6 [5,10], and 13 new haplotypes (sequence variants of ITS), referred to as H1–H13 (Table 1). In each sample, 2–4 genotypes/haplotypes were found. None of the samples showed the polymorphisms characteristic of the genotypes G2, G3, G4, or G5 (Table 2). The genotypes G1 and/or G6 were found in all samples, and each new haplotype in a single sample. The presence of G1 and G6 genotypes in both Brazilian geographical areas revealed a relationship between them. Except for genotype G1, no relationship was observed between Brazilian ITS1 genotypes/haplotypes and those previously described in China, Bangladesh, Japan, United Kingdom, Australia, and Denmark (Table 2).

4. Discussion

Criscione et al. [8] analyzed microsatellite loci of 129 *Ascaris* from humans and pigs from China, Guatemala, and Nepal. They concluded that hybridization occurs in *Ascaris* infecting sympatric populations of humans and pigs, and, consequently, long-term control measures should be re-evaluated. The two geographically separated locations

studied in Brazil have a high prevalence of *Ascaris*. Costa-Macedo et al. [11] recorded a prevalence of *Ascaris* infection of 25% in children from low-income families in Rio de Janeiro. The Santa Isabel do Rio Negro Amazonas region showed a prevalence of 40% in the general population [12]. In Brazil, diagnosis of parasite infection is generally by microscopy, which cannot discriminate between eggs of *Ascaris* from humans and pigs, and studies of the molecular epidemiology are rare.

In a previous study we identified two ITS1 *Ascaris* genotypes, G1 and G6, in the same fecal sample [10]. This suggested the possibility of intra-population diversity of ITS1 in *Ascaris*, due to co-infection with different *Ascaris* genotypes. However, it was not possible to assess ITS1 intra-individual variation. In the present study, considering a single *Ascaris* egg as an individual, ITS1 intra-individual variation was demonstrated by the presence of 2–4 genotypes/haplotypes in each sample. Considering that ribosomal spacers are non-coding regions and occur in multiple copies (~42 copies in *Ascaris* [13]), it is possible that differing ITS1 sequences occur in an individual egg. Some researchers have utilized two ITS1 in *Ascaris* based on 6-bp differences to discriminate the two species: *A. lumbricoides* and *A. suum* [5,7]. Peng et al. [5] proposed five *Ascaris* genotypes (G1–G5), of which genotypes G2, G4, and G5 contain ambiguous nucleotide positions. These ambiguous positions were interpreted by the authors as indicative of hybridization or interbreeding of individuals with different genotypes. We believe that each of these genotypes in fact represents two different genotypes characterized in an individual. Consequently, this suggests *Ascaris* ITS1 intra-individual diversity, which was not detected, because ITS1 cloning was not performed. Pecson et al. [13] developed a real-time PCR for quantifying viable *Ascaris* eggs based on ITS1 sequence. The authors used cloning and sequence analysis to verify the probe sequence. Interestingly, a human genotype clone was observed in eggs collected exclusively from pig intestine. We interpreted this finding as indirect evidence of ITS1 intra-individual variability (or intra-population variability, since more than one egg was used), which was observable only through *Ascaris* ITS1 cloning. ITS1 analysis without cloning assays revealed only one ITS1 copy, possibly the most frequent ITS1 copy, or a copy with ambiguous nucleotide positions, leading to genotype misclassification and/or data suppression of the genetic structure of the *Ascaris* population.

167	173	183	203	205	206	207	218	229	231	233	238	248	References
A	G	T	G	C	G	C	T	T	C	T	A	T	[5,10,19,▼]
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[5]
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	[5,19]
.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[5]
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	W	[5]
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	[10,▼]
.	.	.	.	S	–	–	.	.	.	.	.	.	[7]
.	.	.	.	S	–	–	.	.	.	.	.	A	[7]
.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	▼
.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	▼
.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	▼
G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	▼
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	▼
.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	▼
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	▼
.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	▼
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	▼
.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	▼
.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	▼
.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	▼

Based on the PCR–RFLP approach (ITS digestion of polymorphic *Hae* III site), Anderson [3] showed two ITS patterns in individual worms from Guatemala, suggesting hybridization. The ITS1 *Ascaris* intra-individual variability detected in this study showed multiple genotypes/haplotypes in each sample, even in samples from geographically separated regions with different historical and socio-environmental contexts. Though through different circumstances, hybridization between *Ascaris* from pigs and humans is plausible in both Brazilian regions studied. In Rio de Janeiro city, the breeding of pigs is common, mainly in areas with uncontrolled urbanization and low socio-economic conditions, the source of most of the samples used in this study, and hybridization between *Ascaris* from pigs and humans is possible. Currently the breeding of pigs is rare in the Santa Isabel do Rio Negro municipality. Santa Isabel do Rio Negro is located in a region covered by the Amazonian Rain Forest. The population is descended from Amerindian communities that were demographically concentrated and acculturated, adhering to the occidental life guided by Catholic missions. European missionaries arrived about a century ago and remained in the region until the 1970s. During this time, breeding of pigs was reported, and therefore a short period of human and domestic pig association was established. There is a more intense relationship between humans and wild pigs *Pecari tajacu* (L.) and *Tayassu pecari*, Link 1795 (called “caititu” and “queixada”, respectively). The wild pigs have been used as a food source or adopted as pets, being hunted, bred, and breastfed by humans [14]. Ascarididae eggs have been found in *Pecari tajacu* in Brazil and in *Tayassu Pecari* from Peruvian Amazon [15,16].

ITS is the most common marker used to discriminate nematode species, because it is one of the most variable nuclear loci [17,18]. However, ITS does not seem to be an efficient marker to discriminate *A. lumbricoides* and *A. suum*, possibly because they are so closely related. Significant similarity of the ITS region of these two species has been reported [3,7,9]. Ishiwata et al. [19] observed no clear genetic distance between *A. lumbricoides* and *A. suum*, with an estimation of 0.005 and 0.000 on ITS1 and ITS2 regions, respectively. A debate has arisen over whether human *Ascaris* infection originated before or after pig domestication, which occurred around 10000 years ago [20]. Studies of *Ascaris* mitochondrial targets to assess *Ascaris* molecular epidemiology of both human and pig populations have suggested that there is a particular haplotype host affiliation. However, a haplotype

common to both populations was also found [6]. The origin of human *Ascaris* infection is still a puzzle, and more studies and genetic data are needed.

In conclusion, this research showed intra-individual diversity of ITS1 in human *Ascaris* from Brazil, suggesting that the use of this region as a molecular marker to define and characterize *Ascaris* sp. genotypes from humans and pigs requires reconsideration.

Acknowledgements

We thank Koko Otsuki for her technical assistance and PDTIS/FIOCRUZ genomic platform and the Tropical Medicine Research Group (Adriano G. Silva, Carlos José C. Moreira, Filipe A. Carvalho-Costa, Lauren H. Jaegera, Joanna G. Valverde, Patrícia P. Martins, Márcio N. Bóia, and Viviane F. Meneses). This study was supported by IOC/FIOCRUZ, ENSP/FIOCRUZ, FAPERJ, CNPq, and CAPES.

References

- [1] Crompton DW. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol* 1999;85:397–403.
- [2] Keiser J, Utzinger J. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2008;299:1937–48.
- [3] Anderson TJC. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends Parasitol* 2001;17:183–8.
- [4] Nejsum P, ED Jr Parker, Frydenberg J, Roepstorff A, Boes J, Haque R, Astrup I, Prag J, Skov Sørensen UB. Ascariasis is a zoonosis in Denmark. *J Clin Microbiol* 2005;43:1142–8.
- [5] Peng W, Yuan K, Zhou X, Hu M, EL-Osta YG, Gasser RB. Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Electrophoresis* 2003;24:2308–15.
- [6] Peng W, Yuan K, Hu M, Zhou X, Gasser RB. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic regions of China. *Electrophoresis* 2005;26:4317–26.
- [7] Zhu X, Chilton NB, Jacobs E, Boes J, Gasser RB. Characterization of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 1999;29:469–78.
- [8] Criscione CD, Anderson JD, Sudimack D, Peng W, Jha B, Williams-Blangero S, Anderson TJ. Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proc Biol Sci* 2007;274:2669–77.
- [9] Anderson TJC. *Ascaris* infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. *Parasitology* 1995;110:215–9.
- [10] Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Iñiguez AM. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil. *Vet Parasitol* 2009;163:167–70.

- [11] Costa-Macedo LM, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Oliveira LM, Vianna MSR. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública* 1998;14:851–5.
- [12] Carvalho-Costa FA, Gonçalves AQ, Lassance SL, Silva Neto LM, Salmazo CA, Bóia MN. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2007;49:147–53.
- [13] Pecson BM, Barrios JA, Johnson DR, Nelson KL. A real-time PCR method for quantifying viable *Ascaris* eggs using the first internally transcribed spacer region of ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:7864–72.
- [14] Silva AL. Comida de gente: preferências e tabus alimentares entre os ribeirinhos do Médio Rio Negro (Amazonas, Brasil). *Rev Antropol* 2007;50:125–79.
- [15] Brandão ML (2007). Helmintos de mamíferos da região do Parque Nacional Serra da Capivara, sudeste do Piauí: diversidade e influências antrópicas. [MS Tesis: ENSP-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil].
- [16] Carlos N, Tantaleán M, Leguía VG, Paloma Alcázar P, Donadi R. Frecuencia de helmintos en huanganas silvestres (*Tayassu pecari*, Link 1795) residentes en áreas protegidas del departamento de Madre de Dios Perú. *Neotrop Helminthol* 2008;2:48–53.
- [17] Gasser RB, Newton SE. Genomic and genetic research on bursate nematodes: significance, implications and prospects. *Int J Parasitol* 2000;30:509–34.
- [18] Iñiguez AM, Santos CP, Vicente ACP. Genetic characterization of *Anisakis typica* and *Anisakis physeteris* from marine mammals and fish from the Atlantic Ocean off Brazil. *Veterinary Parasitology* 2009;165:350–356, doi:10.1016/j.vetpar.2009.07.012.
- [19] Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K, Horii Y, Tsuchiya K, Nawa Y. Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA sequencing. *Parasitol Res* 2004;92:50–2.
- [20] Loreille O, Bouchet F. Evolution of ascariasis in human and pigs: a multi-disciplinary approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98(suppl1):39–46.

ANEXO III

1 **Mitochondrial genetic characterization of human and pig *Ascaris* spp. isolates from**
2 **Brazil showed common haplotypes**

3

4 Running Title: **Mitochondrial *Ascaris* spp. haplotypes from Brazil**

5

6 Daniela Leles^{1,2}, Adauto Araújo¹, Ana Carolina P. Vicente², Maria de Lourdes A.
7 Rodrigues³, Anderson S. Dias⁴, Márcio N. Bóia², Filipe A. Costa², Amazonas Research
8 group², Alena M. Iñiguez^{2*}.

9

10 1 *Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz (ENSP-*
11 *FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil*

12 2 *Instituto Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ), Rio de Janeiro,*
13 *Brazil*

14 3 *Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rio de Janeiro, Brazil*

15 4 *Faculdade de Castelo (Facastelo), Espírito Santo, Brazil*

16

17 *Corresponding author. Address: Av. Brasil 4365, CEP 21045-900, Rio de Janeiro RJ,
18 Brazil. Tel.: 55 21 3865-8168. fax: 55 21 2260-4282

19 *E-mail: alena@ioc.fiocruz.br

20

21 **ABSTRACT**

22 **Background:** Molecular epidemiology of *Ascaris* spp. of human and porcine origin has
23 been proposed as a means to assess the potential of pigs as reservoirs for human
24 ascariasis. In China, mitochondrial molecular characterization showed a host species-
25 specific distribution of *Ascaris* haplotypes, but one haplotype (H9=P9) was common to
26 both hosts. The aim of this study was to characterize human and porcine *Ascaris* spp.
27 from Brazil based on their *nad1* and *cox1* genes.

28 **Methodology/Principal Findings:** We analyzed 45 human fecal samples, 31 from
29 Amazonas state in the north of Brazil and 13 from the Rio de Janeiro state, from
30 southeast Brazil. Three fecal samples from pigs in Rio de Janeiro, Minas Gerais, and
31 Espírito Santo states were also examined. Genetic analysis was performed using PCR,
32 cloning, nucleotide sequencing, and bioinformatics tools. The *Ascaris* sequence analysis
33 showed 5 *cox1* gene haplotypes of which two, H9=P9 and P3, were as described in the
34 Chinese samples, while three are new haplotypes. Haplotype H14=P3 was present in
35 both hosts. Five new haplotypes were detected for the *nad1* gene. One haplotype,
36 H12=P17, was present in both hosts. The genetic nucleotide divergence was 1.8% for
37 *cox1* and 2.2% for *nad1*. However, the divergence between haplotypes in human and
38 pig hosts is very small, 0.2% for *cox1*, and absent for *nad1*.

39 **Conclusions/Significance:** The most frequent human *Ascaris* haplotypes were common
40 in both northern and southeastern regions and were also found in pigs, indicating gene
41 flow between these populations. The minimal genetic divergence observed between
42 hosts suggested that species-specific analysis should be based on a larger mitochondrial
43 gene sequencing data set. In spite of Brazilian haplotypes being grouped with those of
44 lower prevalence in China, the fact that haplotypes from China were found in Brazil
45 suggested a relationship in the molecular epidemiology between *Ascaris* of those
46 countries.
47

48 **Author Summary**

49

50 *Ascaris* spp. are intestinal nematodes which infect humans and wild or domestic
51 animals, creating a significant public health problem. *Ascaris lumbricoides* (human) and
52 *Ascaris suum* (pig) are morphologically indistinguishable, so, to identify the risk of pigs
53 acting as a reservoir for human infection, molecular epidemiological studies are
54 required. Although 8% of the human *Ascaris* infections are in South America,
55 molecular epidemiology studies in this continent are rare. We reported previously the
56 molecular epidemiology of *Ascaris* spp. based on the ITS1 RNA region. However, the
57 ITS marker has not proven to be useful on distinguish *Ascaris* spp from porcine and
58 human origin and also distinct ITS1 haplotypes were found in the same individual. In
59 this study, mitochondrial genes were used to describe the molecular epidemiology of
60 *Ascaris* spp. in Brazil. Their mitochondrial haplotypes were determined from samples
61 taken from both human and porcine hosts in two regions of Brazil, the north and
62 southeast. This study revealed *Ascaris* spp. haplotypes in Brazil common to humans and
63 pigs and between two widely separated geographical regions.

64 **Introduction**

65 *Ascaris lumbricoides* (L.) is a human intestinal parasite with a cosmopolitan
66 distribution. It has been estimated that it infects billions of people, constituting a serious
67 public health problem mainly in developing countries [1]. *Ascaris suum* (Goeze 1782), a
68 parasite of pigs, infects millions of animals, resulting in considerable economic loss,
69 mainly in China and Denmark [2-3]. These two species have a similar transmission-
70 cycle and morphology, and whether they are distinct species is debated [3-4].

71 There is increasing interest in studies of molecular epidemiology of *Ascaris* from
72 humans and pigs, since host cross-infection has been reported [2-5]. Recently, Criscione
73 et al. (2007) verified hybridization between sympatric populations of human- and pig-
74 associated *Ascaris* spp [6]. They conclude that cross-transmission between host species
75 is possible and ascariasis control programs should be regularly evaluated. This issue
76 requires caution if it consider the increment of anthelmintic resistance [7]. If there is a
77 cross transmission between host species, possibly anthelmintic resistance could spread
78 in human population. Diagnosis of ascariasis is traditionally made by microscopic
79 examination for eggs, but differentiation between *A. suum* and *A. lumbricoides* by this
80 method is impossible. Molecular characterization studies are therefore crucial to
81 overcome such limitations.

82 Internal transcribed spacer 1 (ITS1) has been used to identify *Ascaris* from
83 humans and pigs [8-9]. In endemic regions of China, five ITS1 genotypes (G1-G5) have
84 been characterized in humans and 3 in pigs (G1–G3). The genotypes G1 and G3 are
85 predominant in humans and pigs, respectively [9]. In Brazil, genotype G1 was found to
86 be prevalent in humans, and a new genotype, G6, was also detected [10]. These studies
87 suggest that there is a particular host affiliation with ITS1 genotypes. However,
88 Anderson et al. (2001) has cautioned of the danger of using a single molecular marker

89 to distinguish *A. lumbricoides* and *A. suum* [4]. Furthermore, Leles et al. (2010)
90 demonstrated high intra-individual variability of the ITS1 in human *Ascaris* sp. Isolates,
91 which weakens the value of this region as a molecular maker [11].

92 Peng et al. (2005) conducted an extensive molecular epidemiological study of
93 *Ascaris* spp. isolates from humans and pigs in 6 Chinese Provinces [12]. Mitochondrial
94 genes *cox1* (cytochrome c oxidase subunit 1) and *nad1* (NADH dehydrogenase subunit
95 1) were characterized, and 20 haplotypes of *cox1*, 10 in humans (H1-H10) and 10 in
96 pigs (P1-P10). Twenty-six *nad1* haplotypes, 11 in humans (H1-H11) and 15 in pigs (P1-
97 P15) were identified. Because differing haplotypes were identified in human and
98 porcine hosts, and only one, the *cox1* haplotype H9/P9 was common to both, the authors
99 concluded that there is low gene flow between the two species.

100 These studies were chiefly conducted in Asia, a continent with greater
101 prevalence of both human and porcine ascariasis. Around 8% of infections with *A.*
102 *lumbricoides* are found in Latin American countries [13], which translates to
103 approximately 112 million people. In a previous study, we described the *Ascaris* sp.
104 molecular epidemiology in Brazil based on the ITS1 genetic marker [10]. We
105 demonstrated that the epidemiology of ascariasis was restricted to the extensive G1
106 genotype, but a new genotype, the Brazilian G6, was also frequent. Nevertheless, the
107 ITS marker has not proven to be useful for distinguishing *Ascaris* spp. [11]. Thus, the
108 aim of this study was to characterize human and pig *Ascaris* isolates from endemic
109 regions of Brazil with different social environment contexts, based on the mitochondrial
110 genes *cox1* and *nad1*.

111

112 **Materials and Methods**

113 **Ethics Statement**

114 The study protocols were reviewed and approved by the Ethical Research
115 Committee of Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil (protocols
116 0003.0.031.000.6 and CAAE 0011.0.009.000). A signed consent form was obtained
117 from each volunteer after they were informed about the study.

118 Samples

119 Human fecal samples (n=45) positive for *Ascaris* sp. by the Kato Katz method
120 [14] and by the spontaneous sedimentation method [16] were selected. Thirty-one were
121 from Santa Isabel Rio do Negro city, Amazonas, and 13 from Rio de Janeiro state, from
122 the north and southeast, respectively. An adult worm from Angola was included as a
123 control. Additionally, 2 adult worms from pigs, 1 from Rio de Janeiro city and 1 from
124 Espírito Santo state, and a fecal sample from Minas Gerais state, all in southeastern
125 Brazil, were analyzed (Table 1).

126 Genetic analysis

127 DNA extraction was conducted according Leles et al. (2009). PCR conditions
128 and primers applied were as described by Peng et al. [12] The PCR products were
129 cloned into the pGEM-T Easy Vector System (Promega) and/or were directly sequenced
130 using Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied
131 Biosystems) in a 3100 Automated DNA Sequencer (Applied Biosystems) as
132 recommended by the suppliers. The programs Chromas v1.45, Bio Edit v5.0.9,
133 GeneDoc v2.6.002, and DAMBE v4.5.9 were used for editing and sequence analysis.
134 The nucleotide divergence sequence (d) and standard error (SE) was calculated for each
135 gene for both hosts and also for both Brazilian geographic regions using the p-distance
136 model in the MEGA v. 4.1 program including all *cox1* and *nad1* sequences available in
137 GenBank. A Neighbor-joining (NJ) genetic tree was constructed in the MEGA v4.1
138 program and evaluated by bootstrap analysis of 1,000 replicates. Data on hosts and

139 geographic origin were included in the NJ tree. The nucleotide sequences from this
140 study were deposited in the GenBank database (accession numbers: GU326948,
141 GU326949, GU326950, GU326951, GU326952, GU326953, GU326954, GU326955,
142 GU326956, GU326957, GU326958, GU326959, GU326960, GU326961, GU326962,
143 GU326963, GU326964).

144

145 **Results**

146

147 We characterized human and pig *Ascaris* spp. isolates from endemic regions of
148 Brazil based on their mitochondrial genes *cox1* and *nad1*. The sequence analyses
149 revealed 5 haplotypes of the *cox1* gene. Two corresponded to haplotypes previously
150 characterized in China, H9=P9 and P3, which, in Brazil, were also found in humans and
151 designated H14=P3. Three are new haplotypes, designated H11-13 (Table 2a). The
152 haplotype H9=P9 was found in 9/34 (26%) of the Amazonas samples and was present
153 only in this region. The *cox1* haplotype H14=P3 was the most prevalent in Brazil, being
154 found in 22/34 (65%) samples from Amazonas state, in 100% of samples from Rio de
155 Janeiro state, and in one pig sample from Minas Gerais state. The control sample from
156 Angola also contained H14=P3 (Tables 2a, b).

157 Five new human haplotypes, H12-H16, and two new pig haplotypes, P16-P17,
158 were characterized in the *nad1* gene, and one haplotype was common to both host
159 species, here designated H12=P17 (Table 3a). The *nad1* haplotype H12/P17 was the
160 most prevalent, found in 22/27 (81.5%) of samples from the Amazonas region and in
161 11/13 samples (84.6%) from Rio de Janeiro state and a pig sample from Espírito Santo
162 state. The *nad1* haplotypes H13, H14, and H15 were found in 3/27 (11%), 1/27 (3.75%)
163 and 1/27 (3.75%) samples from Amazonas state, respectively. The haplotypes H16 and

164 P16 were found in a single human sample and in pig samples from Rio de Janeiro state
165 (Table 3a, b). The haplotype H12/P17 was also present in the worm from Angola.

166 The overall nucleotide distance of the *cox1* gene was 1.8% (SE=0.4) and of the
167 *nad1* gene was 2.2% (SE= 0.4). The *Ascaris cox1* nucleotide divergence from the
168 human host was 1.8% (SE=0.4) and from the pig was 1.4% (SE=0.3). The genetic net
169 distance between human and pig host groups was 0.2% (SE=0.1). The *nad1* nucleotide
170 divergence for human host was 2.3% (SE=0.5) and for pigs 2.1% (SE=0.5). Between
171 human and pig host groups it was 0.0% (SE=0.1). The results for overall nucleotide
172 distance by Brazilian geographic region for *cox1* in the northern region was 1.8%
173 (SE=0.5), but it was not possible to calculate for the southeastern region due to the
174 predominance of only one *Ascaris* sp. haplotype, P3=H14. For the *nad1* gene, haplotype
175 nucleotide distance from the northern region was 0.1% (SE=0.4), and from the
176 southeastern region it was 0.6% (SE=0.3). The net genetic diversity of *Ascaris* sp.
177 haplotype *nad1* between regions was 0.0% (SE=0.0).

178 The cladistic analysis of the *cox1* gene showed 2 major groups (A and B) (Fig.
179 1a). Most samples of group A (bootstrap 80%) are pig haplotypes from China (P4-P10),
180 and one was from Japan. There were 4 human haplotypes, as well as the most prevalent
181 haplotypes in China in both hosts, H9 and P7. In Brazil, the haplotype H9=P9, as well
182 as haplotypes H11 and H13, were present in group A, all from northern Brazil. On the
183 other hand, in group B, 7 human haplotypes (H1-H6, H10) and only 3 pig haplotypes
184 (P1-P3), from China, were observed. Interestingly, the most frequent haplotype in
185 Brazil P3, found only in pigs from China and designated here as P3=H14, was in this
186 group. A new Brazilian haplotype, H12, was also present in the same sub-cluster with a
187 high bootstrap (86%) (Fig. 1a).

188 The NJ tree based on *Ascaris* spp. *nad1* gene also showed two major clusters (A
189 and B) where host-specific sub-clusters were more evident (Fig. 1b). In group A (91%
190 bootstrap), there were 8 pig (P3, P5, P9-12, P14-15) and 4 human haplotypes from
191 China (H3-5, H10). Curiously, there is a sub-cluster of Brazilian haplotypes with the
192 exception of a single Chinese haplotype. This sub-cluster revealed the most frequently
193 found haplotype in the country, H12, also detected in pigs and therefore designated
194 H12=P17. A new pig *nad1* haplotype also grouped with human *Ascaris* sp. *nad1* in both
195 northern and southeastern regions of Brazil. In group B, 7 human (H1-2, 6-9, 11) and 7
196 pig (P1-2, 4, 6-8, 13) haplotypes from China were present, including the *Ascaris*
197 haplotype most prevalent in humans and pigs, H9 and P1. Only the human haplotype
198 H13 from Amazonas state belonged to this group (Fig. 1b).

199

200 **Discussion**

201 Vilas et al. (2005) compared the use of the ITS region with *nad1* and *cox1* genes
202 among closely related species of trematodes and cestodes and showed that
203 mitochondrial genes have greater sensitivity in revealing species with recent ancestry
204 [17]. This is the case for *Ascaris* spp. from human and pig. An interesting discussion
205 has arisen regarding the origin of ascariasis [18], raising the question: Did *A.*
206 *lumbricoides* emerge as a new human species after pig domestication, which occurred
207 about 10,000 years ago, or was it transferred to pigs before domestication?

208 Although the use of the ITS region has been proposed for discriminating *Ascaris*
209 spp. of human and porcine origin, the ITS1 nucleotide divergence between them is very
210 low, and the ITS2 regions are identical [8-9,19]. Additionally, a high ITS1 intra-
211 individual variability from *Ascaris* spp. in Brazil was detected, and, consequently, its
212 weakness as a molecular marker was demonstrated [11]. The genetic nucleotide

213 divergence of *Ascaris* spp. ITS1, based on all available GenBank data (02/2010), shows
214 the d value to be 0.9% (SE=0.3), which is noticeably lower than for those mitochondrial
215 genes computed in this study, *cox1*, d=1.8% and *nad1*, d=2.2%. This genetic variability
216 and the distribution of haplotypes observed for mitochondrial markers contributed to
217 elucidation of the *Ascaris* spp. molecular epidemiology. However, the divergence
218 between mitochondrial haplotypes in human and pig hosts is very small (0.2% for *cox1*)
219 or absent (for *nad1*). The tiny genetic divergence observed between hosts suggested that
220 the species-specific analysis should be based on a larger mitochondrial gene sequencing
221 data.

222 On the other hand, when the Brazilian geographical region was analyzed, both
223 genes revealed distinct genetic diversity among *Ascaris* spp. haplotypes, which was
224 higher in the north compared to the southeast. The *cox1* P3=H14 and *nad1* H12=P17
225 haplotypes, which are the most prevalent in Brazil, are widespread in both regions,
226 showing that, although the regions are geographically distant and have different social
227 environment contexts, any barriers seem to be breached. In both regions there has
228 traditionally been a close relationship between humans and domestic or wild pigs (Fig.
229 2). Samples from Rio de Janeiro come from areas with uncontrolled urbanization and
230 low socio-economic conditions, where pig breeding is common. In the states of Minas
231 Gerais and Espírito Santo small pig farms exist in which there is widespread close
232 contact between humans and pigs. In Santa Isabel do Rio Negro, in northern Brazil,
233 domestic pig breeding is unusual but this population is descended from Amerindian
234 communities. About a century ago European missionaries arrived and stayed until the
235 1970s, during which time domestic pig breeding was reported. Even so, there has been
236 an intense relationship between humans and wild pigs in the region, having wild pigs as
237 pets or family members (Fig. 2). *Ascaris* eggs have been found in the latter [20,21,22].

238 Considering that the genes revealed distinct genetic diversity between the Brazilian
239 regions, being significantly higher in the north, this could be explained, not only by the
240 role played by domestic pigs, but also by wild pigs, in transmitting *Ascaris* in the
241 Amazonas region.

242 The genetic analysis tree also showed that, in general, *Ascaris* spp. haplotypes
243 from Brazil grouped with those in China which are less prevalent. Regarding the
244 *Ascaris* spp. host landscape, the context is more relevant for the P3 *cox1* haplotype,
245 which was described only in pigs in China, whereas in Brazil it is the most prevalent in
246 humans but also found in pig. This is evidence of cross-transmission of an *Ascaris*
247 haplotype from humans to pigs or *vice versa*. The same was observed with the *nad1*
248 gene analysis, where the most prevalent haplotype in humans from Brazil is the
249 H12=P17, which was also found in a pig host. In this work the designation of *cox1*
250 P3=H14 and *nad1* H12=P17 haplotypes *per se* indicated their presence in both hosts,
251 and despite the small sample size of pig *Ascaris*, showed that there is gene flow
252 between the host species within Brazil, and also in China.

253 In conclusion, the *Ascaris* spp. haplotypes were common in northern and south
254 eastern regions of Brazil, despite geographical distance and distinct socio-
255 environmental contexts. Although the most prevalent haplotypes in Brazil grouped with
256 those of lower prevalence in China, the fact that haplotypes from China were also found
257 in Brazil shows a relationship between the molecular epidemiology of *Ascaris* spp. from
258 the two countries. Finally, the most prevalent human haplotypes in Brazil were also
259 found in pigs, indicating gene flow between the populations. Our results indicate the
260 need for a genetic survey of *Ascaris* spp. haplotypes distribution, as well as a review of
261 the potential of pigs as a reservoir for human ascariasis.

262

263 **Supporting Information.**

264 Table 1A and 1B

265 *Nad1* and *Cox1* polymorphic sites on haplotypes of the *Ascaris* spp. isolates from Brazil

266 and worldwide.

267

268 **Acknowledgements**

269 We thank Ary Carmo, Simone M.S. Lopez, Selma R. Lima from
270 ENSP/FIOCRUZ for assisting with the fecal examinations, Koko Otsuki from
271 IOC/FIOCRUZ for nucleotide sequencing, and Rosa de Fátima Ferreira Ministério da
272 Saúde/Angola for supplying the *Ascaris* sample. This study was supported by
273 IOC/FIOCRUZ, ENSP/FIOCRUZ, CNPq, CAPES and FAPERJ. The funders had no
274 role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of
275 the manuscript.

276 Amazonas Research Group Members: Adriano G. Silva, Carlos José C. Moreira,
277 Lauren H. Jaeger, Joanna G. Valverde, Patrícia P. Martins, Viviane F. Meneses.

278

279 **Author Contributions**

280 Conceived and designed the experiments: AMI DL. Performed the experiments:
281 DL AMI. Analyzed the data: AMI DL. Contributed materials/analysis tools: AA APV
282 AMI DL MAR ASD MNB FAC Amazon Research Group. Wrote the paper: DL AMI.
283 Edited and revised the manuscript: AMI DL AA APV.

284 **References**

- 285 1. Crompton DWT (1999) How much human helminthiasis is there in the world. J
286 Parasitol 85: 397-493.
- 287 2. Nejsum P, Parker ED Jr, Frydenberg J, Roepstorff A, Boes J, Haque R, Astrup I,
288 Prag J, Skov Sørensen UB (2005) Ascariasis is a Zoonosis in Denmark. J Clin
289 Microbiol 43: 1142-1148.
- 290 3. Peng W, Yuan K, Hu M, Gasser RB (2006). Recent insights into the
291 epidemiology and genetics of *Ascaris* in China using molecular tool.
292 Parasitology 19: 1-6.
- 293 4. Anderson TJC (2001) The dangers of using single locus markers in parasite
294 epidemiology: *Ascaris* as a case study. Trends Parasitol 17: 183-188.
- 295 5. Anderson TJC (1995) *Ascaris* infections in humans from North America:
296 molecular evidence for cross-infection. Parasitology 110: 215-219.
- 297 6. Criscione CD, Anderson JD, Sudimack D, Peng W, Jha B, Williams-Blangero S,
298 Anderson TJ (2007) Disentangling hybridization and host colonization in
299 parasitic roundworms of humans and pigs. Proc Biol Sci 274: 2669-2677.
- 300 7. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Sanson-Himmels G,
301 Silvestre A, Taylor MA, Vercruysse J (2006) The detection of anthelmintic
302 resistance in nematodes of veterinary importance. Vet Parasitol 31: 167-185.
- 303 8. Zhu X, Chilton NB, Jacobs E, Boes J, Gasser RB (1999) Characterization of
304 *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. Int J
305 Parasitol 29: 469-478.
- 306 9. Peng W, Yuan K, Zhou X, Hu M, EL-Osta YG, Gasser RB (2003) Molecular
307 epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China based on single-

strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA.
Electrophoresis 24: 2308-2315.

10. Leles D, Araújo A, Vicente AC, Iñiguez AM (2009). Molecular diagnosis of
ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in
Brazil. Vet Parasitol 163: 167-70.

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

12. Peng W, Yuan K, Hu M, Zhou X, Gasser RB (2005) Mutation scanning-
coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions
reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic
regions of China. Electrophoresis 26:4317-4326.

13. O' Lorcain P, Holland CV (2000) The public health importance of *Ascaris*
lumbricoides. Parasitology 121: 51-71.

14. Kato K (1960) A correct application of the tick-smear technic with cellophane
paper cover. A Pamphlet: 1-9.

15. Katz N, Chaves A, Pellegrino J (1972) A simple device for quantitative stool
thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Rev Inst Med trop 14:
397-400.

16. Lutz A (1919) O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo
observações feitas no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz 11: 121-155.

17. Vilas R, Criscione CD, Blouin MS (2005) A comparison between mitochondrial
DNA and the ribosomal internal transcribed regions in prospecting for cryptic
species of platyhelminth parasites. Parasitology 131: 1-8.

18. Loreille O, Bouchcet F (2003) Evolution of ascariasis in human and pigs: a
multi-disciplinary approach. Mem Inst Oswaldo Cruz 98 (suppl.1): 39-46.

- 333 19. Ishiwata K, Shinohara A, Yagi K, Horii Y, Tsuchiya K, Nawa Y (2004)
334 Identification of tissue-embedded ascarid larvae by ribosomal DNA
335 sequencing. *Parasitol Res* 92: 50-52.
- 336 20. Brandão ML (2007). *Helmintos de mamíferos da região do Parque Nacional*
337 *Serra da Capivara, sudeste do Piauí: diversidade e influências antrópicas.*
338 *Tesis: ENSP-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.*
- 339 21. Silva AL. Comida de gente: preferências e tabus alimentares entre os ribeirinhos
340 do Médio Rio Negro (Amazonas, Brasil) (2007). *Rev Antropol* 50:125–79.
- 341 22. Carlos N, Tantaleán M, Leguía VG, Paloma Alcázar P, Donadi R (2008).
342 Frecuencia de helmintos en huanganas silvestres (*Tayassu pecari*, Link 1795)
343 residentes en áreas protegidas del departamento de Madre de Dios Perú.
344 *Neotrop Helminthol* 2: 48-53.
- 345

346 **Figure legends**

347 **Fig. 1A.** Neighbor-Joining (NJ) cluster analysis inferred from the *Ascaris* spp. *cox1*
348 gene. Support for the branching order was determined by 1,000 bootstrap replicates.
349 Only values $\geq 50\%$ are shown. Ch: China, Jp: Japan, Br: Brazil and An: Angola. Black
350 circle: haplotypes from northern and southeastern Brazil. Black lozenge: haplotypes
351 found only in northern Brazil.

352

353 **Fig. 1B.** Neighbor-Joining cluster analysis inferred from *Ascaris* spp. *nad1* gene.
354 Support for the branching order was determined by 1,000 bootstrap replicates. Only
355 values $\geq 50\%$ are shown. Ch: China, Br: Brazil, An: Angola. Black circle: haplotypes
356 from northern and southeastern Brazil. Black lozenge: haplotypes found only in
357 northern Brazil. Black triangle: haplotypes found only southeast region from Brazil.

358

359 **Fig. 2:** Native Guajá from northeastern Brazil breastfeeding a wild pig “queixada”.
360 Source: Pisco Del Gaiso, Folha de São Paulo- Brazil, 1992.

361 **Table 1**

362 Description of the samples from this study, geographical and host origins.

363

Locality (n)	Host	Samples
Rio de Janeiro, Brazil (13)	Human	DL01-06; 12-17, 22
Amazonas, Brazil (31)	Human	SI11-12; SI15; SI24; 010.7; 033.5; 040.1; 040.4; 041.1; 043.4; 061.10; 062.1; 071.6; 082.5; 103.4; 104.1-2, 4-5; 113.4; 115.2; 126.5-6; 128.3, 5-6, 8; 152.1; 157.15; 163.6; 164.1
Angola (1)	Human	HAn
Minas Gerais, Brazil (1)	Pig	PMG4
Espírito Santo, Brazil (1)	Pig	PES1
Rio de Janeiro, Brazil (1)	Pig	PRJ1

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376 **Table 2A**377 Samples, hosts, locality and haplotypes of the *cox1* gene of *Ascaris* spp.

Haplotypes (*n)	Host	*Samples	Country	Access Number
H1-H8	Human	NA	China	AJ968324-31
*H9=P9 (9)	Human, Primate no	010.7; 041.1; 043.4; 071.6;	China	AJ968332
	human and Pig	082.5; 104.5; 128.5; 128.8;	Brazil	AJ968342
		152.1		EU628688
				*GU326952
H10	Human	NA	China	AJ968333
*H11	Human	SI11	Brazil	* GU326953
*H12	Human	SI15	Brazil	* GU326954
*H13	Human	104.2	Brazil	* GU326955
*H14=P3 (37)	Human and Pig	HAn; DL01-06; DL12-17;	China	AJ968336
		DL22; SI12; SI24; 010.7;	Angola	*GU326948
		033.5; 040.4; 043.4;	Brazil	* GU326949
		061.10; 062.1; 082,5;		* GU326950
		103.4; 104.1; 113.4; 115.2;		* GU326951
		126.5-6; 128.3; 128.5-6, 8;		
		152.1; 163.6; 164.1;		
		PMG4		
P1	Pig	NA	China	AJ968334
				X54253
P2	Pig	NA	China	AJ968335

P4	Pig and Primate no	NA	China	AJ968337
	human			EU628687
P5-P10	Pig	NA	China	AJ968338-43
PJp	Pig	NA	Japan	AB125698
378	*Haplotypes, (n) and samples found in this study. NA: not available			
379				

380 **Table 2B**

381 Prevalence of the *cox1* haplotypes of *Ascaris* spp. from human (H) and porcine (P)

382 hosts.

Haplotypes	China (%)	Brazil		
		North (%)	Southeast (%)	Total (%)
H1	6 (1.5)	0	0	0
H2	1 (0.3)	0	0	0
H3	14 (3.6)	0	0	0
H4	4 (1)	0	0	0
H5	15 (3.8)	0	0	0
H6	13 (3.3)	0	0	0
H7	4 (1)	0	0	0
H8	2 (0.5)	0	0	0
*H9=P9	325 (82.9)/ 4 (1.2)	9 (26)	0	9 (18.7)
H10	2	0	0	0
Subtotals	392	NA	NA	NA
*H11	0	1 (3)	0	1 (2.1)
*H12	0	1 (3)	0	1 (2.1)
*H13	0	1 (3)	0	1 (2.1)
*H14=P3	54 (16.3)	22 (65)	14 (100)	36 (75)
P1	82 (24.8)	0	0	0
P2	4 (1.2)	0	0	0
P4	8 (2.4)	0	0	0
P5	4 (1.2)	0	0	0
P6	4 (1.2)	0	0	0

P7	124 (37.5)	0	0	0
P8	46 (14)	0	0	0
P10	1 (03) 0.3	0	0	0
Subtotals/total	331	34	14	48

383 NA: not available, *: haplotypes found in Brazil

384

385 **Table 3A**

386 Samples, host, locality and haplotypes of the *nad1* gene of *Ascaris* spp.

387

Haplotypes (*n)	Host	*Samples	Country	*Access Number
H1-H11	Human	NA	China	AJ968344-54
*H12=P17 (33)	Human and Pig	DL01-02; DL05-06; DL13-17; 010.7; 040.4; 043.4; 061.10; 062.1; 071.6; 082.5; 104.1, 4- 5; 113.4; 115.2; 126.5-6; 128.3, 5-6, 8; 152.1; 157.15; 163.6; 164.1; HAn; PES1	Brazil	* <u>GU326956</u> * <u>GU326957</u> * <u>GU326958</u> * <u>GU326959</u>
*H13 (3)	Human	040.1; 041-1; 082-5	Brazil	* <u>GU326960</u>
*H14 (1)	Human	103.4	Brazil	* <u>GU326961</u>
*H15 (1)	Human	115.2c2	Brazil	* <u>GU326962</u>
*H16 (1)	Human	DL04	Brazil	* <u>GU326963</u>
P1-P3, P4/P7, P5-P6, P8-P15	Pig	NA	China	AJ968355-69
*P16 (1)	Pig	PRJ1	Brazil	* <u>GU326964</u>
P	Pig	NA	NA	X54253

388 *Haplotypes, n, samples and access number this study. NA: not available

389

390

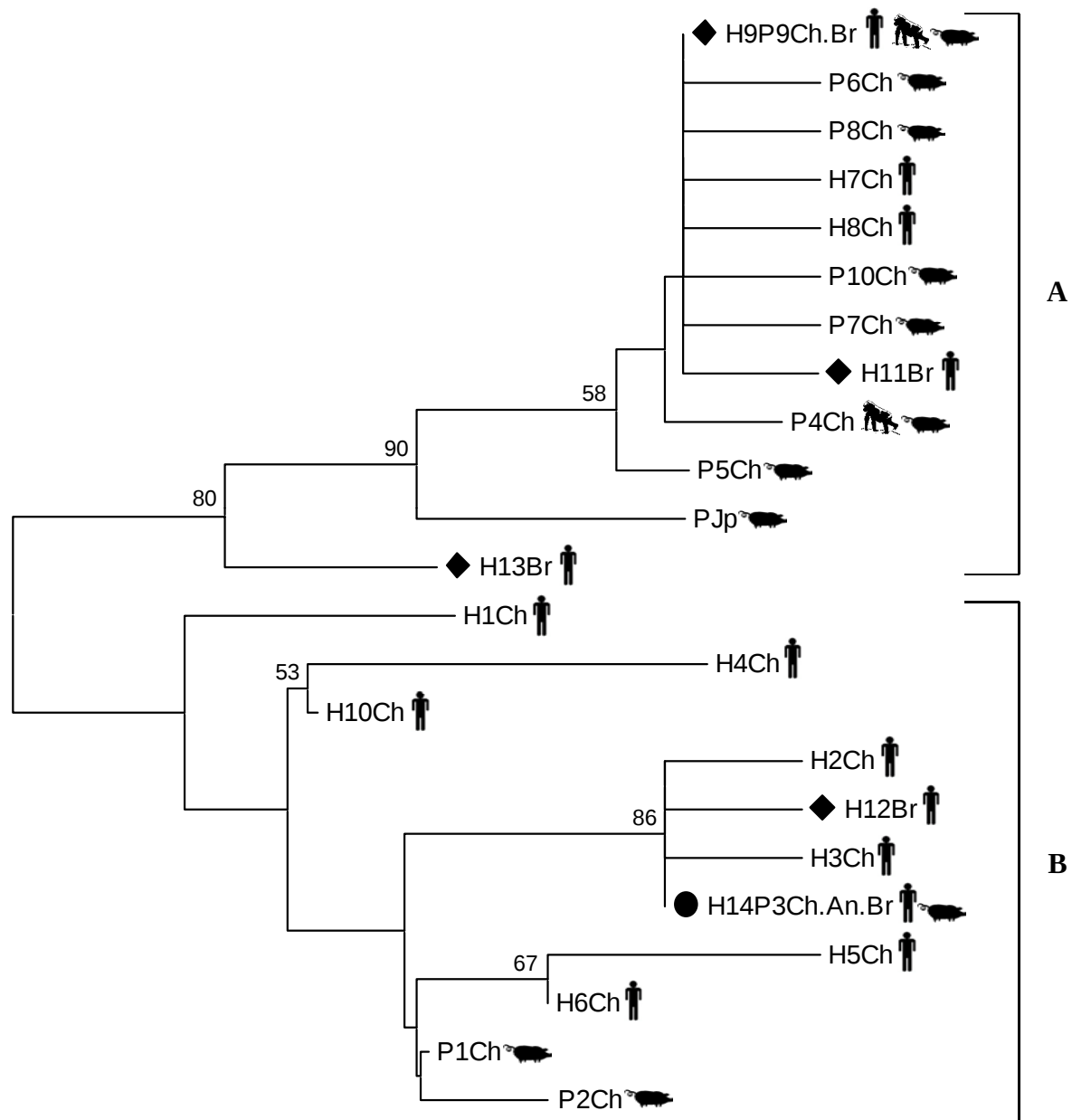
391 **Table 3B**

392 Prevalence of the *nad1* haplotypes of *Ascaris* spp. from human (H) and porcine (P)
 393 hosts.

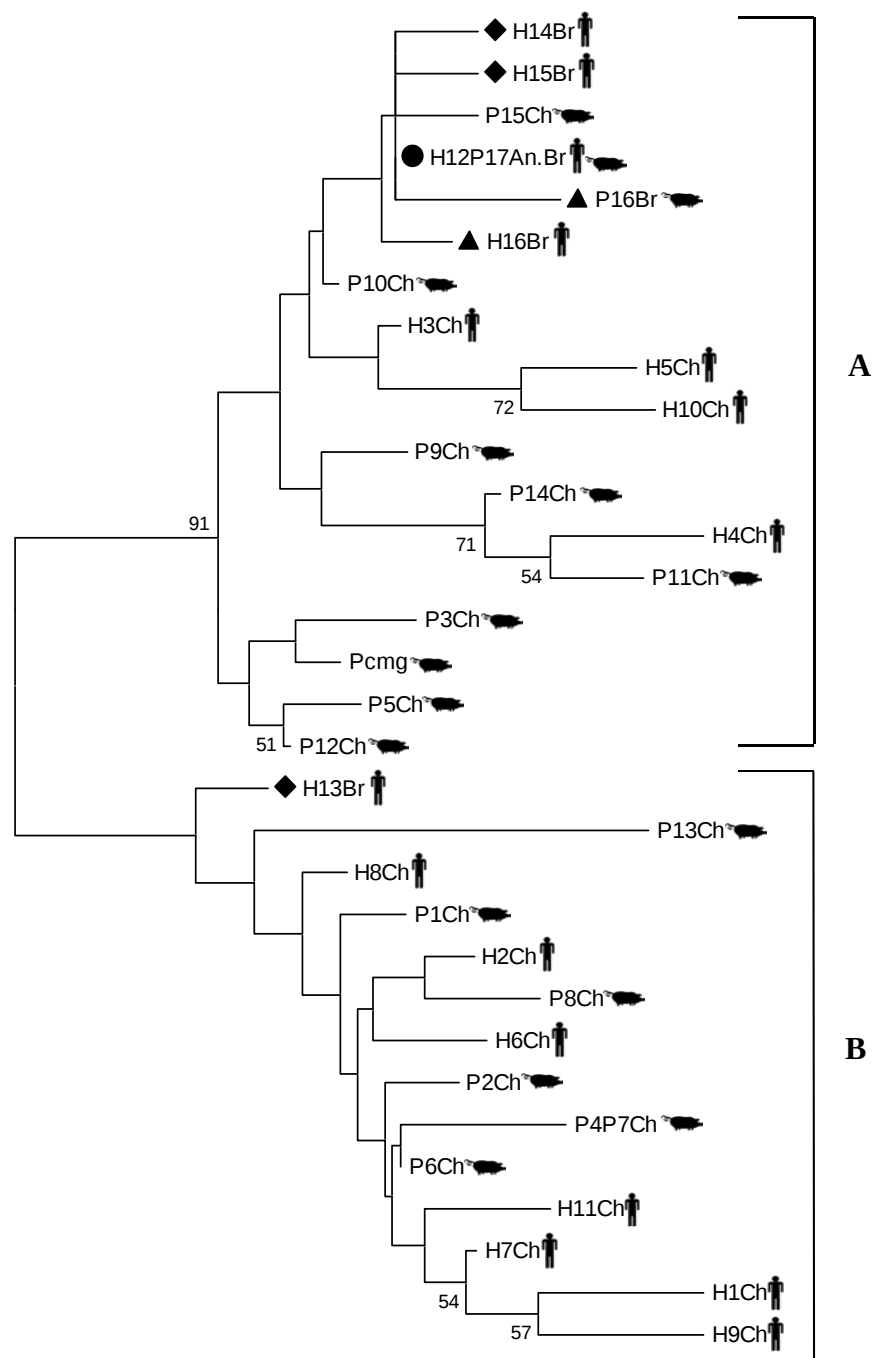
Haplotypes	China (%)	Brazil		
		North (%)	Southeast (%)	Brazil (%)
H1	2 (0.4)	0	0	0
H2	6 (1.3)	0	0	0
H3	46 (10)	0	0	0
H4	1 (0.2)	0	0	0
H5	9 (2)	0	0	0
H6	1 (0.2)	0	0	0
H7	10 (2.2)	0	0	0
H8	2 (0.4)	0	0	0
H9	371 (81.2)	0	0	0
H10	3 (0.7)	0	0	0
H11	6 (1.3)	0	0	0
*H12=P17	0	22 (81.5)	11 (84.6)	33 (82.5)
*H13	0	3 (11)	0	3 (7.5)
*H14	0	1 (3.75)	0	1 (2.5)
*H15	0	1 (3.75)	0	1 (2,5)
*H16	0	0	1 (7.7)	1 (2.5)
Subtotals	457	NA	NA	NA
P1	165 (58.7)	0	0	0
P2	4 (1.4)	0	0	0
P3	6 (2.1)	0	0	0

P4/P7	20 (7.1)	0	0	0
P5	45 (15.3)	0	0	0
P6	1 (0.4)	0	0	0
P8	1 (0.4)	0	0	0
P9	7 (2.5)	0	0	0
P10	18 (6.4)	0	0	0
P11	3 (1.1)	0	0	0
P12	1 (0.4)	0	0	0
P13	6 (2.1)	0	0	0
P14	2 (0.7)	0	0	0
P15	3 (1.1)	0	0	0
*P16	0	0	1 (7.7)	1 (2.5)
Subtotals	281	27	13	40

394 NA: not available, *: haplotypes found in Brazil.



1



1



ANEXO IV

Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Columbian South America times

Daniela Leles, Adauto Araújo, Luiz Fernando Ferreira, Ana Carolina Paulo Vicente¹, Alena Mayo Iñiguez^{1/+}

Escola Nacional de Saúde Pública-Fiocruz ¹Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Av Brasil 4365, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Paleoparasitological studies using microscopy showed that Ascaris and Trichuris trichiura are the human intestinal parasites most found in archaeological sites. However, in pre-Columbian South American archaeological sites, Ascaris is rare. In this work we standardized a molecular methodology for Ascaris diagnosis directly from ancient DNA retrieved from coprolites. Using cytochrome b gene (142 bp) target, ancient DNA sequences were retrieved from South American samples, negative by microscopy. Moreover, the methodology applied was sensitive enough to detect ancient DNA extracted from 30 Ascaris eggs from an European coprolite. These results revealed a new scenery for the paleodistribution of Ascaris in South America.

Key words: *Ascaris* - molecular paleoparasitological diagnosis - paleodistribution

The human intestinal parasite *Ascaris lumbricoides* has a cosmopolitan distribution affecting about 1.4 billion people (Lukes et al. 2005). The infection by *A. lumbricoides* and *Trichuris trichiura* is one of the most common parasitic associations, probably due to similar transmission cycles and ecological niches occupied. Paleoparasitological studies using microscopy for detecting parasite egg morphology showed that these intestinal parasites are the most commonly found in archaeological material (Bouchet et al. 2003, Gonçalves et al. 2003). Based on data from Gonçalves et al. (2003), the association of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* eggs was found in over 80% of European archaeological sites, and in approximately 100% of ancient remains from the Medieval Age. However, *A. lumbricoides* eggs in pre-Columbian South American samples are uncommon. The only finding dated of 4,227 Before Present (BP) was found in the Huarmey Valey site, Peru (Patrucco et al. 1983). In contrast, *T. trichiura* eggs are frequently found, having been identified in seven archaeological sites in Brazil, Chile, and Peru, dated of 8000 - 950 BP (Table). The absence of any morphological characteristics to distinguish *A. lumbricoides* from *Ascaris suum* eggs (parasite of swine) makes difficult the diagnosis in archaeological material, especially those from the Medieval Age when swine had already been domesticated and lived in close relation to humans (Loreille & Bouchet 2003, Rocha et al. 2006). Nuclear and mitochondrial DNA sequences have been used as molecular targets in order to discriminate these two related species (Zhu et al. 1999, Anderson 2001, Peng et al. 2005). However, there is no clear genetic definition yet between the two *Ascaris* species parasitizing humans and those of pigs (Anderson 2001).

The first molecular paleoparasitological study of *Ascaris* sp. recovered ancient DNA (aDNA) from parasite eggs from samples of the Middle Age site "Place d'Armes" in Namur (XIV century) (Loreille et al. 2001). This successful study was possibly due to a parasite egg high concentration in the latrine coprolites (Loreille & Bouchet 2003). However, this is not the scenery for South American archaeological sites where the findings of *Ascaris* sp. are less frequent and the amount of recovered helminth eggs is low. Recently, Iñiguez et al. (2006) succeeded in recovering *Enterobius vermicularis* aDNA sequences from pre-Columbian samples, opening the possibility of molecular diagnosis using aDNA extracted directly from coprolites. In order to study the temporal and spatial distribution of *Ascaris* in the past, the objective of this work was to develop a methodology of DNA extraction and *Ascaris* molecular diagnosis, sensitive enough to be applied to aDNA extracted directly from coprolites.

Six coprolites samples, which four were positive through microscopy for *T. trichiura*, and all negative for *A. lumbricoides*, were selected for this study (Ferreira et al. 1980, 1982, 1983, Gonçalves et al. 2003). One sample was from Brazilian Northeast (Toca do Meio, National Park of Serra da Capivara, state of Piauí) and four from the state of Minas Gerais, Southeast region (one from Lapa Pequena, one from Boqueirão Soberbo and two from Gruta do Gentio II archaeological sites), and one sample was from Tulán, San Pedro de Atacama, Chile (Table). The human origin of coprolites was suggested by archaeological context and/or confirmed by the finding of *E. vermicularis* and *T. trichiura* eggs, parasites specific to humans (Confalonieri et al 1985, Confalonieri 1988, Iñiguez et al. 2003b). The absence of parasite was considered after examination of forty slides for each sample at magnification of 100 X and 400 X. Precautions to prevent contamination by modern DNA and thus to obtain authentic ancient sequences were followed as described elsewhere (Drancourt & Raoult 2005). Preparation of coprolites samples, aDNA extraction, and polymerase chain reaction (PCR), were carried out at the Paleogenet-

Financial support: IOC-Fiocruz, ENSP-Fiocruz, PAPES-Fiocruz, CNPq, CAPES

+ Corresponding author: alena@ioc.fiocruz.br

Received 5 September 2007

Accepted 27 December 2007

TABLE
Ascaris lumbricoides and *Trichuris trichiura* finds in pre-Columbian South American archaeological sites and morphological and molecular paleoparasitological analysis

Archaeological sites	Country	Microscopy analysis ^a		Molecular analysis ^b		Date	References
		<i>T. trichiura</i>	<i>Ascaris</i>	<i>Ascaris</i>			
Toca do Meio, PI	Brazil	– ^e	–	+	+	8800 ± 60 BP ^h	Gonçalves et al. 2003
Lapa Pequena, MG	Brazil	+	–	+	+	8000 – 7000 BP	Gonçalves et al. 2003
Boqueirão Soberbo, MG	Brazil	+	–	–	–	4905 ± 85 – 1325 ± 60 BP	Ferreira et al. 1982
Huarmey Valley	Peru	–	+	+	NI	4227 ± 181 BP	Patrucco et al. 1983
Santa Elina, MT	Brazil	+	–	+	NI	4000 – 2000 BP	Gonçalves et al. 2003
Gruta do Gentio II, MG	Brazil	+/–	? ^d	+/–	+	3490 ± 120 – 430 ± 70 BP	Ferreira et al. 1980, 1983
Tulán, San Pedro de Atacama	Chile	+	–	+	+	3030 – 2900 BP	Gonçalves et al. 2003
Estrago Cave, PE	Brazil	+	–	+	NI	2000 BP	Ferreira et al. 1989
Huarmey Valley	Peru	+	–	+	NI	950 BP	Patrucco et al. 1983

^a: examination of 40 slides; ^b: from this study; ^c: parasite eggs absent; ^d: uncertain diagnosis, Ascarididae (Gonçalves et al. 2003); ^e: PCR positive results; ^f: two samples, one PCR positive and one negative; ^g: also positive to *Enterobius vermicularis* (Iñiguez et al. 2006); ^h: BETA 47494, Brazilian states: MG: Minas Gerais, MT: Mato Grosso, PE: Pernambuco, PI: Piauí. BP: before present; NI: Not included in this study.

ic room, physically distant from the Laboratory of Molecular Genetic of Microorganisms (IOC/Fiocruz) where electrophoresis, cloning, and sequencing were performed. The isolation of eggs was conducted at Laboratory of Paleoparasitology (ENSP/Fiocruz), geographically distant to the genetic laboratories. Positive PCR controls with modern *Ascaris* DNA were never included.

The surface of coprolites was removed, and all the samples were ultra violet irradiated (Iñiguez et al. 2003b). The core of coprolites was ground and rehydrated by immersion in a 0.5% aqueous solution of trisodium phosphate for 72 h, following the technique of Callen and Cameron (1960). The aDNA was extracted by physical-chemical treatment. First 150 µl of coprolite sediment were submitted to physical treatment by boiling/freezing, and then proteinase K digestion and phenol/chloroform method extraction were applied as described (Iñiguez et al. 2006). Alternatively, the commercial QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen) was used after physical treatment. In order to verify the presence of PCR inhibitors, human mitochondrial DNA (mtDNA) fragments (92 bp) were also amplified using conditions described by Pääbo (1990). The molecular target for *Ascaris* PCR was a 142 bp fragment of cytochrome b (*cyt b*) mitochondrial gene (Loreille et al. 2001). Re-amplifications and reconstructive PCR reactions were applied when necessary (Golenberg et al. 1996, Iniguez et al. 2003a). After processing all South American coprolites, a sample from Walraversijde site, Belgium (XVI century), which was positive for *A. lumbricoides* by microscopy analyses, was used as positive control (Fernandes et al. 2005). In order to test the sensitivity of this methodology, 30, 50 and 80 eggs were isolated from Walraversijde sample (Figure) and aDNA extraction by physical/chemical treatment was performed. Cloning and nucleotide sequencing of all PCR products were carried out.

The efficiency of the two extractions method employed was quite similar. However, physical treatment seems to be essential to *Ascaris* aDNA extraction. We were successful in retrieving human DNA from all samples, confirming the lack of PCR inhibitors and corroborating their human origin. Four of six samples, which were microscopically negative for of *A. lumbricoides* eggs, were PCR positive for *Ascaris cyt b* segment. The *cyt b* fragment was detected in aDNA extracted directly from coprolite sediment as well as from 30 *Ascaris* isolated eggs. The aDNA sequence analysis of 11 clones samples revealed that all, including from European coprolite sequences, displayed nucleotide T at position 5522, which is characteristic of the *A. lumbricoides* (Loreille et al. 2001), whereas a cytosine (C) is displayed in *A. suum* (Okimoto et al. 1992, access number X54253). New nucleotide substitutions T5492C, C5554G or C5554A, and T5555C were found in aDNA sequences. The sequence translation using the mitochondrial genetic code revealed one synonymous difference (T20) and two nonsynonymous differences at position 41. Clones from *cyt b* protein fragment from Walraversijde-Belgium, Gruta do Gentio II-Brazil, Toca do Meio-Brazil contain the T41S substitution and a clone from Walraversijde-Belgium the T41N substitution (access number EF439709-24).



Ascaris eggs (400X) found in latrine from Walraversijde archaeological site, Belgium, dated of XVI century.

In this study, we demonstrated the ability of a methodology to detect *Ascaris* aDNA without the evidence of parasite eggs and directly from coprolites. The methodology applied was sensitive enough to diagnose the parasite in a sample with only 30 parasite eggs. In spite of few samples analyzed, our results indirectly contributed to design a new panorama of *Ascaris* paleodistribution, showing that in fact, this parasite has been present in South America since 8,800 years BP in pre-historic populations from Brazil and Chile. Furthermore, our results suggest that the parasitic association *T. trichiura* with *Ascaris*, observed in European historical period and in modern times, also seems to be occurred in South America during pre-Columbian times, possibly with a minor *Ascaris* prevalence. We are currently working to confirm *Ascaris* paleodistribution, including new South America samples and molecular targets. In addition, we are investigating possible factors influencing *Ascaris* prevalence in pre-Columbian South America, such as pollen of anti-helminths plants and spores of nematophagous fungi.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Koko Otsuki from Laboratory of Molecular Genetic of Microorganisms IOC-Fiocruz, Rio de Janeiro, for their excellent technical assistance and PDTIS/Fiocruz genomic platform for nucleotide sequencing. To Dr. Françoise Bouchet from Université de Reims, France, for providing the European coprolites. To the anonymous reviewers for their suggestions.

REFERENCES

- Anderson TJC 2001. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology: *Ascaris* as a case study. *Trends Parasitol* 17: 183-188.
- Bouchet F, Harter S, Le Bailly M 2003. The state of the art of paleoparasitological research in the old world. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 95-101.
- Callen O, Cameron TWM 1960. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Sci* 8: 35-40.
- Confalonieri U 1988. Paleoepidemiologia de *Trichuris trichiura* na América. In LF Ferreira, A Araújo, U Confalonieri (eds), *Paleoparasitologia no Brasil*, Editora PEC/ENSP, Rio de Janeiro, p.120-137.
- Confalonieri U, Filho BR, Ferreira LF, Araújo A 1985. The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. *Paleopathol Newsl* 51: 9-11.
- Drancourt M, Raoult D 2005. Paleomicrobiology: current issues and perspectives. *Nature* 3: 23-35.
- Fernandes A, Ferreira LF, Gonçalves MLC, Bouchet F, Klein CH, Iguchi T, Sianto L, Araújo A 2005. Intestinal parasite analysis in organic sediments collected from a 16th-century Belgian archaeological site. *Cad Saude Publica* 21: 329-332.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U 1980. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 798-800.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U 1982. Untitled note. *Paleopathol Newsl* 38: 5.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U 1983. The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 65-67.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Lima JMD 1989. *Trichuris* eggs in human coprolites from archeological site of Furna do Estrago, Brejo da Madre de Deus, Pernambuco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 581.
- Golenberg EM, Bickel A, Weihs P, 1996. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res* 24: 5026-5033.
- Gonçalves MLC, Araújo A, Ferreira LF 2003. Human intestinal parasites in the past: New findings and a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 103-118.
- Iñiguez AM, Araújo A, Ferreira LF, Vicente AC 2003a. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 63-65.
- Iñiguez AM, Reinhard KJ, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP 2003b. *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from North and South American human coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 67-69.
- Iñiguez AM, Reinhard K, Gonçalves MLC, Ferreira LF, Araújo A, Vicente ACP 2006. SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int J Parasitol* 36: 1419-1425.
- Loreille O, Bouchet F 2003. Evolution of ascariasis in humans and pigs: a multi-disciplinary approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 39-46.
- Loreille O, Roumat E, Verneau O, Bouchet F, Hänni C 2001. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *Int J Parasitol* 31: 1101-1106.
- Lukes J, Horak A, Scholz T 2005. Helminth genome projects: all or nothing. *Trends Parasitol* 21: 265-266.
- Okimoto R, Macfarlane JL, Clary DO, Wolstenholme DR 1992. The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* 130: 471-498.
- Pääbo S 1990. Amplifying ancient DNA. In MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky, TJ White (eds), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, Academic Press, California, p.159-166.
- Patrucco R, Tello R, Bonavia D 1983. Parasitological studies of coprolites of pre-hispanic peruvian populations. *Curr Anthropol* 24: 393-394.
- Peng W, Yuan K, Hu M, Zhou X, Gasser RB 2005. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine *Ascaris* in endemic regions of China. *Electrophoresis* 26: 4317-4326.
- Rocha GC, Harter-Lailheugue S, Le Bailly M, Araújo A, Ferreira LF, Serra-Freire NM, Bouchet F. 2006. Paleoparasitological remains revealed by seven historic contexts from "Place d'Armes", Namur, Belgium. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. 11): 43-52.
- Zhu X, Chilton NB, Jacobs E, Boes J, Gasser RB 1999. Characterization of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int J Parasitol* 29: 469-478.

ANEXO V



A parasitological paradox: Why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas?

Daniela Leles^a, Karl J. Reinhard^{b,*}, Martín Fugassa^c, L.F. Ferreira^d, Alena M. Iñiguez^a, Adauto Araújo^d

^a Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, Departamento de Genética, Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Av. Brazil 4365, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 21045-900

^b University of Nebraska, School of Natural Resources, 719 Hardin Hall, Lincoln, NE 68583-0987, United States

^c Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina

^d Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões, 1480. Manguinhos Rio de Janeiro, Brazil, 21041-210

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2009

Received in revised form

29 December 2009

Accepted 5 January 2010

Keywords:

Pathoecology

Paleoparasitology

Archaeoparasitology

Ascariasis

Trichiuriasis

Coprolites

Parasitism

Taphonomy

ABSTRACT

Ascaris lumbricoides (giant roundworm) and *Trichuris trichiura* (whipworm) are the most common intestinal parasites found in humans worldwide today and they almost always co-occur. However, we find two distinct patterns in archaeological material. In historical North American and Old World contexts, the association of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* is similar to the modern epidemiological picture. In contrast, the co-occurrence of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* eggs in prehistoric South America is rare. For prehistoric contexts, *T. trichiura* is the most common parasite found in archaeological material. Recently molecular biology techniques pointed to a subdiagnosis of roundworm infection in pre-Columbian South American populations. This is contrary to the modern epidemiological picture in which *A. lumbricoides* infection is predominant. This is a paradox, especially when one considers the number of eggs laid by female daily, 200,000 and 20,000 thousand per day, for *A. lumbricoides* and *T. trichiura* respectively. By reviewing the records of these parasites, this paradox is presented and explanations for the paradox are explored. Taphonomy, prehistoric behavior patterns and medicinal plant use seem to be most relevant to the explanation of the paradox. Nematophagous fungi is a less likely factor creating the near absence of *A. lumbricoides* eggs in the prehistoric New World.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Among human intestinal parasites, *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758) is the most prevalent and has worldwide distribution (Crompton, 1999). *A. lumbricoides* has several common names including giant roundworm and maw-worm. It is most commonly associated with *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771) which is known as whipworm (Chan et al., 1994; Saldiva et al., 1999). This association of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* is due to similar transmission mechanisms and metabolism of the parasites, occupation of nearly the same niche outside human host, and high number of eggs laid per day. As reviewed by Gonçalves et al. (2003) and Bouchet et al. (2003) both *A. lumbricoides* and *T. trichiura* are also the parasites most commonly found in archaeological material. However, for prehistoric America, this association is quite rare in contrast to historic archaeology in North America (Reinhard, 1990).

Paleoparasitology is the study of parasites found in archaeological or paleontological material (Ferreira et al., 1979). In a broad sense, paleoparasitologists study the evolution of parasite–host–environment relationships, as well as the origin and evolution of

infectious diseases in a paleoepidemiological perspective (Araújo et al., 2003). Archaeoparasitology (Reinhard, 1990) and pathoecology (Martinson et al., 2003; Reinhard, 2008; Reinhard and Bryant, 2008) address behavior and cultural influences of prehistoric people on parasite ecology. The theories of paleoparasitology and archaeoparasitology are relevant to the *Trichuris–Ascaris* paradox in prehistory.

The low occurrence of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* eggs in prehistoric American sites has long been noticed. Fouant et al. (1982), working with mummies from the Andes, noted the rarity of eggs of these species. She discussed the possibility that dry climate might be responsible for the low number of eggs found in Peruvian archaeological sites. In South America desiccation is the main mode of preservation. Dry conditions prevailed in the majority of South American archaeological sites.

We performed a systematic bibliographic research for the finds of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* in ancient material. Taphonomic, ecological, environmental, and diagnostic aspects of the papers are summarized and discussed below. Differences observed between ancient and present day distribution may be explained by these aspects.

* Corresponding author. Tel.: +1 402 875 2863.

E-mail address: kreinhard1@mac.com (K.J. Reinhard).

1. Materials and methods

Two reviews were used to conduct this research (Bouchet et al., 2003; Gonçalves et al., 2003). Electronic databases searched up to January 2009 were also used (PubMed, ISI Web of Science, Scopus, Ovid, Web Wilson, and Scielo). Manual search in index data base (Zoological Records, Tropical Diseases Bulletin, Biological Records), and consultations with specialists were also used. All references that fulfill inclusion criteria were evaluated. For electronic search the following words were used: “Ascaris”, “Trichuris”, “coprolite”, “sediment”, “soil”, “latrine”, “cesspit”, “pit”, “barrel”, “privy”, “remains”, “archaeology”, “archaeoparasitology”, “paleoparasitology”, “paleopathology”, “excavation”, “years ago”, “before present”, “history”, “colonial”, “pre-Columbian”, “medieval”, “middle age”, “Iron age”, “Bronze age”, “Roman age”, “Roman period”, “ancient disease”, “ancient parasites”, “burial”, “skeleton”, and “mummy”. Logical operators “AND” and “OR” were used to combine descriptors and track publications, as well as symbols “\$” and “*” to cut off keywords in order to search all derivations.

Initially, 88 articles were included by the criteria used, but another screening was applied: (a) the finding of *A. lumbricoides* and/or *Trichuris* in ancient material of human origin; (b) the findings dated archaeologically to the 19th century or before, (c) no historical document was taken into account, (d) all types of publications were included, such as scientific meeting abstracts, letters and comments in scientific journals, (e) there were no limits for the year of publication and languages.

The following data were observed and recorded from each article:

- 1) Geographical location of the finding, 2) archaeological date, 3) type of research material such as coprolite, sediment, or other kinds of remains, 4) quantification of eggs, 5) use of medicinal plants, 6) presence of fungi, 7) infertile eggs, 8) taphonomic descriptions, 9) environment and any other aspect concerning organic remains preservation.

Sites that were negative for both of the study species were not included in the study.

2. Results

Of 88 articles initially selected, 65 article abstracts were read, and after evaluation, 44 articles were fully studied. Next, all reviews and articles accessed by manual search were added, totaling 98 articles concerning this research.

The findings of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* eggs in ancient material of human origin are summarized in Table 1. All information about geographical locality, kind of material, dates, number of eggs, presence or absence of medicinal plants, fungi, and infertile eggs are listed together.

An association of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* occurs in nearly 59% of the archaeological findings all over the world. In Europe, it reaches more than 78%, and nearly 90% during the Middle Ages.

We found a paradox in that for the prehistoric South America, *T. trichiura* is more common than *A. lumbricoides* and often is unassociated with *A. lumbricoides*. The findings of *T. trichiura* were more frequent, and even more impressive, when they were considered alone. *T. trichiura* eggs were found without *A. lumbricoides* eggs two times as often as *A. lumbricoides* without *T. trichiura*. The systematic search clearly defined the *Ascaris*–*Trichuris* paradox as a prehistoric American phenomenon. This phenomenon is also observed in the oldest European archaeological sites, but changed after Neolithic period (Bouchet et al., 2003; Gonçalves et al., 2003). However, the paradox emerged clearly in South America where results are almost completely limited to *T. trichiura* alone. There are 16 references for *T. trichiura* and only five for

A. lumbricoides, and two of these occurred in Spanish skeletons dated to colonial times.

As for North America, there are two more finds of *A. lumbricoides* without *T. trichiura*. Indeed, for North America, there is only one prehistoric association of *A. lumbricoides* with *T. trichiura*. The majority of prehistoric North American sites have neither *A. lumbricoides* nor *T. trichiura* (Reinhard, 1990, 1992). Africa and Oceania are underrepresented regarding paleoparasitological finds, and so any inference is not reliable (Table 1).

The findings of *T. trichiura* eggs alone are also impressive in Europe and Asia. There are 12 references for *T. trichiura* and four for *A. lumbricoides*; this difference is bigger in Asia, where there are five *T. trichiura* egg finds alone, and only one for *A. lumbricoides*.

3. Discussion

As observed in Table 1, the findings of *T. trichiura* eggs are more abundant than *A. lumbricoides* in South American archaeological material. Leles et al. (2008) by molecular diagnosis tested samples from archaeological sites South American, which were positive for *T. trichiura* eggs but negative for *A. lumbricoides* eggs by optical microscopy. These samples that were *A. lumbricoides*-negative by optical microscopy revealed DNA of *A. lumbricoides* through molecular analysis. These results point to a subdiagnosis of *A. lumbricoides* infection. Subdiagnosis means the identification of cryptic infections through alternative methods to microscopy.

This finding is noteworthy and begs the question, why were *A. lumbricoides* eggs not found by microscopy in these samples? Three factors discussed below may be at play in the general lack of *A. lumbricoides* eggs in prehistoric material.

3.1. Differences in disease factors –mediaeval Europe and prehistoric Americas

A. lumbricoides and *T. trichiura* are fecal-borne parasites. As such, there are behavioral factors that contribute to the control or proliferation of infection (Reinhard, 1988, 1990, 1992). Infection proliferates in sedentary, crowded communities with poor sanitation, inadequate hygiene, egg-contaminated food and water sources, with no access to medicines. In contrast, infection is controlled in communities that lack these characteristics as detailed by pathoecologists (Martinson et al., 2003; Reinhard, 2008; Reinhard and Bryant, 2008; Santoro et al., 2003). Seasonal or nomadic communities of small numbers of people have the best protection from infection because they come into contact with fecal-contamination rarely. Sedentary communities that have low populations which disperse over large areas for agriculture and hunting have only a slightly larger risk of infection. Sedentary communities of large populations which reside more-or-less permanently in close quarters around contaminated water have the greatest risk of fecal-borne infection. In crowded cities with poor sanitation, high levels of poverty, and poor sources of uncontaminated food and water, exposure to fecal-borne infections is inevitable.

The latter conditions typified historic cities in Europe and North America (Jones, 1982, 1984; Reinhard, 1990; Fisher et al., 2007). In urban archaeological sites, *A. lumbricoides* and *T. trichiura* can be found in virtually any context including latrines, yards, and streets. However, the hunter-gatherer and horticulture sites of the prehistoric Americas have widely varying living conditions in which fecal-contamination was low relative to historic European and America cities. As detailed by pathoecological study (Reinhard, 1988, 2007, 2008; Reinhard and Bryant, 2008), in the prehistoric communities of the Americas, relatively small alterations in behavior could virtually eliminate infection by fecal-borne parasites. It is from this perspective that we present the following discussions.

Table 1Find of *Ascaris* (A) and/or *Trichuris* (T), locality, country and date.

Site/Locality	Area	Date	Material	Parasite		References
				A	T	
Europe						
Grande Grotte, Arcy-sur-Cure, Yonne	France	30.160 ± 140–24.660 ± 330 BP	Sediment and coprolite	+	–	Bouchet et al. 1996.
Shillouro-kambos	Cyprus	8300–7000 BC	Sediment from burial	+	+ ^d	Harter et al. 2005
Khirokitia, Larnaka	Cyprus	8300–7000 BC	Sediment from burial	+	+	Harter et al. 2005
Gwent levels at Goldcliff, northern side of the Severn estuary	Wales	5740–5620 BC cal	Sediment	–	+ ^a	Dark, 2004.
Clairvaux, Jura	France	3100–2700 BC	Sediments	+	+ ^j	Dommelier-Espejo, 2001.
Swifterbant	Holland	5400 ± 40–5230 ± 40 BP	Coprolites	–	+ ^a	Roever-Bonnet et al. 1979.
Arbon, Thurgau	Swiss	3384–3370 BC	Coprolites and sediments	+	+ ^j	Dommelier-Espejo, 2001.
Ötztal	Austria	5300–5200 BP	Samples from the colon of the mummy	–	+	Aspöck et al. 1996.
Chalain, Jura	France	3200–3150 BC	Coprolites	–	+	Dommelier et al. 1998.
Chalain, Jura	France	3044–2980 BC	Coprolites	–	+	Dommelier et al. 1998.
Chalain, Jura	France	3080–2950 BC	Sediments and coprolites	–	+ ^c	Bouchet et al. 1995.
Chalain, Jura	France	3200–2500 BC	Sediments and coprolites	–	+	Dommelier-Espejo, 2001.
Brean Down, Somerset	England	Bronze Age	Sediment	+	+	Jones et al. 1988.
Hulin, Central Moravia	Czech Republic	1600–1500 BC	Skeleton	+	+	Šebela et al., 1990
Drobintz girl	Prussia	600 BC	Contents of the bowel	+	+	Szidat, 1944.
Hallstatt	Austria	2300 years	Excrements	+	+ ^{j,d}	Aspöck et al. 1973.
Tollund and Grauballe Man, Central Jutland	Denmark	3rd–5th century AD	Material from stomach	–	+	Helbaek, 1958.
Vilshofen	Germany	150–140 BC	Latrine	–	+	Specht, 1963.
Hallein, Salzburg	Austria	2000 years	Excrements	–	+	Aspöck et al. 1973.
Bremerhaven	Germany	100 BC–500 AD	“Terp” refuge mound	+	+	Jansen and Over, 1962.
Valkenburg on Rhine	Holland	42–100 AD	Sediment	+	+ ^d	Jansen and Over, 1966.
Lindow Man	England	Iron Age	Small intestine	+ ^e	+ ^j	Jones, 1986.
Bobigny	France	2nd century AD	Burial	+	+	Rousset et al. 1996.
York	France	2nd–3rd century AD	Sewer System	+ ^a	+	Wilson and Rackham, 1976.
Place d'Armes, Namur	Belgium	II–III century AD	Material of cesspit	+ ^{a,f}	+ ^a	Rocha et al. 2006.
Karwinden Man	Prussia	500 AD	Contents of the bowel	+	+	Szidat, 1944.
Ribe	Denmark	750–800 AD	coprolite	+	+	Nansen and Jørgensen, 1977.
York	England	9th–12th century AD	Soil, latrine, cesspits and coprolites	+	+ ^j	Jones, 1984.
Coppergate, York	England	10th–11th century AD	Material of pits	+	+ ^{j,b}	Hall et al. 1983.
Winchester	England	1000 years	Pit soil	+ ^a	+ ^{j,a}	Pike, 1967, 1968.
St. Isidoro's Collegiate-Basilica, Leon	Spanish	X–XIII century AD	Mummy abdominal cavity	+ ^{j,f}	+	Hidalgo-Argüello et al., 2003.
Place d'Armes, Namur	Belgium	IX–XI (1055 AD)	Pit	+ ^a	+ ^a	Rocha et al. 2006.
Place d'Armes, Namur	Belgium	1055–1100 AD	Latrine	+ ^a	+ ^a	Rocha et al. 2006.
Place d'Armes, Namur	Belgium	XII–XIII centuries	Latrine	+	+	Rocha et al. 2006.
Place d'Armes, Namur	Belgium	XIV–XV centuries	Latrine	+	+	Rocha et al. 2006.
Place d'Armes, Namur	Belgium	XV–XII (1618 AD)	Latrine	+	+	Rocha et al. 2006.
Place d'Armes, Namur	Belgium	1611–1828 AD	Latrine	+ ^a	+ ^a	Rocha et al. 2006.
Winchester	England	11th–12th century	Pit	+ ^a	+ ^{j,a}	Taylor, 1955.
Paris	France	XII–XV	Coprolites, sediments and latrines	+	+	Bouchet et al. 1989.
Rue de Lutèce, Paris	France	XIV–XV	Sediments and coprolites	+	+	Bouchet, 1993.
Southampton	England	13th–14th century AD	Contentes of cesspit soil	+ ^a	+ ^{j,a}	Pike, 1975.
Stroostee, Utrecht	Holland	13th–14th AD	Material from cesspits	+	+	Boersema and Jansen, 1975.
Southwark	Europe	Middle ages	Soil	+	+	Rouffignac, 1987.
Bermondsey, Abbey, Southwark	Europe	Middle ages	Soil	+ ^{a,c}	–	Beard, 1986.
Beauvais	France	XIII–XVII	Sediments, pits and garbage dumps	+	+	Bouchet, 1991.
The Cour Napoleon, Paris	France	XI–XVI	Sediments of pit	+ ^{a,c}	–	Bouchet, 1995.
The Cour Napoleon, Paris	France	XI–XVI	Sample under skeleton of piglets	–	+ ^a	Bouchet, 1995.
The Carrousel, Paris	France	XI–XVI	Excrements	+	+	Bouchet, 1995.
Worcester	England	15th century	Barrel-latrine	+ ^{a,b}	+ ^{a,b,d,j}	Greig, 1981; Moore, 1981.
Union Terrace, York	England	14th–16th century AD	Sediments from Stone-built latrine	–	+	Jones et al. 1988.
Union Terrace, York	England	14th–16th century AD	Sediments from Stone-built latrine	+	–	Jones et al. 1988.
Oslo	Norway	15th century AD	Cess-pit	+	+	Jones, 1982.
Schleswig	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+ ^j	Herrmann, 1985.
Berlin	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+ ^{j,d}	Herrmann, 1985.
Breisach	Germany	Middle ages	Latrine soil	+ ^j	+	Herrmann, 1985.
Lübeck	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+ ^j	Herrmann, 1985; Herrmann and Schulz, 1986.

Table 1 (continued)

Site/Locality	Area	Date	Material	Parasite		References
				A	T	
Braunschweig	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985.
Halmeln	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985.
Höxter	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985.
Landshut	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985.
Freiburg	Germany	15th century Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985; Reinhard et al. 1988.
Göttingen	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985.
Marburg	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985.
Regensburg	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985.
Oldenburg	Germany	Middle ages	Latrine soil	+	+	Herrmann, 1985.
Vincennes	France	800 AD	Sediments	+	+	Bouchet et al. 2003.
Londres	England	XV–XVI	Sediments and latrines	+	+	Greig, 1982.
Strasbourg	France	XV–XVI	Latrines	+	+	Legendre et al. 1986.
Montbeliard, Doubs	France	XV	Material from cesspit deposits	+	+	Bouchet and Paicheler, 1995.
Montbeliard, Doubs	France	15th–16th century AD	Sediments	+	+	Gonçalves et al. 2003.
Raversijde	Belgium	16th century AD	Sediments from latrine	+	+	Fernandes et al. 2005.
Paris	France	XVII–XVIII	Sediments	+	+	Bouchet et al. 1991.
Marly-le-Roy, Yveline	France	17th–18th century AD	Latrine	+	+	Bouchet et al. 1998.
Namur	Belgium	18th century AD	Sediments	+	+	Gonçalves et al. 2003.
Subtotal of findings				62	70	
Subtotal of isolate findings				4	12	
Subtotal of <i>Ascaris</i> and <i>Trichuris</i> association				58		
<i>Africa</i>						
Kruger Cave, Rustenburg	South Africa	10000–7000 BP	Coprolite	+	+	Evans et al. 1996.
Nile valley	Nubia	2400 BC–1500 AD	Visceral in canopic jars	–	+	Bouchet et al. 2003; Harter and Bouchet, 2006.
PUMII mummy	Egypt	200 BC	Intestinal tissues of a mummy	+	–	Cockburn et al. 1975.
Akhtep's mastaba of Saqqara	Egypt	715–656 BC	Embalming waste jar	+	–	Harter et al. 2003.
K2, Greefswald	South Africa	1000–1300 AD	Coprolite	–	+	Dittmar and Steyn, 2004.
Subtotal of findings				3	3	
Subtotal de of isolate findings				2	2	
Subtotal of <i>Ascaris</i> and <i>Trichuris</i> association				1		
<i>Asia</i>						
Jerusalem	Israel	7th–6th century BC	Remains of bathroom	–	+	Unpublished observations.
Jiangling County, Hubei Province	China	2300 years ago; Chu Dynasty, the Warring Stage (475–221 BC)	Ancient corpse from tomb, Chu Dynasty mummy	–	+	Yang et al. 1984; Su, 1987.
Hubei Province	China	167 BC	Han Dynasty mummy	–	+	Liangbiao and Tao, 1981; Cheng, 1984.
Ma-Wang-Dui, Changsha city, Hunan Province	China	2100 years ago (206 BC–220 AD during Han Dynasty)	Rectum and liver of mummy	–	+	Wei, 1973.
Nahal-Mishmar Valley	Israel	160 AD	No available	–	+	Witenberg, 1961
Acre	Israel	1300 AD	Latrine	+	–	Mitchell and Stern, 2000.
Schinchang-dong, Kwangju city	Korea	100 BC	Soil (plant layer major) probly in the house where human bones were found	+	+	KNM, 1997.
Chilgok-gun, Taegu, Gyeongsangbuk Province	Korea	668–935 AD (Unified Shilla Dynasty)	Pit soil in some place where toilet may be exist	+	+	Han et al. 2003.
Fujiwara Palace Site	Japan	710 AD	Sediment of the pit	+	+	Matsui et al. 2003.
Yangju	Korea	1411 ± 42 AD (Chosun Dynasty)	Rectal tissue of the mummy	+	+	Seo et al. 2007.
Joseon Dynasty	Korea	Late 17th Century	Mummy	+	+	Shin et al. 2008.
Subtotal of findings				6	10	
Subtotal of isolate findings				1	5	
Subtotal of <i>Ascaris</i> and <i>Trichuris</i> association				5		
<i>Oceania</i>						
Wellington	New Zealand	150–200 years ago	Coprolite	+	–	Andrews, 1976.
Subtotal				1	0	
Subtotal of isolate findings				1	0	
Subtotal of <i>Ascaris</i> and <i>Trichuris</i> association				0		

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Site/Locality	Area	Date	Material	Parasite		References
				A	T	
North America						
British Columbia	Canada	3700–3490 cal BC	Midden sediments	+	–	Bathurst, 2005. Fry, 1974.
Upper Salts Cave, Kentucky	USA	570–290 BC	Coprolite	+	–	
Big Bone Cave, Tennessee	USA	2177–145 BP	Coprolite	+	–	Faulkner et al. 1989.
Antelope House, Arizona	USA	900–1250 AD	Coprolite and Latrine	+	–	Gonçalves et al. 2003.
Elden Pueblo, Arizona	USA	1070–1250 AD	Latrine soil	+ ^g	+ ^{g,j}	Hevly et al. 1979; Reinhard et al. 1987.
Adak Island, Alaska	USA	840 ± 40 BP	Samples from abdominal cavity	+	–	Bouchet et al. 2001.
Albany, New York	USA	1600–1700 AD		+ ^{f,j}	+	Fisher et al. 2007.
Newfoundland	Canada	17th century AD	Privy contents	+ ^a	+ ^a	Horne and Tuck, 1996.
Colonial Williamsburg, Virginia	USA	1720 AD	Fecal layer latrine	+	+ ^j	Reinhard, 1990.
New Brunswick, New Jersey	USA	1790–1899 AD	Sediments from latrines	+ ^{f,j}	+	Unpublished observations
Queen Ann Square, Newport, Rhode Island	USA	18th century AD	Privy soils	+	+ ^j	Reinhard et al. 1986.
Lutheran Church, Pearl Street, Albany, New York	USA	1790s	Sediments from privy or trash pit	+	+ ^j	Reinhard, 2004.
Wilmington, Delaware	USA	19th century AD	Privy contexts	–	+	Fries et al. 1990.
Greenwich Village, New York City, New York	USA	19th century AD	Latrine soil	–	+	Reinhard, 1990.
Fayette, Michigan	USA	19th century AD	Sediments from privies	–	+	Faulkner et al. 2000.
Manhattan, Kansas	USA	1860–1900	Sediments of skeletons	+ ^j	+	Le Bailly et al. 2006.
Wong Nim’s Property, San Bernardino, California	USA ^h	1880–1930 AD	Sediments from latrine	+	+	Reinhard et al. 2008
Philadelphia	USA	Historic period	Sediments	+	+ ^{d,j}	Unpublished observations
Subtotal				15	13	
Subtotal of isolate findings				5	3	
Subtotal of <i>Ascaris</i> and <i>Trichuris</i> association				10		
South America						
Lapa Pequena, Minas Gerais	Brazil	8000–7000 BP	Coprolite	–	+	Gonçalves et al. 2003.
Huarmey Valley	Peru	4277 ± 181 BP	Coprolite	+ ^e	–	Patrucco et al. 1983.
Boqueirão Soberbo, Minas Gerais	Brazil	4905 ± 85–1325 ± 60 BP	Coprolite	–	+	Ferreira et al. 1982.
Santa Elina, Mato Grosso	Brazil	4000–2000 BP	Coprolite	–	+	Gonçalves et al. 2003.
Orejas de Burro 1	Argentina	3720–3978 BP cal	Sediment from abdominal cavity of skeleton	–	+	Fugassa and Barberena, 2006.
Gentio II Cave, Minas Gerais	Brazil	3490 ± 120–430 ± 70 BP	Coprolite and mummy intestinal contents	+	+	Ferreira et al. 1980, 1983; Gonçalves et al. 2003.
Tulán, San Pedro de Atacama	Chile	1080–950 BC	Coprolite	–	+	Gonçalves et al. 2003.
Estrago Cave, Pernambuco	Brazil	2000 BP	Coprolite	–	+	Ferreira et al. 1989.
Huarmey Valley	Peru	1000 AD	Coprolite	–	+	Patrucco et al. 1983.
San Gerónimo	Peru	1020–1156 AD	Coprolite	–	+	Martinson et al. 2003.
Lluta Valley	Chile	Inca Late and Intermediate Period	Coprolite	–	+	Santoro et al. 2003.
Vale Alto de Ica	Peru	725 AD (Late Nasca)	Coprolite	+	–	Gárate et al. 2005.
Cerro El Plomo, Santiago	Chile	450 years	Feces from rectum	–	+	Pizzi and Schenone, 1954.
El Potrero de Santa Lucía, Andalgá, Catamarca	Argentina	470 ± 200 BC 650 ± 80 AD 310 ± 90 AD	Sediments	–	+	Pau et al. 2005.
Nombre de Jesús	Argentina ⁱ	XVI	Sediments	+ ^g	+ ^{g,j}	Fugassa and Guichón 2006; Fugassa et al. 2006.
Nombre de Jesús	Argentina ⁱ	XVI	Sediments	+	–	Fugassa et al. 2007.
Mummy pre-Columbian, Murga culture	Peru	Colonial period	Colon contents of a mummy	–	+	Fouant et al. 1982.
Itacambira, Minas Gerais	Brazil	18th century AD	Colon contents of a mummy	–	+	Araújo et al. 1984.
Pedra Furada	Brazil	Not available	Coprolites	–	+	Gonçalves et al. 2003.

Table 1 (continued)

Site/Locality	Area	Date	Material	Parasite		References
				A	T	
Subtotal				5	16	
Subtotal of isolate findings				3	14	
Subtotal of <i>Ascaris</i> and <i>Trichuris</i> association				2		
Total				92	112	
Total of isolate findings				16	36	
Total of <i>Ascaris</i> and <i>Trichuris</i> association				76		

BP Before Present, BC Before Christ, AD Anno Domini.

^a Uncertain human origin.

^b Presence of vermifuges plants or plant parasitic nematode.

^c Uncertain diagnosis.

^d Samples positive for *Trichuris* and negative for *Ascaris*.

^e Unfertilized eggs.

^f Samples positive for *Ascaris* and negative for *Trichuris*.

^g Presence of fungi.

^h Origin of the infection is probably from Asia.

ⁱ Infection is probably from Europe.

^j Eggs most abundant of the two species.

3.2. Medicinal plant use and reduced infection level

In communities that are not constantly challenged by fecal-borne parasites, even the occasional use of anthelmintics reduces or eliminates infection. There is no doubt that prehistoric peoples in the Americas had an extensive pharmacopeia based on native medicinal plants (Chaves and Reinhard, 2006; Moerman, 2009; Reinhard et al., 1985). Palynological analyses reveals that three plant genera were used to treat parasite infection or symptoms of parasite infection in northeastern Brazil some 7000 years ago (Chaves and Reinhard, 2006). Seed analysis of coprolites dating to nearly 9000 years ago from the Colorado Plateau suggest that anthelmintic plants were a part of ancient diet (Reinhard et al., 1985). An Aztec codex illustrates the use of anthelmintic species up to the Spanish Entrada (de Montellano, 1975). These examples illustrate the long-standing and widespread availability of medicines throughout prehistory.

Anthelmintics, whether natural or synthetic, are more effective for *A. lumbricoides* than *T. trichiura* (Muchiri et al., 2001; Reinhard, 2004; Saathoff et al., 2004; Zani et al., 2004). Keiser and Utzinger (2008) performed a systematic review and a meta-analysis to evaluate four medicines used for intestinal helminths. Single doses are effective for *A. lumbricoides*, but unable to eliminate *T. trichiura*. This has been borne out in the archaeoparasitology of North American historic sites and especially Albany, New York (Fisher et al., 2007). The latrines of higher class individuals with access to vermifuges show a reduction of *A. lumbricoides* eggs relative to poor households. However, the numbers of *T. trichiura* eggs is comparable for all economic classes.

The differential effects of vermifuges on these worms has been documented in recent indigenous villages. Communities in the Amazon such as Santa Isabel do Rio Negro, are descendents of indigenous societies that were demographically concentrated, assimilated and acculturated in historic times. The Santa Isabel do Rio Negro community is monitored for prevalence of helminths and frequently treated with drugs as medicated mebendazole and/or self-medicated with natural plants. It has been observed over the years that the prevalence of *A. lumbricoides* decreased and *T. trichiura* increased (Bóia et al., 2006; Carvalho-Costa et al., 2007). These observations agree with the review done by Keiser and Utzinger (2008). In other words, the effect of anthelmintics on modern villages models prehistoric parasite control.

Whipworms are adapted to the large intestine. They attach to the intestine by burrowing their anterior extremity into host

mucosa. *A. lumbricoides*, however, lives freely in the gut lumen. *A. lumbricoides* worms maintain their place in the lumen by muscular exertions against the flow of the intestinal contents under peristalsis. Thus, roundworms are not attached to the lumen and are more susceptible to the effects of anthelmintic compounds.

When we compare the possibility of *T. trichiura* and *A. lumbricoides* being eliminated from the host, roundworms will be less resistant to all treatments, be it mechanical such as high fiber content or drugs such as medicinal plants ingested by the host. In coprolites from North America, great amounts of insoluble fiber are commonly found. This high fiber could contribute to the elimination of *A. lumbricoides* adult worms.

Chenopodium is a genus with some species that have vermifugic action. Vermifugic chenopods were mentioned in five articles, and point to a possible explanation to negative results of *A. lumbricoides* eggs (Dommelier et al., 1998; Greig, 1981; Hall et al., 1983; Reinhard et al., 1987; Reinhard, 1990). *Chenopodium* sp. and *Bauhinia* sp., another plant with anthelmintic properties were found in some South American coprolites (Chaves and Renault-Miskovsky, 1996; Chaves and Reinhard, 2006).

The abundant ethnographic and archaeological evidence of prehistoric anthelmintics in the New World, and the differential

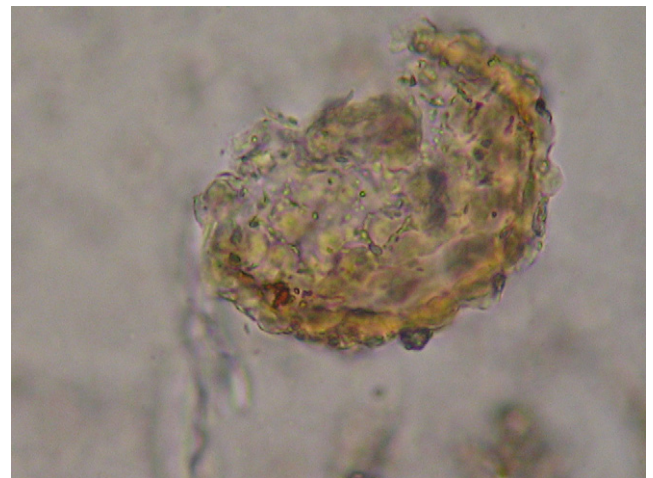


Fig. 1. A poorly preserved *A. lumbricoides* egg represented only by a partial mammillated outer shell.

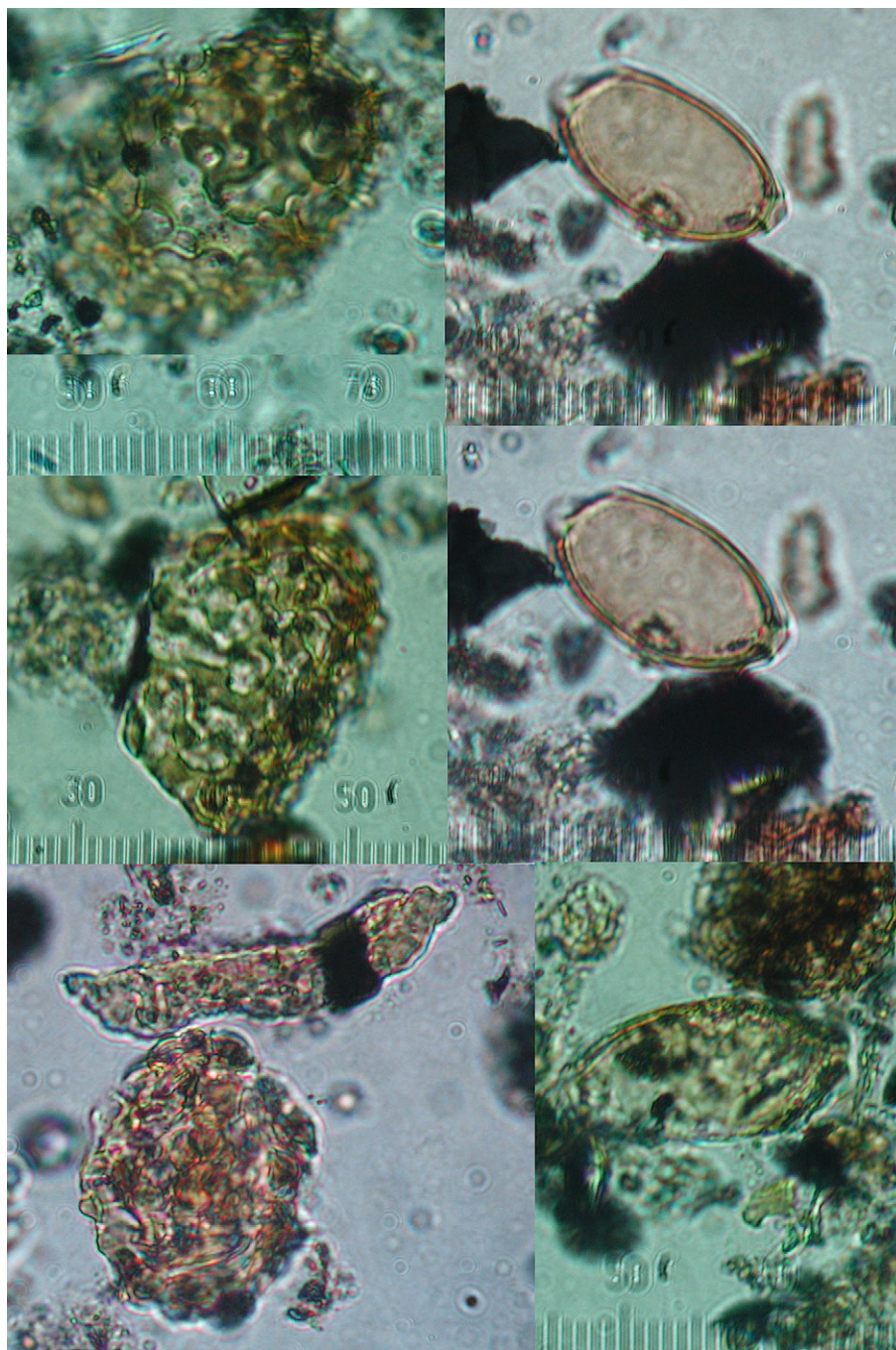


Fig. 2. The series of images on the left shows moderate to poor preservation of *A. lumbricoides* eggs. The upper images shows partial erosion of the mammillated coat. The center image shows a deformed egg and the lower image shows a shrunken egg. The right series shows moderate preservation of *T. trichiura* eggs. The upper images focus on two plane of the same egg and show details of one operculum that is still in place. The other side of the egg is fractured. The lower image shows an egg partially encrusted with sediment and a partially fractured wall.

resistance of *T. trichiura* and *A. lumbricoides* to the effects of anthelmintics, is very important to the enigmatic absence of *A. lumbricoides*. As reviewed by Reinhard et al. (1985), the Aztecs, among others, had effective anthelmintic and prophylactic remedies derived from native plants. The absence of eggs may well be due to the difficulty of reaching patency in human populations that habitually used anthelmintics. In addition, it appears from the work of Andrew Jones that infection with *A. lumbricoides* and *T. trichiura* was an unavoidable aspect of European urban life from Medieval times onward. This was not the case in the New World where poor sanitation was not as significant a problem. Therefore,

basic anthelmintics were sufficient to keep *A. lumbricoides* at minimal infection levels.

3.3. Environment and taphonomy

It might be possible that differential preservation of the eggs of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* results in the post-depositional decay of one type of egg over the other. Thus, taphonomy must be discussed as a potential contributor to the paradox.

The eggs of *A. lumbricoides* have two durable layers, each resistant to different conditions. The inner layer is a chitin shell. The

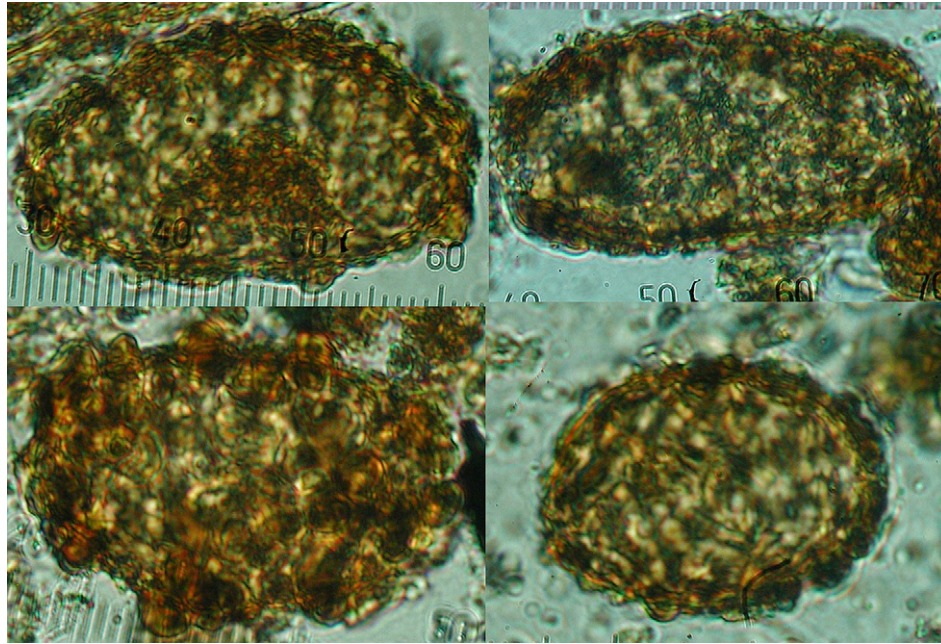


Fig. 3. These *A. lumbricoides* eggs from a historic site in Albany, New York show one fertilized egg (lower right) and three unfertilized eggs. Relative to the smaller, oval fertilized egg, unfertilized eggs are larger, more block-shaped, with a coarser mammillated coat.

outer layer is a thick, mammillated, albuminoid protein coat. When the chitin shell is destroyed, the out albumin coat can still be recognized. More commonly, the albumin coat deteriorates and the chitin egg persists. These are called decorticated eggs and are also easily recognizable.

T. trichiura eggs are among the most recognizable in parasitology. The lemon or barrel shaped eggs taper at the poles to operculated apertures with inwardly beveled edges. The distinctive shape of these eggs makes them recognizable even when badly corroded from archaeological contexts.

Because of the layered structure of *A. lumbricoides* eggs, one might think that they are more durable than *T. trichiura* eggs. This is not always the case. Kobayashi et al. (1984) experimentally contaminated soil with *A. suum* eggs submitted to different temperature conditions. They recovered the eggs and evaluated degeneration and embryonation after different times. It was observed that on surface almost 100% of the eggs degenerated and consequently did not embryonate. Larsen and Roepstorff (1999) contaminated short grass study plots, 2 cm below the surface of well-cultivated bare soil with *A. suum* and *T. suis* eggs, and evaluated the recovery of eggs submitted to different temperature conditions. Results showed that the disappearance of *A. suum* eggs was significantly greater than that of *T. suis*. This difference is greater yet during sunny months. This points to different eggshell vulnerabilities in the two genera. Therefore, this probably occurred in the past with open environments. If so, the increased destruction of *A. lumbricoides* would have resulted in fewer infections. Also, in some contexts, the exclusive recovery of *T. trichiura* eggs may reflect environmental factors resulting in differential preservation.

Well-preserved eggs of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* have been reported in archaeological sites in the majority of published articles. Szidat (1944) and Taylor (1955) described the extraordinary preservation of *T. trichiura* eggs. However, Andrews (1976) and Jones (1986) report finding identifiable fragments of *A. lumbricoides* broken eggshell. Bathurst (2005) also reports many broken *A. lumbricoides* eggs, and Fugassa et al. (2006) found fragments of *A. lumbricoides* eggs in Patagonian sediments. Pike (1967) and Seo

et al. (2007) observed eggs decorticated and uncoated. In different materials examined in our laboratories we also observed broken *A. lumbricoides* eggs (Fig. 1). This suggests that preservation potential varies between archaeological contexts (Fig. 2).

3.4. Nematophagous fungi

Biological control has been promoted as a way to reduce intestinal helminth prevalences, especially animal parasites that show increased resistance to anthelmintics (Larsen, 1999). Nematophagous fungi are natural predators of nematodes. Currently, 150 species are known, divided in three groups: nematode predators, endoparasites, and egg opportunistic parasites (Gray, 1987). Many genera, such as *Arthrobotrys*, *Duddingtonia*, *Pochonia* and *Monascoporium* are efficient in controlling animal intestinal parasitosis (Wang et al., 2008; Araujo et al., 2009a,b; Braga et al., 2009a,b; Carvalho et al., 2009; Kelly et al., 2009; Maciel et al., 2009a,b). These fungal taxa are distributed throughout the world and in every kind of climate (Gray, 1987). Braga et al. (2007) proved that *Verticillium chlamydosporium* kills eggs of *A. lumbricoides*. Araújo et al. (2008) showed that *Pochonia chlamydosporia* attacked *A. suum* eggs. Some nematophagous fungi have been found in regions near archaeological sites in Minas Gerais state, central Brazil (Ribeiro et al., 1999, 2003).

However, few paleoparasitological analyses mentioned the presence of nematophagous fungi. Fugassa et al. (2006) mention the presence of fungal spores and hyphae in the sediment recovered from the pelvic girdle of a skeleton dated of the 16th century. Reinhard et al. (1988) describe fungal attack on both ascarid and trichurid eggs in latrine sediments.

However, preferential fungal attack may explain the low number of eggs found in some archaeological sites, but it would not explain the absence of one parasite when the other one is present, i.e., it would not explain the absence of *A. lumbricoides* eggs and the presence of *T. trichiura*, unless different biological aspects regarding *A. lumbricoides* and *T. trichiura* shell egg resistance are involved to allow destruction of one parasite eggs instead of the other. These

preliminary observations indicated that examination of fungal attack on parasite eggs would be a fruitful and important line of research that should be developed.

4. Conclusions

Prehistoric inhabitants of the Americans had behavioral factors that limited exposure to fecal-borne parasites. Contributing to the rarity of *A. lumbricoides* infection, use of medicinal plants differentially expelled ascarids more than whipworms. Taphonomic factors differentially destroyed the infective eggs of ascarids more than whipworms. Finally fungal attack may have destroyed the infective stages of ascarids and their evidence in archaeological contexts. Thus, the reduction of ascarids in prehistoric sites reflects several aspects of prehistoric ecology that limited infection.

The main conclusion of this review is that paleoparasitological analysis should involve multidisciplinary teams, with experts in medicinal plants, nematophagous fungi, and taphonomy. Statistical analysis must be performed whenever possible, be it to verify the morphology of eggs (Araújo, 1988; Confalonieri et al., 1988), or to evaluate differences in eggshell resistance/fragility when submitted to different environmental conditions. It is also important to quantify the number of eggs per volume and/or weight of sample. It is essential to specify whether *A. lumbricoides* eggs are fertilized or unfertilized (Fig. 3). Unfertilized eggs signify precarious conditions for transmission and patent infection, or even cross infection between human and pig species (Peng et al., 2003).

However, *T. trichiura* eggs were observed in greater numbers even in environments where high temperatures did not prevail in the past. Therefore, unless *A. lumbricoides* decomposed 10 times more than *T. trichiura* (considering the recorded egg production for these species), a change in egg production over time cannot be discarded. Epidemiology and ecology studies showed that host-parasite relationships did not necessarily evolve to harmony over time. Sometimes virulence and pathogenicity increase, as expressed by high reproductive rates in micro and macroparasites (Galvani, 2003).

Most of the reported associations of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* have been dated by radiocarbon method and geographically placed. Based on these data, it would be interesting to establish some relationships with climate and environmental conditions. Taphonomic processes might have been an important factor affecting paleodistribution of *A. lumbricoides* and *T. trichiura* reported up to now.

Parasites, together with their hosts, change behavior patterns over time. One example was recently studied among the Surui, an Amazonian Indian group that was found negative for *A. lumbricoides* and *T. trichiura* infection, while the tapeworm *Hymenolepis nana* reached more than 20% prevalence. Interesting, the Surui prevalence rates were the inverse ten years ago (Palhano-Silva et al., 2009). Absence or low prevalence rates for *A. lumbricoides* and *T. trichiura* were also observed among Yanomami contemporary groups and prehistoric inferences were made reflecting ancient scenarios (Confalonieri et al., 1991). Thus, prehistoric sites with time depth should be studied for increase and/or decrease presence of eggs over time.

Paleoparasitology is opening frontiers, and data are beginning to shed a light into evolutive strategies of these two important intestinal parasites over evolutionary time. What was before only theoretical suppositions can be now tested in paleoparasitological findings.

Acknowledgements

We acknowledge to Dr. Hun, for kindly answering our questions and verifying Asian finds; to Dr. Mathieu Le Bailly for sending

additional information from his articles. This research was supported by Brazilian agencies CNPq, CAPES, PAPES/Fiocruz, FAPERJ.

References

- Andrews, J.R.H., 1976. *Ascaris* egg in coprolite material. New Zealand. Med. J. 89, 274.
- Araújo, A., 1988. Dessecação experimental de fezes contendo ovos de ancilostomídeos. In: Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U. (Eds.), *Paleoparasitologia no Brasil*. Editora PEC/ENSP, Rio de Janeiro, pp. 111–112.
- Araújo, A., Confalonieri, U., Ferreira, L.F., 1984. Encontro de ovos de *Trichostongylidae* e *Trichuris trichiura* em corpo mumificado do período colonial brasileiro. Rev. Centr. Cienc. Biol. Saúde 1, 11–16.
- Araújo, A., Jansen, A.M., Bouchet, F., Reinhard, K., Ferreira, L.F., 2003. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1), 5–11.
- Araújo, J.V., Braga, F.R., Silva, A.R., Araújo, J.M., Tavela, A.O., 2008. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. Parasitol. Res. 102, 787–790.
- Araújo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Carvalho, R.O., Ferreira, S.R., 2009a. Activity of the nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thausum* on egg capsules of *Dipylidium caninum*. Vet. Parasitol. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19717240.
- Araújo, J.M., Araújo, J.V., Braga, F.R., Carvalho, R.O., Silva, A.R., Campos, A.K., 2009b. Interaction and ovicidal activity of nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* on *Taenia saginata* eggs. Exp. Parasitol. 121, 338–341.
- Aspöck, H., Flamm, H., Picher, O., 1973. Darmparasiten in menschlichen exkrementen aus prähistorischen Salzbergwerken der Hallstatt-Kultur (800–350 v. Chr.). Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A 223, 549–558.
- Aspöck, H., Auer, H., Picher, O., 1996. *Trichuris trichiura* eggs in the neolithic glacier mummy from the Alps. Parasitol. Today 12, 255–256.
- Bathurst, R.R., 2005. Archaeological evidence of intestinal parasites from coastal shell middens. J. Archaeol. Sci. 32, 115–123.
- Beard, D., 1986. The infirmary of Bermondsey priory. The London Archaeologist 5, 186–191.
- Boersema, J.H., Jansen, J., 1975. Helminth infections in medieval Utrecht. Trop. Geo. Med. 27, 441.
- Bóia, M.N., Carvalho-Costa, F.A., Sodré, F.C., Eyer-Silva, W.A., Lamas, C.C., Lyra, M.R., Pinto-Junior, V.L., Cantalice Filho, J.P., Oliveira, A.L., Carvalho, L.M., Gross, J.B., Sousa, A.L., Moraes, T.I., Bermudez-Aza, E.H., Martins, E.B., Coura, J.R., 2006. Mass treatment for intestinal helminthiasis control in an Amazonian endemic area in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo 48, 189–195.
- Bouchet, F., 1991. Étude parasitologique des chantiers archéologiques de Beauvais (Oise). Rev. Archéol. Picardie 3/4, 293–294.
- Bouchet, F., 1993. Apport de la parasitologie sur les chantiers archéologiques – l'exemple de la ville de Paris. Mem. Group Archeol. Seine-et-Marne 1, 55–61.
- Bouchet, F., 1995. Recovery of helminth eggs from archaeological excavations of the Grand Louvre (Paris, France). J. Parasitol. 81, 785–787.
- Bouchet, F., Audoin, F., Léger, N., Marchais, R., Baucheron, F., Munoz Lacasta, J., 1989. Etude parasitologique des coprolites et des sédiments de trois ensembles clos de la rue de Lutèce (Ile de la Cité) à Paris. Archeom 13, 13–21.
- Bouchet, F., Ervynck, A., Raveschot, P., 1991. Rijk, maar proper parasitologisch onderzoek van een put uit de Schepenhuisstraat. Stadsarcheologie 14, 463–466.
- Bouchet, F., Petrequin, P., Paicheler, J.C., Dommelier, S., 1995. Première approche paléoparasitologique du site néolithique de Chalais (Jura, France). Bull. Soc. Path. Ex 88, 265–268.
- Bouchet, F., Baffier, D., Girard, M., Morel, P., Paicheler, J.C., David, F., 1996. Paléoparasitologie en contexte pléistocène: premières observations à la Grande Grotte d'Arcy-sur-Cure (Yonne), France. C.R. Acad. Sci. Paris 319, 147–151.
- Bouchet, F., Bentrard, S., Paicheler, J.C., 1998. Enquête épidémiologique sur les helminthiases à la cour de Louis XIV. Mini-Synthese Med. Sci. 14, 463–466.
- Bouchet, F., West, D., Lefèvre, C., Corbett, D., 2001. Identification of parasitoses in a child burial from Adak Island (Central Aleutian Islands, Alaska). C.R. Acad. Sci. Paris 324, 123–127.
- Bouchet, F., Harter, S., Le Bailly, M., 2003. The state of the art of paleoparasitological research in the old world. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1), 9–101.
- Bouchet, F., Paicheler, J.C., 1995. Paléoparasitologie: presumption d'un cas de bilharziose au XVe siècle à Montbéliard (Doubs, France). C.R. Acad. Sci. Paris 318, 811–814.
- Braga, F.R., Araújo, J.V., Campos, A.K., Carvalho, R.O., Silva, A.R., Tavela, A.O., Maciel, A.S., 2007. In vitro observation of the action of isolates of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thausum* and *Verticillium chlamydosporium* on the eggs of *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758). Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 40, 356–358.
- Braga, F.R., Ferreira, S.R., Araújo, J.V., Araújo, J.M., Silva, A.R., Carvalho, R.O., Campos, A.K., Freitas, L.G., 2009a. Predatory activity of *Pochonia chlamydosporia* fungus on *Toxocara* (syn. *Neoscaris*) *vitulorum* eggs. Trop. Anim. Health Prod. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19697149.
- Braga, F.R., Carvalho, R.O., Araújo, J.M., Silva, A.R., Araújo, J.V., Lima, W.S., Tavela, A.O., Ferreira, S.R., 2009b. Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thausum*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. J. Helminthol. 16, 1–6.

- Carvalho, R.O., Araújo, J.V., Braga, F.R., Araujo, J.M., Silva, A.R., Tavela, A.O., 2009. Predatory activity of nematophagous fungi on infective larvae of *Ancylostoma* sp.: evaluation in vitro and after passing through the gastrointestinal tract of dogs. *J. Helminthol.* 83, 231–236.
- Carvalho-Costa, F.A., Gonçalves, A.Q., Lassance, S.L., Silva Neto, L.M., Salmazo, C.A., Bóia, M.N., 2007. *Giardia lamblia* and other intestinal parasitic infections and their relationships with nutritional status in children in Brazilian Amazon. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 49, 147–153.
- Chan, M.S., Medley, G.F., Jamison, D., Bundy, A.P., 1994. The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. *Parasitology* 109, 373–387.
- Chaves, S.A.M., Reinhard, K.J., 2006. Critical analysis of coprolite evidence of medicinal plant use, Piauí, Brazil. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 237, 110–118.
- Chaves, S., Renault-Miskovsky, J., 1996. Paléoenvironnement et paléoclimatologie du Piauí, Brésil: apport de l'étude pollinique de coprolithes humains recueillis dans le gisement préhistorique de Pedra Furada. *C.R. Acad. Sci. Paris* 322 (2a), 1053–1060.
- Cheng, T.O., 1984. Glimpses of the past from the recently unearthed ancient corpses in China. *Int. Med.* 101, 714–715.
- Cockburn, A., Barraco, R.A., Reyman, T.A., Peck, W.H., 1975. Autopsy of an Egyptian mummy. *Science* 187, 1155–1160.
- Confalonieri, U., Filho, B.R., Ferreira, L.F., Araújo, A., 1988. The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. In: Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U. (Eds.), *Paleoparasitologia no Brasil*. Editora PEC/ENSP, Rio de Janeiro, pp. 76–78.
- Confalonieri, U., Ferreira, L.F., Araújo, A., 1991. Intestinal helminths in lowland South American Indians: some evolutionary interpretations. *Hum. Biol.* 63, 865–875.
- Crompton, D.W.T., 1999. How much human helminthiasis is there in the world? *J. Parasitol.* 85, 397–493.
- Dark, P., 2004. New evidence for the antiquity of the intestinal parasite *Trichuris* (whipworm) in Europe. *Antiquity* 78, 676–681. 284.
- de Montellano, O.B., 1975. Empirical Aztec medicine. *Science* 188, 215–220.
- Dittmar, K., Steyn, M., 2004. Paleoparasitological analysis of coprolites from K2, an Iron Age archaeological site in South Africa: the first finding of *Dicrocoelium* sp. eggs. *J. Parasitol.* 90, 171–173.
- Dommelier, S., Bentrud, S., Paicheler, J.C., Pétrequin, P., Bouchet, F., 1998. Parasitoses Liées à l'Alimentation Chez Les Populations Néolithiques Du Lac De Chalain (Jura, France). *Anthropozool* 27, 41–49.
- Dommelier-Espejo, S., 2001. Contribution à l'étude Paléoparasitologique des Sites Néolithiques em Environnement Lacustre dans les Domaines Jurassien et Péril-alpin. Ph.D. thesis. Université de Reims, Reims.
- Evans, A.C., Markus, M.B., Mason, R.J., Steel, R., 1996. Late stoneage coprolite reveals evidence of prehistoric parasitism. *S.A.M.J.* 86, 274–275.
- Faulkner, C.T., Patton, S., Johnson, S.S., 1989. Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, van Buren County, Tennessee. *J. Parasitol.* 75, 461–463.
- Faulkner, C.T., Cowie, S.E., Martin, P.E., Martin, S.R., Mayes, C.S., Patton, S., 2000. Archeological evidence of parasitic infection from the 19th century company town of Fayette, Michigan. *J. Parasitol.* 86, 846–849.
- Fernandes, A., Ferreira, L.F., Gonçalves, M.L.C., Bouchet, F., Klein, C.H., Iguchi, T., Sianto, L., Araújo, A., 2005. Intestinal parasite analysis in organic sediments collected from a 16th-century Belgian archeological site. *Cad. Saude Publica* 21, 329–332.
- Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U.E.C., 1979. Subsídios para a paleoparasitologia do Brasil. I. Parasitos encontrados em coprólitos no município de Unaí, MG. In: Paper presented at the IV Congresso Brasileiro de Parasitologia, Campinas-São Paulo, p. 56.
- Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U., 1980. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unaí, Minas Gerais, Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* 74, 798–800.
- Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U., 1982. Untitled note. *Paleopathol. News* 38, 5.
- Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U., 1983. The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. *Trans. R. Soc. Trop. Med.* 77, 65–67.
- Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U., Lima, J.M.D., 1989. *Trichuris* eggs in human coprolites from archeological site of Furna do Estrago, Brejo da Madre de Deus, Pernambuco. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 581.
- Fisher, C.L., Reinhard, K.J., Kirk, M., DiVirgilio, J., 2007. Privies and parasites: the archaeology of health conditions in Albany, New York. *Hist. Archaeol.* 41, 172–197.
- Fouant, M.M., Allison, M., Gerszten, E., Focacci, G., 1982. Parasitos intestinales entre los indígenas precolombinos. *Rev. Chungara* 9, 285–299.
- Fries, C.R., Beidleman, D.K., Custer, J.F., 1990. Analysis of parasites from 19th century privy contexts, Wilmington, Delaware. *North Am. Archaeol.* 11, 17–27.
- Fry, G.F., 1974. Ovum and parasite examination of Salt Cave paleofeces. In: Watson, P.J. (Ed.), *Archaeology of the Mammoth Cave Are*. Academic Press., New York, p. 61.
- Fugassa, M., Barberena, R., 2006. Cuevas y zoonosis antiguas: paleoparasitología del sitio Orejas de Burro 1 (Santa Cruz, Argentina). *Magallania, Chile* 34, 57–62.
- Fugassa, M.H., Araujo, A., Guichón, R.A., 2006. Quantitative paleoparasitology applied to archaeological sediments. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. 2), 29–33.
- Fugassa, M.H., Sardella, N.H., Guichón, R.A., Denegri, G.M., Araujo, A., 2007. Paleoparasitological analysis applied to skeletal sediments of meridional Patagonian collections. *J. Archaeol. Sci.* 35, 1408–1411.
- Fugassa, M.H., Guichón, R.A., 2006. Nuevos aportes a la paleoparasitología del sitio arqueológico "Nombre de Jesús" (S.XVI), Cabo Virgenes, Argentina. *Rev. Arg. Antropol. Biol.* 8, 73–83.
- Galvani, A.P., 2003. Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 18, 132–139.
- Gárate, I., Suyo, B., Delgado, M., Solís, H., Castellanos, P., 2005. Hallazgo de nematode y huevos de *Ascaris* sp. en coprolitos de la momia "Shamana Alada", Cerrillos, Ica, Peru. *Bol. Chil. Parasitol.* 60 (T2), 325.
- Gonçalves, M.L.C., Araújo, A., Ferreira, L.F., 2003. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1), 103–118.
- Gray, N.F., 1987. Nematophagous fungi with particular reference to their ecology. *Biol. Rev.* 62, 245–304.
- Greig, J., 1981. The investigation of a medieval Barrel-latrines from Worcester. *J. Archaeol. Sci.* 8, 265–282.
- Greig, J., 1982. Garderobes, sewers, cesspits and latrines. *Curr. Archaeol.* 85, 49–52.
- Hall, A.R., Jones, A.K.G., Kenward, H.K., 1983. Cereal bran and human faecal remains from archaeological deposits - some preliminary observations. In: Proudfoot, B. (Ed.), *Site, Environment and Economy*. BAR International Series, vol. 173, pp. 85–104. Oxford.
- Han, E.T., Guk, S.M., Kim, J.L., Jeong, H.J., Kim, S.N., Chai, J.Y., 2003. Detection of parasite eggs from archaeological excavations in the Republic of Korea. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1), 123–126.
- Harter, S., Bouchet, F., 2006. Étude paléoparasitologique d'éléments atypiques de la Basse et Haute Vallée du Nil. *Bull. Soc. Path. Ex* 99, 53–57.
- Harter, S., Le Bailly, M., Janot, F., Bouchet, F., 2003. First paleoparasitological study of an embalming rejects jar found in Saqqara, Egypt. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1), 119–121.
- Harter, S., Mort, F., Vigne, J.D., Guilaïne, J., Brun, A., Bouchet, F., 2005. Premières données parasitologiques sur les populations humaines pré-céramiques chypriotes (VIIIe et VIIe millénaires av. J.-C. Paléorient 31, 43–54.
- Helbaek, H., 1958. Grauballemandens sidste måltid. *Kuml*, pp. 83–116.
- Herrmann, B., 1985. Parasitologisch-epidemiologische Auswertungen Mittelalterlicher Kloaken. *Z. Archäol. Mittelalters* 13, 131–161.
- Herrmann, B., Schulz, U., 1986. Parasitologische Untersuchungen eines Spätmittelalterlich-Frühneuzeitlichen Kloakeninhaltes aus der Fronerei auf dem Schragen in Lübeck. *Lübecker Schri. Archäol. Kultur* 12, 167–172.
- Hevly, R.H., Kelly, R.E., Anderson, G.A., Olsen, S.J., 1979. Comparative effects of climate change, cultural impact, and volcanism in the paleoecology of Flagstaff, Arizona, A.D. 900–1300. In: Sheets, P., Grayson, D. (Eds.), *Volcanic Activity and Human History*. Academic Press, New York, pp. 487–523.
- Hidalgo-Argüello, M.R., Baños, N.D., Grandes, J.F., Marcos, E.P., 2003. Parasitological analysis of Leoneese Royalty from Collegiate-Basilica of ST. Isidoro, León (Spain): helminths, protozoa, and mites. *J. Parasitol.* 89, 738–743.
- Horne, P.D., Tuck, J.A., 1996. Archaeoparasitology at a 17th century colonial site in Newfoundland. *J. Parasitol.* 82, 512–515.
- Jansen Jr., J., Over, H.J., 1962. Het voorkomen van parasieten in terpmateriaal uit Noordwest Duitsland. *Tijdschr. Diergeneesk* 87, 1377–1379.
- Jansen Jr., J., Over, H.J., 1966. Observations on helminth infections in a roman armycamp. In: Paper Presented at 1st International Congress of Parasitology, Roma-Italy, p. 791.
- Jones, A.K.G., 1982. Human parasite remains: prospects for a quantitative approach. In: Hall, A.R., Kenward, H.K. (Eds.), *Environmental Archaeology in the Urban Context*. The Council for British Archaeology, pp. 66–77.
- Jones, A.K.G., 1984. Intestinal parasite ova from archaeological deposits: evidence of widespread faecal contamination in Viking age York. In: Paper Presented at Paleopathology 5th European Members Meeting, Siena-Italy.
- Jones, A.K.G., 1986. Parasitological investigations on Lindow man. In: Stead, I.M., Bourke, J.B., Brothwell, D. (Eds.), *Lindow Man the Body in the Bog*. British Museum Publications, pp. 136–139.
- Jones, A.K.G., Hutchinson, A.R., Nicholson, C., 1988. The worms of Roman horses and other finds of intestinal parasite eggs from unpromising deposits. *Antiquity* 62, 275–276.
- Keiser, J., Utzinger, J., 2008. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 299, 1937–1948.
- Kelly, P., Good, B., Hanrahan, J.P., Fitzpatrick, R., Waal, T., 2009. Screening for the presence of nematophagous fungi collected from Irish sheep pastures. *Vet. Parasitol.* [Epub ahead of print] PubMed PMID: 19682798.
- KNM-Kwangju National Museum, 1997. Shinchang-dong wetland site I. Reporto on the research of antiquities of the Kwangju National Museum. *Kwangju Natl. Museum* 33, 159–166.
- Kobayashi, A., Katakura, K., Hamada, A., 1984. The fate of *Ascaris* eggs applied to the soil under various conditions. In: Paper Presented at Sixth APCO Parasitologist Meeting, Nepal, pp.15–17.
- Larsen, M., 1999. Biological control of helminths. *Int. J. Parasitol.* 29, 139–146.
- Larsen, M.N., Roepstorff, A., 1999. Seasonal variation in development and survival of *Ascaris suum* and *Trichuris suis* eggs on pastures. *Parasitology* 119, 209–220.
- Le Bailly, M., Gonçalves, M.L.C., Lefèvre, C., Roper, D.C., Pye, J.W., Araújo, A., Bouchet, F., 2006. Parasitism in Kansas in the 1800s – a glimpse to the past through the analysis of grave sediments from Meadowlark cemetery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. 2), 53–56.
- Legendre, J.P., Mariel, J., Rieb, J.P., 1986. Contribution à l'Étude de l'État Sanitaire de la Population Strasbourgeoise à la Fin du Moyen-Age. *Archéologie et Médecine*. APDCA, Juan-les-Pins.
- Leles, D., Araújo, A., Ferreira, L.F., Vicente, A.C.P., Iñiguez, A.M., 2008. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of

- ascariasis in pré-Colombian South América times. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103, 106–108.
- Liangbiao, C., Tao, H., 1981. Scanning electron microscopic view of parasites worm ova in an ancient corpse. Acta Acad. Sinicae 3, 64–65.
- Maciel, A.S., Araújo, J.V., Campos, A.K., Lopes, E.A., Freitas, L.G., 2009a. Predation of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by nematophagous fungi in different conidial concentrations. Vet. Parasitol. 161, 239–247.
- Maciel, A.S., Araújo, J.V., Campos, A.K., Benjamin, L.A., Freitas, L.G., 2009b. Scanning electron microscopy of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae captured and destroyed by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans*. Micron 40, 463–470.
- Martinson, E., Reinhard, K.J., Buikstra, J.E., Cruz, K.D., 2003. Pathoecology of Chiribaya parasitism. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1), 195–205.
- Matsui, A., Kanehara, M., Kanehara, M., 2003. Paleoparasitology in Japan – discovery of toilet features. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1), 127–136.
- Mitchell, P.D., Stern, E., 2000. Parasitic intestinal helminth ova from the latrines of the 13th century crusader hospital of St John in Acre, Israel. In: Paper Presented at Paleopathology Association 13th Biennial European Members Meeting, Chieti, pp. 21–22.
- Moerman, D.E., 2009. Native American Medicinal Plants: An Ethnobotanical Dictionary. Timber Press, Portland.
- Moore, D.P., 1981. Life seen from a medieval latrine. Nature 294, 644.
- Muchiri, E.M., Thiong'o, F.W., Magnussen, P., Ouma, J.H., 2001. A comparative study of different albendazole and mebendazole regimens for the treatment of intestinal infections in school children of Uisung Division, western Kenya. J. Parasitol. 87, 413–418.
- Nansen, P., Jørgensen, R.J., 1977. Fund af parasitæg i arkæologisk materiale fra det vikingetidige Ribe. Nord Vet-Med 29, 263–266.
- Palhano-Silva, C., Araújo, A., Lourenço, A.E.P., Bastos, O., Santos, R.V., Coimbra Jr., C.E., 2009. Intestinal parasitic infection in the Suruí Indians, Brazilian Amazon. Interciencia 34, 1–6.
- Patrucco, R., Tello, R., Bonavia, D., 1983. Parasitological studies of coprolites of prehispanic Peruvian populations. Curr. Anthropol. 24, 393–394.
- Pau, D., PerezTort, G., Petetta, L., Coronel, D., 2005. Hallazgo de huevos de *Ascaris* ssp. en sedimentos arqueológicos contenidos en la cavidad pélvica-estomacal de restos humanos. Bol Chil Parasitol. 60 (T2), 327.
- Peng, W., Yuan, K., Zhou, X., Hu, M., EL-Osta, Y.G., Gasser, R.B., 2003. Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. Electrophoresis 24, 2308–2315.
- Pike, A.W., 1967. The recovery of parasite eggs from ancient cesspit and latrine deposits: an approach to the study of early parasite infections. In: Brothwell, D., Sandison, A.T. (Eds.), Diseases in Antiquity. CC Thomas, Springfield, pp. 184–188.
- Pike, A.W., 1968. Recovery of helminth eggs from archaeological excavations, and their possible usefulness in providing evidence for the purpose of an occupation. Nature 219, 303–304.
- Pike, A.W., 1975. Parasite eggs. In: Platt, C., Coleman-Smith, R. (Eds.), Excavations in Medieval Southampton. Leicester University Press, Leicester, pp. 347–348.
- Pizzi, T., Schenone, H., 1954. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. Bol Chil Parasitol. 9, 73–75.
- Reinhard, K.J., 1988. Cultural ecology of prehistoric parasitism on the Colorado Plateau as evidenced by coprology. Amer. J. Phys. Anthropol. 77, 355–366.
- Reinhard, K.J., 1990. Archaeoparasitology in North America. Am. J. Phys. Anthropol. 82, 145–163.
- Reinhard, K.J., 1992. Patterns of diet, parasitism, and anemia in prehistoric west North America. In: Stuart-Macadam, P., Kent, S. (Eds.), Diet, Demography, and Disease: Changing Perspectives on Anemia. Aldine de Gruyter, New York, pp. 219–258.
- Reinhard, K.J., 2004. Archaeoparasitological analysis of sediments from the Pearl Street excavations. In: Pearl Street Reconstruction Part I: Archaeological Mitigation Report, Pearl Street from Madison Avenue to Pine Street, City of Albany, Albany County, New York. New York Division of Research and Collection, Cultural Resources Survey Program, pp. 93–97.
- Reinhard, K.J., 2007. Pathoecology of two Anasazi villages. In: Reitz, E.J., Newsom, L.A., Scudder, S.J. (Eds.), Case Studies in Environmental Archaeology, second ed. Plenum Press, New York, pp. 191–210.
- Reinhard, K.J., 2008. Parasite pathoecology of Chacoan Great houses: the healthiest and wormiest ancestral Puebloans. In: Reed, P.F. (Ed.), Chaco's Northern Prodigies Salmon, Aztec, and the Ascendancy of the Middle San Juan Region After AD 1100. University of Utah Press, Salt Lake City, pp. 86–95.
- Reinhard, K.J., Bryant, V.M., 2008. Pathoecology and the future of coprolite studies. In: Stodder, A.W.M. (Ed.), Reanalysis and Reinterpretation in Southwestern Bioarchaeology. Arizona State University Press, Tempe, pp. 199–216.
- Reinhard, K.J., Ambler, J.R., McGuffie, M., 1985. Diet and parasitism at Dust Devil Cave. Amer. Antiq. 50, 819–824.
- Reinhard, K.J., Mrozowski, S.A., Orloski, K.A., 1986. Privies, pollen, parasites and seeds: a biological nexus in historic archaeology. Masca J. 4, 31–36.
- Reinhard, K.J., Hevly, R.H., Anderson, G.A., 1987. Helminth remains from prehistoric Indian coprolites on the Colorado Plateau. J. Parasitol. 73, 630–639.
- Reinhard, K.J., Confalonieri, U., Herrmann, B., Ferreira, L.F., Araújo, A., 1988. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. In: Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U. (Eds.), Paleoparasitologia no Brasil. Editora PEC/ENSP, Rio de Janeiro, pp. 83–108.
- Reinhard, K.J., Araújo, A., Sianto, L., Costello, J.G., Swope, K., 2008. Chinese liver flukes in latrine sediments from Wong Nim's property, San Bernardino, California: archaeoparasitology of the Caltrans District Headquarters. J. Parasitol. 94, 300–303.
- Ribeiro, R.C.F., Ferraz, S., Mizobutsi, E.H., Menezes, M., 1999. Levantamento de espécies de *Monacrosporium* predadoras de nematóides em diversas regiões brasileiras. Nematologia Brasileira 23, 40–47.
- Ribeiro, R.C.F., Rodríguez, T.T.M.S., Xavier, A.A., Gomes, L.L.S.G., 2003. Ocorrência de fungos predadores de nematóides sob solos de bananais, no norte de Minas Gerais. Unimontes Científica 5, 1–8.
- Rocha, G.C., Harter-Lailheugue, S., Le Bailly, M., Araújo, A., Ferreira, L.F., Serra-Freire, N.M., Bouchet, F., 2006. Paleoparasitological remains revealed by seven historic contexts from place d'Armes, Namur, Belgium. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101 (Suppl. 2), 43–52.
- Roever-Bonnet, H., Rijpstra, C., van Renesse, M.A., Peen, C.H., 1979. Helminth eggs and gregarines from coprolites from the excavations at Swifterbant. Helinium 19, 7–12.
- Rouffignac, C., 1987. Mediaeval man and his worms. Biologist 34, 187–190.
- Rousset, J.J., Heron, C., Metrot, P., 1996. Helminthoses humaines chez les Gaulois. Hist. Sci. Med. 30, 41–46.
- Saathoff, E., Olsen, A., Kvalsvig, J.D., Appleton, C.C., 2004. Patterns of geohelminth infection impact of albendazole treatment and re-infection after treatment in schoolchildren from rural KwaZulu-Natal/South-Africa. BMC Infect. Dis. 13, 4–27.
- Saldiva, S.R., Silveira, A.S., Philippi, S.T., Torres, D.M., Mangini, A.C., Dias, R.M., da Silva, R.M., Buratini, M.N., Massad, E., 1999. *Ascaris-Trichuris* association and malnutrition in Brazilian children. Paediatr. Perinat. Epidemiol. 13, 89–98.
- Santor, C., Vinton, S.D., Reinhard, K.J., 2003. Inca expansion and parasitism in the Lluta Valley: preliminary data. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1), 161–163.
- Šebela, L., Vojtková, L., Vojtek, J., 1990. Intestinal parasites in man of old Bronze Age. Athropologie 2, 105–107.
- Seo, M., Guk, S.M., Kim, J., Chai, J.Y., Bok, G.D., Park, S.S., Oh, C.S., Kim, M.J., Yi, Y.S., Shin, M.H., Kang, I.U., Shin, D.H., 2007. Paleoparasitological report on the stool from a Medieval child mummy in Yangju, Korea. J. Parasitol. 93, 589–592.
- Shin, D.H., Chai, J.Y., Park, E.A., Lee, W., Lee, H., Lee, J.S., Choi, Y.M., Koh, B.J., Park, J.B., Oh, C.S., Bok, G.D., Kim, W.L., Lee, E., Lee, E.J., Seo, M., 2008. Finding ancient parasite larvae in the sample from a male living in the late 17th century Korea. J. Parasitol. 11, 1.
- Specht, K.W., 1963. Eine interessante Erdprobe aus einer Abortgrube im Römerkastell Künzing. Saalburg-Jahrbuch 21, 90–94.
- Su, T.C., 1987. A scanning electron microscopic study on the parasite eggs in an ancient corpse from a tomb of Chu Dynasty, the Warring State, in Jiangling County, Hubei Province. J. Tongji Med. Univ. 63, 4.
- Szidat, L., 1944. Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor- und Frühgeschichtlichen Moorleichen. Z. Parasitenkd 13, 265–274.
- Taylor, E.L., 1955. Parasitic helminths in medieval remains. Vet. Rec. 67, 218–228.
- Wang, C.Y., Fang, Z.M., Sun, B.S., Gu, L.J., Zhang, K.Q., Sung, C.K., 2008. High infectivity of an endoparasitic fungus strain, *Esteya vermicola*, against nematodes. J. Microbiol. 46, 380–389.
- Wei, O., 1973. Internal organs of a 2100-year-old female corpse. Lancet 7839, 1198.
- Wilson, A., Rackham, D.J., 1976. Parasite eggs. In: The Archaeology of York: The Past Environment of York, the Environment Evidence from the CHURCH Street Sewer System. Council for British Archaeology, London, pp. 32–33.
- Witenberg, G., 1961. Human parasites in archaeological findings. Bull. Isr. Expl. Soc. 25, 86.
- Yang, W., Song, G., Teng, R., 1984. Parasitologische Untersuchung einer alten Leiche aus der Chu-Dynastie der Streitenden Reiche aus dem Mazhuan-Grab Nr. 1, Kreis Jiangling, Provinz Hubei. Acta Acad. Med. Wuhan, 23–27.
- Zani, L.C., Favre, T.C., Pieri, O.S., Barbosa, C.S., 2004. Impact of antihelminthic treatment on infection by *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* and hookworms in Covas, a rural community of Pernambuco, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 46, 63–67.