

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
INSTITUTO BIOMÉDICO
POS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

PAULA CASCARDO

INOVAÇÕES METODOLÓGICAS PARA O ESTUDO DE PARASITOS EM AMOSTRAS
DA MEGAFUNA E DE OUTROS ANIMAIS ENCONTRADOS EM SÍTIOS
ARQUEOLÓGICOS E PALEONTOLÓGICOS DO BRASIL

Niterói, RJ

2017

PAULA CASCARDO

**INOVAÇÕES METODOLÓGICAS PARA O ESTUDO DE PARASITOS EM
AMOSTRAS DA MEGAFUNA E DE OUTROS ANIMAIS ENCONTRADOS EM
SÍTIOS ARQUEOLÓGICOS E PALEONTOLÓGICOS DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Daniela Leles

Niterói, RJ

2017

PAULA CASCARDO

**INOVAÇÕES METODOLÓGICAS PARA O ESTUDO DE PARASITOS EM
AMOSTRAS DA MEGAFUNA E DE OUTROS ANIMAIS ENCONTRADOS EM
SÍTIOS ARQUEOLÓGICOS E PALEONTOLÓGICOS DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em 29 de junho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Daniela Leles - UFF
Orientadora

Prof^a Dr^a Beatriz Brener de Figueiredo - UFF

Prof^a Dr^a Patricia Riddell Millar Goulart - UFF

Dr^a Luciana Sianto – FIOCRUZ

Prof^a Dr^a Adriana Pitella Sudré – UFF

Prof^a Dr^a Marcia Chame - FIOCRUZ

Niterói

2017

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) que através do fomento possibilitaram a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal Fluminense, onde conheci profissionais e amigos que me ensinaram e impulsionaram a continuar trilhando o caminho da ciência.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e os núcleos PDTIS (Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde) e CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório) que abriram as portas para auxiliar no curso desta pesquisa.

Aos professores do MIP, que contribuíram com seus conhecimentos didáticos e aconselhamentos.

A Professora Daniela Leles, que me ensinou imensamente durante todo o curso do Mestrado e desde antes durante a iniciação científica, com sua competência e criatividade, sempre com delicadeza e sobretudo paciência com minhas inseguranças, não poderia ter melhor orientadora.

Não posso esquecer jamais de agradecer à minha família, principalmente a minha mãe, que não mediu esforços para me ajudar sempre que precisei, e especialmente quando tive que voltar da licença e ela se desdobrou para auxiliar com a minha filha.

Aos colegas do curso e as alunas que de alguma forma se envolveram nesse projeto e me ajudaram durante essa jornada, Liesbeth Villarroel, Elisa Pucu, Andressa Freire.

E gostaria muito de poder agradecer a um grande nome da Paleoparasitologia no Brasil, Doutor Aduino Araujo, sempre munido de grande gentileza, me incentivou a buscar sempre o que me interessava, como o via fazer com outros alunos. Foi um exemplo de que um grande cientista não precisa ser intocável, mas sim ser acessível para ajudar seus alunos a traçar sua própria história.

Obrigada!

RESUMO

O Brasil possui grande potencial para pesquisa paleoparasitológica com amostras antigas de animais incluindo os extintos, sendo a América do Sul o continente que mais perdeu espécies com a última grande extinção, da megafauna, que ocorreu no quaternário. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão sobre parasitos encontrados em animais extintos e, pesquisá-los nas amostras antigas de animais provenientes de sítios arqueológicos e paleontológicos do Brasil por diferentes métodos diagnósticos. Por imunocromatografia e/ou detecção molecular pela PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamento nucleotídico foram estudados coprólitos de felinos (n=11), roedores (n=7), canídeo (n=1), preguiça terrícola (n=1), palaeolama (n=2) e amostras ósseas de uma mesma preguiça terrícola (n=5), as amostras tem origem nos estados da Bahia, Piauí e Pernambuco, com datações que vão do Pleistoceno superior até 400±50 antes do presente. Além da pesquisa para alvos moleculares do hospedeiro pesquisou-se também, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Giardia duodenalis* e triatomíneos. Nem todos os alvos ou agentes etiológicos foram pesquisados em todas as amostras. Alguns alvos tanto para hospedeiro quanto parasitos foram previamente testados em modelos experimentais, os quais também envolveram a pesquisa de outros organismos como *Eimeria* sp. e *Pentatrichomonas* sp. Foram realizados modelos experimentais para padronização dos ensaios imunocromatográficos para pesquisa de *T. gondii* e *G. duodenalis* que posteriormente foram testados em algumas amostras antigas. Adicionalmente buscou-se alternativas para o reaproveitamento de amostras verificando a viabilidade do uso de uma mesma alíquota de amostra nas duas técnicas abordadas: imunocromatografia e PCR. A revisão de literatura mostrou que o estudo de parasitos com animais extintos ainda está aquém daqueles realizados com amostras humanas, e essa diferença é ainda maior quando considerado o diagnóstico imunológico e molecular, prevalecendo os estudos por microscopia. Não foi obtido nenhum resultado positivo para os agentes etiológicos pesquisados nas amostras antigas pelo diagnóstico molecular. Porém um dos *primers* utilizados para *T. cruzi* em amostras de osso de preguiça terrícola geraram sequências compatíveis com bactérias (*Pseudomonas putida*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* e *Nitrobacter hamburguensis*) que podem ser autóctones ou contaminação desde a retirada da amostra do sítio e chegada ao laboratório para análises. Para o alvo triatomíneo com um coprólito de felino conseguiu-se uma sequência de alta qualidade que não teve similaridade com nenhum organismo com sequência disponibilizada pelo Genbank, mostrando a importância do depósito de sequências ainda desconhecidas. O teste imunocromatográfico para *T. gondii* não se mostrou positivo para amostras antigas, porém mostrou-se promissor com o modelo experimental. Quanto ao teste imunocromatográfico para *G. duodenalis* ele foi sensível a diferentes genótipos, humanos, animais ou zoonóticos, tendo sido eficiente em todos os modelos experimentais e positivo em duas amostras antigas: coprólitos de preguiça terrícola e palaeolama do mesmo sítio, mostrando a presença desse protozoário desde o pleistoceno superior no nordeste brasileiro. Com este estudo obteve-se uma importante inovação metodológica ao mostrar que é possível reaproveitar o resíduo da amostra que passou pelo processo de extração do DNA no teste imunocromatográfico e vice-versa, de grande valor para análise de espécimes raros, como é o caso dos paleoparasitológicos.

Palavras-chave: DNA antigo, imunodiagnóstico, animais extintos, protozooses, coprólitos, revisão.

ABSTRACT

Brazil has great potential for paleoparasitological research with ancient samples of animals including the extinct ones, with South America being the continent that lost most species at the last great megafauna extinction that occurred in the quaternary. The aim of this work was to make a review about parasites found in extinct animals and investigate them in the ancient remains of animals recovered from archeological and paleontological sites in Brazil by different diagnostic methods. Were analysed by immunochromatography and/or molecular detection through PCR (Polymerase Chain Reaction) and nucleotide sequencing coprolites from felines (n=11), rodents (n=7), canids (n=1), ground sloth (n=1), palaeolama (n=2) and bone samples from another ground sloth (n=5). The samples originate in the states of Bahia, Piauí and Pernambuco, and dated from the late Pleistocene to 400±50 before present. In addition to the research for the molecular targets from the hosts also were studied *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Giardia duodenalis* and triatomines, nor the targets nor etiologic agents were studied in all samples. Some targets for the host and also for parasites were previously tested in experimental models, that also involved other organisms such as *Eimeria* sp. and *Pentatrachomonas* sp. There were also made experimental models for the padronization of the immunochromatographic tests to the research of *T. gondii* and *G. duodenalis* that were then tested in some ancient samples. Additionally alternatives were considered for the reuse of the samples verifying the viability of testing the same one in both techniques: immunochromatography and PCR. The literature review showed that the paleoparasitological research from extinct animals are still far from the ones for human samples, and this difference is greater when immunological and molecular diagnosis are considered, prevailing the microscopy. No positive result were obtained with the ancient samples for the etiologic agents using the molecular method. However one of the primers used for *T. cruzi* in ground sloth bone samples generated sequences compatible with bacteria (*Pseudomonas putida*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* and *Nitrobacter hamburguensis*) which may be autochthonous or contaminated from the withdrawal of the sample from the site and arrival at the laboratory for analysis. For the triatomine target with a feline coprolite a high quality sequence was obtained which had no similarity to any organism with sequence available from Genbank, showing the importance of depositing sequences as yet unknown. The immunochromatographic test for *T. gondii* did not prove positive for old samples, but it was promising with the experimental model. As for the immunochromatographic test for *G. duodenalis*, it was sensitive to different genotypes, human, animal or zoonotic, having been efficient in all experimental models and positive in two ancient samples: coprolites of ground sloth and palaeolama of the same site. With this study, an important methodological innovation was obtained by showing that it is possible to reuse the sample residue that underwent the DNA extraction process in the immunochromatographic test and vice versa, of great value for the analysis of rare specimens, as is the case of Paleoparasitological ones.

Keywords: Ancient DNA, immunodiagnostic, extinct animals, protozooses, coprolites, review.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1: Reconstrução da preguiça terrícola *Nothrotherium maquinense* (disponível em: <http://detetivesdopassado.colecionadoresdeossos.com/2014/04/nothrotherium-maquinense-uma-pequena.html>), f. 23

Fig. 2: Reconstrução de *Palaeolama* (disponível em: <https://alchetron.com/Palaeolama-3977349-W>), f. 24

Fig. 3: Foto de *Panthera onca* (Disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/carnivoros/on%C3%A7a-pintada_Panthera_onca.pdf), f. 25

Fig. 4: Reconstrução de um Tigre-dente-de-sabre (disponível em: <https://mundopre-historico.blogspot.com.br/2009/12/tigre-dente-de-sabre.html>), f. 26

Fig. 5: Foto de *Kerodon rupestres* (mocó) (disponível em: <http://chc.org.br/acrobatas-rupestres/>), f. 26

Fig. 6: Foto de *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) (disponível em: <http://www.procarnivoros.org.br/2009/animais1.asp?cod=21>), f. 27

Quadro 1 Amostras antigas ósseas e de coprólitos, segundo código, tipo, animal, sítio e datação, utilizadas no presente estudo, f. 38

Quadro 2: Amostras modernas, segundo código, tipo, hospedeiro, descrição e objetivos, utilizadas no presente estudo, f. 39

Quadro 3: Alvos moleculares utilizados para as amostras antigas, f. 43

Quadro 4: Alvos moleculares utilizados para as amostras modernas, f. 44

Fig. 7: Corrida eletroforética para amostras ósseas de preguiça terrícola usando alvos para o hospedeiro (*Nothrotheriops shastensis*), f. 55

Fig. 8: Corrida eletroforética para amostras ósseas de preguiça terrícola (*Eremotherium* sp.) usando alvos para *Trypanosoma cruzi*, f. 57

Fig. 9: Alinhamento comparando a sequência obtida da amostra óssea (SPG3) de preguiça terrícola *Eremotherium* sp. com os *primers* para TC/TCI com sequência da bactéria *Pseudomonas putida* através do programa *online* BLAST, f. 58

Fig. 10: Corrida eletroforética de reamplificação das amostras modernas positivas para *T. gondii*, usando os alvos para o hospedeiro felino (PCytb) e para *T. gondii* (NN1/2, TgNP1/2), f. 62

Fig. 11 Corrida eletroforética para os coprólitos de animais com alvo para o inseto triatomíneo, f. 64

Fig. 12: Cromatograma obtido com a amostra 768 (felino) para o alvo molecular do triatomíneo (TRIF/R), f. 65

Fig. 13: Corrida eletroforética para a PCR feita a partir de DNA já extraído das fezes de animais com suspeitos de infecção por *Eimeria* spp., f. 66

Fig. 14: Corrida eletroforética dos produtos de PCR para o hospedeiro feita com as fezes frescas de *Lama glama*, f. 69

Fig. 15: Corrida eletroforética dos produtos de PCR para o hospedeiro feita com os coprólitos experimentais de *Lama glama*, f. 70

Fig. 16: Corrida eletroforética dos produtos de PCR para o hospedeiro feita a partir de coprólitos experimentais de *Lama glama*, f. 71

Fig. 17: Corrida eletroforética para amostras dessecadas de ovino feita para os alvos de *Giardia duodenalis*, f. 73

Quadro 5: Resultado dos sequenciamentos obtidos no presente estudo, f. 76

Fig. 18: Teste imunocromatográfico para *T. gondii* com amostras de coprólitos de felinos, f.

Fig. 19: Teste imunocromatográfico para *T. gondii* com amostras positivas proveniente de camundongo experimentalmente infectado, f. 78

Fig. 20: Resultados dos testes imunocromatográficos utilizando amostras frescas que não passaram pelo aquecimento prévio, f. 80

Fig. 21: Resultado do teste imunocromatográfico utilizando os coprólitos experimentais feitos com amostras de ovino (Boneca), f. 81

Fig. 22. Corrida eletroforética para amostras frescas de animais, feita para o protozoário *Giardia duodenalis*, f. 82

Fig. 23: Resultado do teste imunocromatográfico utilizando a amostra de fezes humanas (E1) frescas que passou pela extração do DNA, f. 83

Fig. 24: Resultado do teste imunocromatográfico utilizando resíduo da extração do coprólito experimental feito com as fezes de humano (E1), f. 83

Fig. 25: Resultado do teste imunocromatográfico utilizando amostras antigas, f. 84

SUMÁRIO

- 1. INTRODUÇÃO**, p. 14
- 2. REFERENCIAL TEÓRICO**, p. 16
 - 2.1 PALEOPARASITOLOGIA, p. 16
 - 2.2 DNA ANTIGO, p. 17
 - 2.3 IMUNODIAGNÓSTICO, p. 20
 - 2.4 MEGAFaUNA E OUTROS ANIMAIS DO BRASIL COM POTENCIAL PARA PALEOPARASITOLOGIA MOLECULAR, p. 20
 - 2.4.1 Preguiça Terrícola, p. 21
 - 2.4.2 Palaeolama sp., p. 23
 - 2.4.3 Felinos, p. 24
 - 2.4.4 Outros animais, p. 26
 - 2.5 PARASITOS DE IMPORTÂNCIA NA PALEOPARASITOLOGIA MOLECULAR DA MEGAFaUNA E OUTROS ANIMAIS DO BRASIL, p. 27
 - 2.5.1 Trypanosoma cruzi, p. 27
 - 2.5.2 Toxoplasma gondii, p. 28
 - 2.5.3 Triatomíneo, p. 30
 - 2.5.4 Giardia sp., p. 30
 - 2.5.5 Outros parasitos, p. 31
- 3. JUSTIFICATIVA**, p. 33
- 4. OBJETIVOS**, p. 34
- 5. MATERIAL E MÉTODOS**, p. 36
 - 5.1 AMOSTRAS, p. 36
 - 5.1.1 Descrição das amostras antigas, p. 36
 - 5.1.2 Descrição das amostras modernas usadas como controle e/ou para confecção dos modelos experimentais, p. 38
 - 5.1.2.1 Coprólitos experimentais, p. 40
 - 5.2 ENSAIOS MOLECULARES, p. 40
 - 5.2.1 Extração do DNA das amostras antigas de animais extintos, p. 40
 - 5.2.2 Extração do DNA das amostras modernas usadas como controles e/ou modelos experimentais, p. 42
 - 5.2.3 Alvos moleculares, p. 43

5.2.4	<u>Descrição da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</u> , p. 44
5.2.4.1	PCR para o hospedeiro (preguiça terrícola), p. 44
5.2.4.2	PCR para <i>Trypanosoma cruzi</i> , p. 45
5.2.4.3	PCR para <i>Toxoplasma gondii</i> , p. 45
5.2.4.4	PCR para o hospedeiro felino, p. 46
5.2.4.5	PCR para o inseto triatomíneo, p. 47
5.2.4.6	PCR para <i>Eimeria</i> sp. p. 47
5.2.4.7	PCR para <i>Pentatrichomonas hominis</i> , p. 48
5.2.4.8	PCR para o hospedeiro camelídeo, p. 48
5.2.4.9	PCR para <i>Giardia duodenalis</i> , p. 48
5.2.5	<u>Crêterios de autenticidade</u> , p. 49
5.2.6	<u>Corrida eletroforética e purifica�o dos produtos amplificados</u> , p. 50
5.2.7	<u>Edi�o e análise das sequências</u> , p. 50
5.3	IMUNODIAGNÓSTICO, p. 51
5.3.1	<u>Amostras para o teste <i>Toxoplasma gondii</i></u> , p. 51
5.3.1.1	Metodologia do teste, p. 51
5.3.2	<u>Amostras para o teste <i>Giardia duodenalis</i></u> , p. 52
5.3.2.1	Metodologia do teste, p. 52
5.4	TESTE PARA AVALIA�O SOBRE REAPROVEITAMENTO DE AMOSTRAS, p. 53
5.4.1	<u>Amostras</u> , p. 53
5.4.2	<u>Metodologia</u> , p.53
5.5	REVISÃO DE LITERATURA: PARASITOS EM ANIMAIS EXTINTOS E SEUS VESTÍGIOS, p. 54
5.6	ASPECTOS �TICOS, p. 54
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO , p. 55
6.1	ENSAIOS MOLECULARES, p. 55
6.1.1	<u>Alvo molecular para o hospedeiro preguiça terrícola (<i>Eremotherium</i> sp.)</u> , p. 55
6.1.2	<u>Alvo para <i>Trypanosoma cruzi</i></u> , p. 56
6.1.3	<u>Alvo para <i>Toxoplasma gondii</i></u> , p. 61
6.1.4	<u>Alvo para inseto triatomíneo</u> , p. 63
6.1.5	<u>Alvo para <i>Eimeria</i> spp.</u> , p. 65

6.1.6	<u>Alvo para <i>Pentatrichomonas hominis</i></u> , p. 67
6.1.7	<u>Alvo para o hospedeiro (camelídeo)</u> , p. 67
6.1.7.1	A partir de amostras de fezes frescas de <i>Lama glama</i> , p. 67
6.1.7.2	A partir de fezes dessecadas de <i>Lama glama</i> , p. 69
6.1.7.3	A partir dos coprólitos de <i>Palaeolama</i> sp., p. 72
6.1.8	<u>Alvo para <i>Giardia duodenalis</i></u> , p. 72
6.1.8.1	A partir de amostras de fezes de ovino dessecadas (coprólitos experimentais), p. 72
6.1.8.2	A partir dos coprólitos de <i>Palaeolama</i> sp., p. 75
6.1.9	<u>Ensaio metagenômico</u> , p. 76
6.2	TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS, p. 77
6.2.1	<u>Teste <i>Toxoplasma gondii</i></u> , p. 77
6.2.2	<u>Teste <i>Giardia duodenalis</i></u> , p. 79
6.2.2.1	Amostras frescas, p. 79
6.2.2.2	Coprólitos experimentais, p. 80
6.3	TESTE PARA AVALIAÇÃO SOBRE REAPROVEITAMENTO DE AMOSTRAS, p. 81
6.3.1	<u>Amostras frescas</u> , p. 81
6.3.2	<u>Coprólitos de preguiça terrícola e <i>Palaeolama</i> sp.</u> , p. 84
6.4	REVISÃO DE LITERATURA: PARASITOS DE ANIMAIS EXTINTOS E SEUS VESTÍGIOS, p. 85
6.4.1	<u>Descrição e contribuições dos estudos</u> , p. 86
6.4.1.1	Coprólitos e sedimentos p. 86
6.4.1.2	Fósseis em rocha p. 91
6.4.1.3	Tecido p. 92
6.4.1.4	Osso p. 93
6.4.1.5	Âmbar p. 94
6.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS, p. 97
7.	CONCLUSÃO , p. 98
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS , p. 100
9.	APÊNDICES , 112
9.1	QUADRO COM A APRESENTAÇÃO RESUMIDA DOS RESULTADOS DA REVISÃO DE LITERATURA – PARASITOS DE ANIMAIS EXTINTOS (PARASITOS DE VERTEBRADOS), p. 112

9.2 QUADRO COM A APRESENTAÇÃO RESUMIDA DOS RESULTADOS DA REVISÃO DE LITERATURA – PARASITOS DE ANIMAIS EXTINTOS (PARASITOS EM ÂMBAR), p. 117

9.3 QUADRO COM A APRESENTAÇÃO RESUMIDA DOS RESULTADOS DA REVISÃO DE LITERATURA – PARASITOS DE ANIMAIS EXTINTOS (PARASITOS DE INSETOS EM ÂMBAR), p. 119

10. ANEXOS, p. 121

10.1 ISENÇÃO DO PROJETO COM AMOSTRAS ANTIGAS PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – ANEXO 1, p. 121

10.2 CARTA DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO – ANEXO 2, p. 123

10.3 PARECER TÉCNICO FORNECIDO PELA EMPRESA ‘HELIXXA – GENOMICS SERVICE PROVIDER’ - ANEXO 3, p. 125

10.4 “FINDING THE UNEXPECTED: A CRITICAL VIEW ON MOLECULAR DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES IN ARCHAEOLOGICAL SAMPLES” – ANEXO 4, p. 131

10.5 MINI-REVISÃO: “THE HISTORY OF EVOLUTION OF LIFE ON EARTH TOLD BY PALEOPARASITOLOGY” – ANEXO 5, p. 135

10.6 CAPITULO 6 (E-BOOK): “PRINCIPAIS DIFICULDADES ENCONTRADAS NO TRABALHO COM DNA PARASITÁRIO ANTIGO” – ANEXO 6, p. 139

1. INTRODUÇÃO

O mundo está repleto de parasitos e microorganismos que podem causar doença, e estes existem há milhões de anos, no entanto sabemos muito pouco da sua origem e evolução (POINAR, 2014).

Desde o surgimento da paleoparasitologia a maior parte dos achados são relacionados a populações humanas, isso se dá pelo grande interesse de arqueólogos e paleopatologistas na área. A partir destes achados várias extrapolações puderam ser feitas a respeito de migrações pré-históricas, evolução das sociedades e sua cultura. (SIANTO et al., 2014; FERREIRA et al., 2011).

No entanto, existem muitas oportunidades de estender a pesquisa para outros animais, especialmente considerando o desenvolvimento de novas técnicas moleculares (DITTMAR, 2009). Pouco se tem estudado sobre parasitos de animais em amostras antigas, e menos ainda em amostras de animais extintos, principalmente quando as técnicas moleculares são consideradas. Porém infecções têm sido evidenciadas em animais extintos pelo emprego de diferentes técnicas. Através da microscopia óptica, feita a partir de coprólitos dessecados ou mineralizados, já foram encontrados vestígios de parasitos de animais como preguiças terrícolas (RINGUELET, 1957; SCHMIDT et al., 1992), dinossauros (POINAR JR; BOUCOT, 2006; SILVA et al., 2014) e até tubarões pré-históricos (DENTZIEN-DIAS et al., 2013). O imunodiagnóstico também tem sido empregado no estudo desses animais, detectando por método imunoenzimático, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) parasitos como *Giardia* sp. em coprólito de *Palaeolama* sp. datado do Pleistoceno superior (SILVA, 2013), e *Cryptosporidium* sp. em coprólitos de caprinos de 4.959±38 anos AP (Antes do Presente) (NUNES et al. 2016). A análise anatomopatológica de fósseis ósseos já revelou feições compatíveis com infecção causada atualmente por protozoários em aves (WOLFF et al., 2009). Ainda, a partir de uma resina vegetal chamada âmbar já foram evidenciados muitos parasitos datados de milhões de anos atrás (i.e. POINAR JR, 2007; 2005; 2011), esses achados, juntamente com outras áreas da ciência como palinologia, paleontologia e a geologia, fornecem informações paleoecológicas e paleoclimáticas, que ajudam a reconstruir um pouco da história da vida na Terra.

Essa perspectiva aumenta quando métodos moleculares podem ser empregados às amostras antigas, pois além de permitirem a identificação de organismos outrora não identificáveis por outras técnicas, permitem a comparação direta com infecções atuais. Em

amostras humanas o uso das ferramentas moleculares já promoveu uma série de resultados dentro da paleoparasitologia. Já se diagnosticou o protozoário *Trypanosoma cruzi* a partir de ossos e tecidos de múmia de Minas Gerais de 4.500 - 7.000 anos atrás (LIMA et al., 2008), em coprólitos e conteúdo de latrinas medievais inúmeros parasitos já foram identificados, dentre vários parasitos sistêmicos que já foram detectados em tecidos mumificados (GONÇALVES et al., 2003, FRÍAS et al. 2013).

Contudo, embora as técnicas moleculares estejam sendo cada vez mais implementadas no estudo de material antigo, é pouco empregada em amostras de animais, além disso esbarra em algumas dificuldades importantes como a fragmentação do material genético, sua baixa concentração, o grande risco de contaminações com DNA moderno, e muitas vezes há pouca quantidade de material disponibilizado para estes estudos, dada a sua raridade, por isso a necessidade de muitos cuidados de execução. Assim, faltam também estudos em modelos experimentais que otimizem o uso de amostras raras.

Sobre as possibilidades de se estudar parasitos em animais extintos, a América do Sul foi o continente com a maior taxa de extinção, perdendo mais gêneros da megafauna do que qualquer outro (52, 83%) (BARNOSKY; LINDSEY, 2010), o Brasil, portanto, é um país com enorme potencial dispondo de muitos sítios paleontológicos do Norte ao Sul do país (SCHOBENHAUS et al., 2002).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PALEOPARASITOLOGIA

A paleoparasitologia é o estudo de parasitos em material antigo (FERREIRA et al., 2008). Sua presença pode ser detectada em coprólitos (do grego copros = fezes; litos = pedra), que se preservam em geral por um processo de mineralização ou dessecação (ARAÚJO et al., 2003), mas também em âmbar, em restos de tecidos moles, ossos, sedimento, cabeleiras, vestimentas, dentre outros materiais (FERREIRA et al., 2011).

O primeiro relato de parasitos em material antigo se deu no início do século XX por Sir Marc Armand Ruffer, ele identificou ovos de *Schistosoma haematobium* nos rins de múmias egípcias (RUFFER, 1921).

A partir da década de 60 técnicas de reidratação de coprólitos dessecados, utilizando solução de fosfato trissódico a 0,5% possibilitaram uma melhor análise dos mesmos por técnicas parasitológicas clássicas (CALLEN & CAMERON, 1960). Posteriormente a utilização de ácido clorídrico a 10% para coprólitos mineralizados possibilitou o estudo de espécimes ainda mais antigos (JONES, 1982). Coprólitos são materiais ricos e podem fornecer informações tanto sobre os microorganismos circulantes do passado como também sobre componentes de dieta, portanto sobre a vegetação e elementos faunísticos do local e época, além, é claro, de hábitos intrínsecos aos indivíduos estudados. Além do conteúdo, os coprólitos também podem agregar informações sobre comportamento. No oeste da Argentina foram encontradas grandes latrinas comunitárias provenientes do triássico médio-tardio (ca. 235 milhões de anos) e atribuídas ao megaherbívoro não-mamífero dicinodonte sugerindo que este comportamento gregário, típico de mamíferos, não é exclusivo (FIORELLI et al., 2013).

Voltando a paleoparasitologia, um outro material que já revelou parasitos de datações extremas é o âmbar, esta resina produzida por plantas endurece quando exteriorizada apreendendo diversos insetos, e também parasitos associados a eles (BRAZIL; FILHO, 2011).

Os ossos também são importantes fontes de estudo para a paleoparasitologia, existem microorganismos como *Trypanosoma* spp., *Leishmania* spp., *Mycobacterium tuberculosis*., *Hepatozoon* spp. e muitos outros que não são eliminados nas fezes mas mantêm-se circulantes ou em tecidos e dificilmente serão identificados se não por meio de espécimes ósseas ou teciduais. Por exemplo, para uma múmia humana do Brasil, encontrada com uma formação

fecal muito grande na pelve, coincidente com a patologia do megacólon característica da tripanossomíase americana, teve o diagnóstico confirmado com a utilização da biologia molecular, identificando o DNA do parasito *Trypanosoma cruzi* em fragmento ósseo (FERNANDES et al., 2008).

As técnicas moleculares surgiram e foram adaptadas para a pesquisa em diferentes materiais, e constituem importante ferramenta no diagnóstico de muitas doenças infecciosas em populações pré-históricas (ARAÚJO et al., 2003). Assim, tanto técnicas mais simples como a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) convencional, quanto técnicas mais refinadas usando sequenciamentos de nova geração que tem levado a pesquisas metagenômicas com fauna extinta, estão abrindo novas perspectivas de estudo na área. Como por exemplo, a recuperação de grande parte do genoma de mamute da Eurásia datado de 27.740 ± 220 (14C) anos antes do presente (AP), através do PCR de emulsão, onde mostrou-se que aquele mamute se relacionava mais ao elefante africano do que ao asiático (POINAR et al., 2006).

Outros métodos que vem sendo usados com material antigo na paleoparasitologia são os imunológicos. Dessa forma está sendo possível detectar, além do organismo inteiro, fragmentos da parede e ainda proteínas secretadas unicamente por esses organismos (MITCHELL et al., 2008). Através de Kits imunológicos de ELISA já foi possível detectar protozoários em coprólitos de animais extintos como, *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. (NUNES et al., 2016; SILVA, 2013).

Contudo, embora o Brasil tenha um dos grupos de pesquisa mais consolidados na área de Paleoparasitologia, este material ainda tem sido pouco explorado, faltam principalmente trabalhos na área molecular.

2.2 DNA ANTIGO

Um conceito abrangente sobre aDNA (do inglês *ancient DNA*) o define como qualquer vestígio ou traço de DNA proveniente de um organismo morto ou partes deste, assim como o DNA extracorpóreo (WIEGMANN, 1996).

Higuchi e colaboradores (1984) foram os primeiros a recuperar sequências de aDNA de animal extinto. Tratava-se de uma amostra de músculo dessecado pertencente a uma espécie extinta no ano de 1883, *Equus quagga*. Dos muitos clones obtidos foram recuperados apenas dois fragmentos de 229pb (pares de base) de mtDNA (DNA mitocondrial) que diferiam em 12

nucleotídeos do mesmo fragmento pertencente a zebra da montanha sugerindo a existência de um ancestral comum entre eles (HIGUCHI et al., 1984).

Após a morte de um organismo o DNA começa a ser degradado por nucleases endógenas, microorganismos, e mesmo em condições ideais de preservação, como rápida dessecação, congelamento, baixa concentração de O₂ ou baixa acidez, a degradação continua lentamente por oxidação, hidrólise e outros fatores. Com base nesses processos, embora seja assunto controverso, especialistas da área determinaram que o aDNA pode ser recuperado de espécimes de até 1 milhão de anos (FULTON, 2012). Assim o aDNA pode apresentar vários estágios de degradação estando fragmentado (100 a 500pb) e em baixas concentrações. Portanto, muitas vezes utiliza-se o DNA mitocondrial que se preserva melhor que o DNA nuclear, por características endógenas e pelo maior número de cópias (DITTMAR, 2011).

O advento da PCR possibilitou amplificações rotineiras de até mesmo uma única molécula de DNA, porém trouxe associado uma maior sensibilidade à contaminação com DNA moderno, tendo como consequência o principal problema nessas pesquisas os resultados falso-positivos. No entanto, avanços recentes tem melhorado os padrões de pesquisa com aDNA tornando-a viável (WILLERSLEV; COOPER, 2005). Com o objetivo de minimizar os riscos de contaminação algumas condutas são recomendadas, porém não existem critérios únicos e não é sempre que todos os requisitos descritos podem ser adotados, principalmente no Brasil onde faltam investimentos em infraestrutura, necessitando que os achados sejam relacionados e justificados. Abaixo uma lista de critérios para autenticidade de resultados moleculares com aDNA modificados de Cooper e Poinar (2000):

1. Área física isolada – toda pesquisa com aDNA deve ser feita em ambiente isolado e específico para trabalho com DNA antigo.
2. Todas as etapas de ensaio molecular devem ser preferencialmente feitas em ambientes separados: a) uma área para recebimento, pré-tratamento e descontaminação da amostra se necessário. b) uma área para extração do aDNA e preferencialmente dentro de câmara de segurança biológica/fluxo laminar. c) área para realização do mix da PCR; d) área para colocar o DNA no mix da PCR; e) sala para corrida eletroforética dos produtos amplificados e fotodocumentação dos resultados. e) área para purificação dos produtos amplificados.

3. Controles negativos – utilizar controles durante extração e PCR, e quando disponível usar o controle coletado no campo para detectar contaminações esporádicas. Nunca usar controles positivos pois são potenciais fontes de contaminação. Além disso, recomenda-se relatar todas as contaminações ocorridas.
4. Comportamento molecular apropriado – O poder da PCR deve ser inversamente proporcional ao tamanho do fragmento produzido (produtos maiores que 500-1000 pares de bases não são usuais). As sequências devem manter sentido filogenético. Recomenda-se o uso de alvos multi-cópias e o uso de Taq polimerase de alta fidelidade. Um critério adicional a ser adotado é tentar amplificar o DNA alvo usando-se *primers* que amplificam produtos maiores que 500pb, o mesmo não deve amplificar se de fato o DNA parasitário for endógeno/antigo.
5. Reprodutibilidade – Os resultados devem ser passíveis de reprodução a partir do mesmo ou de extrato diferente do espécime.
6. Clonagem – Sequências diretas de DNA devem ser verificadas por clonagem para determinar a relação de sequências endógenas e exógenas, e erros induzidos por danos. Fragmentos sobrepostos são desejáveis para confirmar se tais variações na sequência são autênticas e não produtos de erros ocorridos quando a amplificação começa de um pequeno número de modelos danificados. A clonagem também é uma estratégia utilizada para aumentar a quantidade de alvos disponíveis e obtenção de sequências de melhor qualidade. Contudo, alguns pesquisadores consideram que não há necessidade da clonagem, sendo o sequenciamento direto suficiente para análise.
7. Replicação independente – Contaminação intra-laboratorial só pode ser descartada quando amostras separadas do espécime são extraídas e sequenciadas em laboratórios independentes. Isso é particularmente importante para vestígios humanos e quando ocorrem resultados não esperados.
8. Preservação bioquímica – Evidências indiretas da preservação do DNA antigo em um espécime podem ser conseguidas pela avaliação da quantidade total, composição e extensão relativa de mudanças diagenéticas em aminoácidos e outros resíduos.

Mais recentemente, o sequenciamento de nova geração está se apresentando como uma possível ferramenta para o estudo do DNA antigo já que geram fragmentos de sequências de até 400pb (KHAIRAT et al., 2013).

2.3 IMUNODIAGNÓSTICO

Os métodos de imunodiagnóstico tem se mostrado promissores para trabalhos com material antigo. Deelder e colaboradores (1990) detectaram antígeno de *Schistosoma haematobium* em tecido de duas múmias egípcias pelo ELISA, mostrando que essa é uma técnica possível de ser utilizada nesse tipo de material que foi datado de pelo menos 3.200-5.000 anos. Em outro estudo com o mesmo método foi possível detectar os protozoários *Entamoeba histolytica* e *Giardia duodenalis* em material de latrinas do século XIII de um hospital (Hospital de St. John) situado na cidade do Acre, atual Jerusalém, Israel. Esta datação é condizente com a época das grandes cruzadas em que escritos relatam a ocorrência frequente de surtos de diarreia entre os soldados (MITCHELL et al. 2008).

A importância do teste imunoenzimático é descrito pelo autor pela dificuldade de se detectar cistos de protozoários intactos pela microscopia, enquanto o imunodiagnóstico permite que mesmo os fragmentos sejam capazes de apontar a positividade nas amostras, tornando o teste ideal para o estudo de material antigo dessecado (MITCHELL et al., 2008). Métodos de imunodiagnóstico também tem sido empregados para o estudo de personalidades históricas como a detecção de malária falciparum em membros da Família de Médici (FORNACIARI et al., 2010). No entanto, em recente revisão feita por Frías e colaboradores (2013) sobre protozoários em material antigo, nota-se que embora um dos métodos mais usados seja o imunodiagnóstico, novamente quase a totalidade dos estudos é realizada com material de origem humana. Ainda que existam pesquisas com material de animais extintos e estas tenham se mostrado promissoras como a detecção dos protozoários *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* sp. em coprólitos caprinos e *Giardia* sp. de camelídeos pelo método ELISA (NUNES et al., 2016; SILVA, 2013), pode-se dizer que essas pesquisas são ínfimas se comparadas ao que é produzido a partir de material humano.

2.4 MEGAFUNA E OUTROS ANIMAIS DO BRASIL COM POTENCIAL PARA PALEOPARASITOLOGIA MOLECULAR

A extinção da megafauna ocorrida no quaternário extinguiu dois terços dos gêneros de mamíferos e metade das espécies que pesavam mais de 44 kg, tendo ocorrido entre 50.000 a 3.000 anos atrás. Há muitas teorias sobre como e porque ocorreu, dentre estas, duas hipóteses são recorrentes na literatura científica: a) à época da megafauna, a espécie humana muitas vezes co-habitou os mesmos espaços, sendo assim, alguns autores sustentam que o crescimento

demográfico humano tenha contribuído em parte para sua extinção em determinados continentes apresentando graficamente esta relação (BARNOSKY, 2008); b) outros autores propuseram que primordialmente mudanças climáticas ocorridas durante o processo sejam as principais causas da extinção da Megafauna (LORENZEN et al., 2011).

Sabe-se que a América do Sul foi o continente com a maior taxa de extinção, perdendo mais gêneros da megafauna do que qualquer outro (52; 83%) e que a maioria das perdas ocorreram no final do Pleistoceno (2,588 milhões e 11,5 mil anos atrás) (BARNOSKY; LINDSEY, 2010)

No Brasil a megafauna começou a ser descoberta com as escavações paleontológicas do dinamarquês Peter Lund em meados do século de 1800 e anos mais tarde foi fundamental no processo de identificação dos animais da megafauna do Brasil o Prof. Carlos de Paula Couto do Museu Nacional-RJ, tendo inclusive publicado um tratado de Paleomastozoologia. Portanto, o Brasil é detentor de um rico acervo da megafauna extinta, como gliptodontes (tatu-gigante), preguiças terrícolas, tigre-dente-de-sabre, palaeolamas, dentre tantos outros (CARTELLE, 1994). Além da Megafauna extinta, são também ricos os vestígios, como ossos e coprólitos, de outros animais ainda com representantes atuais, como felinos de pequeno, grande e médio porte, pequenos roedores como os mocós (*Kerodon rupestris*), dentre outros que também co-existiram com a megafauna extinta e a população humana (BERGQVIST; ALMEIDA, 2004). Priorizou-se a decrição daqueles animais que tiveram amostras disponibilizadas para essa dissertação.

2.4.1 Preguiça Terrícola

Apesar da ampla distribuição que as preguiças tiveram nas Américas (Phyllophaga, Xenarthra) quase todas foram extintas. Durante o Pleistoceno tardio, pelo menos 19 gêneros dentro das famílias Nothrotheriidae, Mylodontidae, Megatheriidae, e Megalonychidae viveram no continente americano, a maioria das espécies sendo muito grandes (chegando a pelo menos 3.000 kg para as maiores como o *Megatherium americanum*) e principalmente terrestres. As únicas espécies de preguiças sobreviventes foram duas do gênero *Choloepus* e três do gênero *Bradypus* que são pequenas (4-8kg) e arborícolas de florestas tropicais (STEADMAN et al., 2005). Trabalhos de filogenia vêm tentando estabelecer uma ligação entre as preguiças terrícolas do quaternário e as preguiças arborícolas existentes hoje em dia (GREENWOOD et al., 2001).

Nos últimos 60 anos pesquisadores vem tentando definir e diferenciar as espécies de *Eremotherium* descritas nas Américas, muita discussão foi feita acerca dos achados baseando seus argumentos nos caracteres morfológicos encontrados. Porém, Cartelle e De Luliis (1995, 2006) demonstraram que todos os vestígios de Magatheriine assinalados a *Eremotherium* em discussão, representavam uma única espécie, *E. laurillardi* Lund, 1842.

Porém, não há relatos de pesquisa de parasitos em ossos de preguiça extintas, sendo este um campo da ciência inédito a ser explorado. Animais da ordem Pilosa, como as preguiças, tem uma longa história de co-evolução com tripanossomatídeos, incluindo espécies de *Leishmania* spp., e *Tripanosoma* spp., importantes por seu caráter zoonótico, além do pouco estudado *Endotrypanum* sp. (ROQUE; JANSEN, 2014). Lembrando que esses animais coexistiram com a espécie humana no continente sul americano, isto foi evidenciado por marcas em ossos de costela e clavícula de preguiça extinta do gênero *Lestodon* provenientes de Arroyo Vizcaíno, Uruguai, associadas a ação humana (ARRIBAS¹ et al., 2001 Apud FARIÑA; CASTILLA, 2007).

Existem no Brasil muitos ossos de preguiças extintas distribuídos em Instituições de diferentes Estados, como por exemplo, na Fundação Museu do Homem Americano no Piauí, Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro-RJ, Complexo Cultural e Científico de Peirópolis – Universidade Federal do Triângulo Mineiro-MG, dentre muitas outras, o que permitiria também o estudo não só do genoma do hospedeiro, como de hemoparasitos. Quanto à análise de coprólitos de preguiças extintas, existem alguns trabalhos voltados para dieta onde foram empregadas técnicas de Biologia Molecular (POINAR et al., 1998). Porém, em relação a parasitos intestinais, até o momento, apenas dois artigos neste tema foram encontrados, Ringuelet (1957) descreve ovos semelhantes aos de nematódeos em coprólito de *Myloodon histai*, uma espécie de preguiça já extinta, proveniente da Patagonia chilena, além de outros elementos de origem vegetal e mineral. Schmidt e colaboradores (1992) estudaram coprólitos de preguiça *Nothotheriops shastensis*, encontrada em caverna (Rampart cave) no Arizona, Estados Unidos, datados de 11.000 anos, por microscopia óptica, onde descrevem ovos parecidos com *Schistosoma* spp., e ovos parecidos com de toxocarídeo, oocistos não esporulados, aos quais atribui-se provavelmente a *Eimeria* spp., formas juvenis de nematoides,

¹ARRIBAS, A., PALMQVIST, P.; PÉREZ-CLAROS, J. A.; CASTILLA, R.; VIZCAÍNO, S. F.; FARIÑA, R. A. New evidence on the interaction between humans and megafauna in South American. *Publicaciones del Seminario de Paleontología de Zaragoza*, 5:228-238, 2001.

as quais denominou-se *Agamofilaria oxyura* n. sp. e *Strongyloides shastensis* n. sp., dois morfotipos de oocisto de coccídeos *Archeococcidia* n. gen. (nome dado a estruturas de qualquer tamanho formato e aparência que não são esporulados e que vem de material seco, petrificado ou mumificado e não pode ser alocado em gênero pela sua idade), identificados como: *Archeococcidia antiquus* n. sp. (também não pode ser alocado em gênero, porém tem alguma definição própria) e *Archeococcidia nothrotheriopsae* n. sp.

No Município de Morro do Chapéu (BA), mais especificamente na Gruta dos Brejões, foi encontrado um coprólito atribuído à extinta preguiça-terrícola (*Nothrotherium maquinense*). Este coprólito foi datado em 12.200±120 anos radiocarbônicos antes do presente (CZAPLEWSKI; CARTELLE, 1998), o estudo deste material pela biologia molecular permitiria identificar possíveis enteroparasitos, itens de dieta, paleovegetação e outras informações relevantes.



Figura 1: Reconstrução da preguiça terrícola *Nothrotherium maquinense* (disponível em: <http://detetivesdopassado.colecionadoresdeossos.com/2014/04/nothrotherium-maquinense-uma-pequena.html>)

2.4.2 Palaeolama sp.

Estudos de fósseis indicam que foi uma espécie de lhama gigante, cerca de duas vezes o tamanho das lhamas atuais, que habitou o território brasileiro desde aproximadamente 1,8 milhões de anos atrás. Pertencem ao grupo dos camelídeos, juntamente com os camelos (*Camelus bactrianus*), dromedários (*Camelus dromedarius*), guanacos (*Lama guanicoe*),

lhamas (*Lama glama*), vicunhas sul americanas (*Vicugna vicugna*) e alpacas (*Vicugna pacos*) (CARTELLE, 1994).

Parasitos encontrados em camelídeos existentes e extintos podem conter diferenças morfológicas, interessantes para o estudo evolutivo, mas também sua simples detecção pode influenciar o entendimento sobre a história das doenças, relacionando com as populações humanas de caçadores e coletores que tiveram contato com estes animais e que os tinham como importante recurso seja como alimento ou utilizando sua carcaça. Fugassa e colaboradores (2008) encontraram oocistos de *Eimeria*, atribuídos a *E. macusaniense*, específico de camelídeos da América do Sul, em coprólitos e sedimentos de sítios arqueológicos (de até 10.000 AP) do Pleistoceno na Patagônia, comparando com oocistos encontrados do médio Holoceno os do Pleistoceno possuíam maiores dimensões, gerando a hipótese de adaptação a mudanças climáticas que ocorreram durante esse período.

Em estudo prévio, Silva (2013) detectou, através de ensaio imunoenzimático, o protozoário intestinal *Giardia duodenalis* em um coprólito de *Palaeolama* sp. do Brasil pertencente ao Pleistoceno superior, recuperada do Morro do Chapéu, BA. Atualmente este protozoário tem sido amplamente estudado devido ao seu caráter zoonótico, sendo que somente a técnica molecular é capaz de identificar isolados com este caráter. Sendo assim, uma ferramenta importante para o estudo em coprólitos desse animal.



Figura 2: Reconstrução de *Palaeolama* (disponível em: <https://alchetron.com/Palaeolama-3977349-W>)

2.4.3 Felinos

No Brasil também há um rico acervo de coprólitos de animais dentre eles felinos, os quais estão depositados na coleção de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca-Fundação Oswaldo Cruz (ENSP-Fiocruz), nos quais uma grande gama de parasitos tem sido detectados pela microscopia óptica. Entre os anos de 1983 a 1987 Janette Lima encontrou no sítio arqueológico da Furna do Estrago-Pernambuco, coprólitos com datação de 1.540 a 1.680 AP. Posteriormente estes foram identificados como de felinos. Duarte (1994) descreveu *Panthera onca*, *Felis concolor*, *Felis tigrina*, *Felis pardalis* e *Felis wiedii* como os felinos silvestres atuais presentes na região, portanto espécies possíveis de corresponderem aos coprólitos encontrados. Nos coprólitos acima referidos foram identificados ovos similares aos da família Echinostomatidae (SIANTO et al., 2016), Freire 2015, tentou confirmar esse diagnóstico por método molecular, mas este não foi possível. Recentemente outros parasitos foram identificados em coprólitos de felídeos no nordeste brasileiro, Sianto e colaboradores (2014) descrevem: ovos de trichurídeos, *Spirometra* sp., *Toxocara cati*, *Calodium* cf. *hepaticum*, Oxyuridae Tipo 1 e Tipo 2, *Physaloptera* sp., *Oncicola* sp. e larvas de Nematoda, estes foram identificados através de microscopia óptica após reidratação com fosfato trissódico a 0,5% e sedimentação espontânea de coprólitos datados de 9.150±60 anos a 410±40 AP. Vilarroel (2013) através de imunodiagnóstico identificou *Giardia duodenalis* em coprólitos de felinos de 3 sítios arqueológicos do Brasil, Sítio do Meio e Toca dos Coqueiros no Piauí, e Toca do Morcego (PI, Brasil). A autora tentou a confirmação do Imunodiagnóstico pela biologia molecular, mas não obteve êxito.

Todos esses parasitos e inconsistências de resultados segundo as diferentes metodologias empregadas, mostra a importância da continuidade e mais pesquisas com coprólitos de felinos.



Figura 3: Foto de *Panthera onca* (disponível em: http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/carnivoros/on%C3%A7a-pintada_Panthera_onca.pdf)



Figura 4: Reconstrução de um Tigre-dente-de-sabre (disponível em: <https://mundoprehistorico.blogspot.com.br/2009/12/tigre-dente-de-sabre.html>)

2.4.4 Outros animais

Há no Brasil, e principalmente na coleção de Paleoparasitologia da ENSP-Fiocruz, outros coprólitos de animais, tanto típicos e endêmicos de determinadas regiões, como o *Kerodon rupestris* (popularmente conhecido como mocó, restrito à região de Caatinga no nordeste do Brasil) quanto aqueles de ampla distribuição geográfica, como *Cerdocyon thous* (cachorro do mato) que poderiam prover valiosas informações para Paleoparasitologia.



Figura 5: Foto de *Kerodon rupestris* (mocó) (disponível em: <http://chc.org.br/acrobatas-rupestres/>)



Figura 6: Foto de *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) (disponível em: <http://www.procarnivoros.org.br/2009/animais1.asp?cod=21>)

2.5 PARASITOS DE IMPORTÂNCIA NA PALEOPARASITOLOGIA MOLECULAR DA MEGAFUNA E DE OUTROS ANIMAIS DO BRASIL

2.5.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi, o agente etiológico da doença de Chagas, é um parasito enigmático. Além de ser uma espécie altamente heterogênea (pelo menos seis subpopulações bem definidas reconhecidas), *T. cruzi* é capaz de parasitar quase todos os tecidos de centenas de espécies de mamíferos hospedeiros e ser transmitido por várias espécies de vetores triatomíneos em todos os biomas desde a região sul da América do Norte até a região sul da Argentina (FERREIRA et al., 2011). Outro aspecto da biologia de *T. cruzi* é a existência de múltiplos mecanismos de transmissão: transfusional, congênita, oral e por contaminação da pele e membranas mucosas com as fezes de triatomíneos contendo as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes do parasito. Assim, este parasito possui um ciclo de transmissão complexo na natureza, e provavelmente, através do tempo, humanos tiveram contato com o parasito em diferentes ocasiões e por diferentes rotas, dependendo principalmente de como interagem com o meio ambiente (ARAÚJO et al., 2009).

Desde a década de 90, a discussão sobre a evolução de *T. cruzi* tem sido dominada pela hipótese do supercontinente que sugere que *T. cruzi* emergiu de tripanossomas que foram isolados em mamíferos terrestres do novo mundo desde a quebra continental que incluiu Austrália, Antártica e América do Sul há aproximadamente 40 milhões de anos. Porém outras

hipóteses têm surgido como a de que *T. c. cruzi* foi originalmente um parasito de morcegos e que subsequentemente migrou para mamíferos terrestres (HAMILTON et al., 2012).

Através da biologia molecular foi possível identificar o parasito *T. cruzi* em múmias humanas. Guhl e colaboradores (1997, 1999) começaram os estudos moleculares em múmias do deserto do Atacama, no Chile, conseguindo isolar o DNA do parasito de tecidos mumificados datados de 4.000 AP. Em 2000, foi feito PCR em tecidos da cavidade abdominal de seis múmias chilenas do *Museo Arqueologico de San Pedro de Atacama* datadas de 2.000 anos AP, das quais quatro mostraram positividade para o protozoário *T. cruzi* (FERREIRA et al., 2000).

Primeiramente acreditava-se que a infecção em humanos na América do Sul havia se iniciado a partir da domesticação de alguns animais que por consequência teriam trazido o triatomíneo vetor mais próximo as habitações, porém, em 2004 o isolamento do DNA de *T. cruzi* de múmias Chinchorro datadas de 9.000 AP (AUFDERHEIDE et al., 2004) mostrou a ocorrência da infecção muito antes da domesticação de camelídeos e roedores (ARAUJO et al., 2009).

No Brasil o DNA do parasito foi identificado a partir de fragmentos ósseos e de tecidos moles de múmia encontrada no vale do Rio Peruaçu, Minas Gerais, datada de 560±40 anos atrás (FERNANDES et al., 2008). Outro estudo no mesmo sítio arqueológico também identificou o protozoário *T. cruzi* em múmia humana datada de 4.500-7.000 anos atrás por PCR (LIMA et al., 2008). Isso mostra que o parasito já infectava humanos no Brasil antes do período colonial e a expansão das habitações de “pau a pique”, que possibilitam boas condições para a colonização dos insetos vetores, propiciaram o aumento da ocorrência desse parasito no país (ARAUJO et al. 2009)

2.5.2 *Toxoplasma gondii*

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário cosmopolita que infecta mamíferos e aves, apesar disso sua variação genética é baixa e variações geográficas praticamente ausentes, consistindo de três linhagens (I, II e III) com raras recombinações entre elas. Sendo cinco populações sul americanas representando alta diversidade enquanto as demais, diversidade moderada (LEHMANN et al., 2006). Sua transmissão se dá de forma congênita, por carnivorismo e fecal-oral (DUBEY, 2008). Os hospedeiros definitivos são membros da família

Felidae nos quais após uma primeira fase assexuada nas células epiteliais do intestino delgado ocorrerá a fase sexuada e formação de oocistos não esporulados que serão dispersados no ambiente através das fezes. No ambiente ocorrerá então a esporogonia levando ao desenvolvimento da forma infectante do oocisto. Os hospedeiros intermediários podem se infectar de diferentes formas, pela ingestão dos oocistos esporulados provenientes de contaminação ambiental, pela ingestão dos cistos teciduais presentes em carne crua ou mal cozida de outros hospedeiros ou pela transmissão transplacentária (congênita) dos taquizoítas (que também podem ser transmitidos pelo leite de cabra, ovos crus entre outros). De qualquer forma taquizoítas são liberados e se multiplicam repetidamente em diferentes tipos celulares. Então formarão cistos teciduais contendo bradizoítas. Esses cistos têm alta afinidade por tecido muscular e neural, sendo localizados principalmente no sistema nervoso central, olhos e músculos esqueléticos e cardíacos (TENTER et al., 2000). Ainda que se pondere que principalmente felinos jovens possam eliminar oocistos de *T. gondii* em suas fezes, ou em casos excepcionais de imunocomprometimento na vida adulta, este protozoário é pouco explorado na paleoparasitologia, o estudo do seu DNA permitiria não só a identificação do parasito, mas até mesmo a comparação com genótipos atuais, ainda que com a análise de pequenos fragmentos.

Até o momento a discussão sobre a origem e dispersão deste parasito abrange duas hipóteses conflitantes. De um lado amplo estudo amostral demonstra que a infecção teria tido origem na América do Sul e teria se dispersado com as migrações transatlânticas comerciais de escravos para outras regiões através de roedores e gatos onde teria se espalhado rapidamente por causa da alta taxa de eliminação de oocistos, essa linhagem que teria se dispersado, não teria retornado à América do Sul por causa das linhagens já instaladas no continente (LEHMANN et al., 2006). Outro lado se contrapõe a essa hipótese ao afirmar que estudos, relativos a taxa de mutação, teriam mostrado que linhagens da América do Norte são mais antigas que as da América do Sul e que as diferenças que definem cada região são calculadas numa estimativa de 1-2 milhões de anos para um ancestral comum, acrescentando ainda que esse intervalo de tempo coincide com a re-conexão da ponte do Panamá depois da separação de mais de 50 milhões de anos. É estimado que nesse mesmo período de tempo, membros da família dos gatos migraram da América do Norte para América do Sul e subsequentemente passaram por rápida especiação. Assim linhagens da América do Sul se isolaram e sofreram deriva genética. Obtendo maior diversidade do que linhagens da América do Norte (SIBLEY; AJIOKA, 2008). Porém, apesar de cosmopolita ainda são raros os achados deste parasito em

material antigo, até o presente apenas um trabalho foi capaz de fazer esta identificação, através do sequenciamento de nova geração, Khairat e colaboradores (2013) evidenciaram fragmentos do genoma do parasito *Toxoplasma gondii* a partir de tecidos de múmias humanas.

2.5.3 Triatomíneo

Os triatomíneos são um grupo de diferentes espécies de insetos vetores do *Trypanosoma cruzi*. Muitas vezes os animais, ao se coçarem ou se lamberem, podem ingerir o inseto, que é hematófago, juntamente com as fezes dos mesmos, nesse caso existiria a possibilidade de seu DNA ser detectado nos coprólitos de animais. A identificação de DNA do inseto vetor em algum coprólito ainda que na ausência de DNA de *T. cruzi* já indicaria uma potencial rota de transmissão do protozoário pela ingestão do vetor entre os animais no passado, uma vez que tripanossomatídeos vêm sendo identificados em âmbar datado de milhões de anos no continente sul americano (POINAR JR, 2005). Ou ainda que sua detecção nos coprólitos não configurasse uma rota de transmissão de importância epidemiológica indicaria sua circulação naquele ambiente mostrando que se o vetor está presente, o protozoário também poderia circular. A pesquisa por atropodes em coprólitos pela biologia molecular é um campo pouco explorado pela Paleoparasitologia, sendo a maior parte dessas identificações ainda feitas pela morfologia.

2.5.4 Giardia sp.

Giardia duodenalis (sin. *G. lamblia* e *G. intestinalis*) é um dos parasitos mais comuns de humanos, mas também de outros animais. Sua transmissão é via fecal-oral, e seu ciclo inclui excitação no duodeno, colonização e multiplicação com trofozoítas na superfície da mucosa do intestino delgado, com posterior produção de cistos que são liberados e disseminados no ambiente através das fezes. A infecção pode ser assintomática, mas também produzir sintomas como diarreia, cólicas abdominais, flatulência, má absorção, esteatorreia, perda de peso e outros (VERWEIJ; STENSVOLD, 2014).

Espécies do gênero *Giardia* infectam vários hospedeiros abrangendo mamíferos, anfíbios e aves. Atualmente seis espécies são aceitas no meio científico, *G. agilis*, *G. ardeae*, *G. muris*, *G. microti* e *G. psittaci* infectando vários animais, enquanto *G. duodenalis* infecta humanos e muitos mamíferos e sendo dividida em genótipos que vão de A-H. Deles, A e B são considerados zoonóticos e os outros espécie-específicos C e D (canídeos), E (artiodactilos), F (felinos), G (roedores) e H (vertebrados marinhos) (FENG; XIAO, 2011).

A detecção de cistos de protozoários a partir de amostras antigas é difícil pois, diferente de algumas espécies de helmintos, são estruturas frágeis e pouco resistentes às condições tafonômicas aos quais o material ficou submetido ao longo dos anos. Além disso, a variação na excreção de cistos diária que ocorre na infecção por *Giardia*, diminui a sensibilidade de exames convencionais aos coprólitos, e até mesmo em fezes frescas é comum a ocorrência de falsos negativos. Desta forma, a combinação de diferentes testes pode aumentar as possibilidades na detecção de amostras positivas. Quanto a antígenos, podem permanecer detectáveis por longos períodos a partir de testes imunológicos como imunofluorescência indireta, demonstrado por Faulkner e colaboradores (1989) em coprólitos de 2.177 anos, anticorpo monoclonal fluorescente e ELISA demonstrado por Allison e colaboradores (1999) em coprólitos de 500 a 3.000 anos (GONÇALVES et al. 2002). Em animais extintos, Silva (2013) testou amostras de coprólitos de *Palaeolama* sp. datados do Pleistoceno Superior através do método de ELISA observando positividade para *Giardia* em uma delas, embora na microscopia isso não tenha se confirmado. Assim como Frías (2013) também detectou coproantígenos desse protozoário em coprólitos animais do Brasil, mas não obteve o mesmo êxito com o diagnóstico molecular. O que mostra que mais estudos paleoparasitológicos para pesquisa da giardíase ainda são necessários.

2.5.5 Outros parasitos

Eimeria sp. é um coccídeo monoxeno, espécie específico, que possui uma fase assexuada e uma fase sexuada no hospedeiro, na fase sexuada o parasito invade o tecido epitelial do intestino delgado e/ou grosso causando lesões. O protozoário ainda precisa de uma fase exógena para a esporulação dos oocistos que demora cerca de 2-7 dias dependendo da espécie. Os oocistos esporulados são bastante resistentes podendo sobreviver de meses a anos no meio ambiente, no entanto em condições extremas de dessecação e temperaturas menores -30° C e maiores de 63° C não sobrevivem. Os sintomas consistem em diarreia e consequente perda de peso e desidratação, acredita-se que o parasito promove uma modificação da microbiota do intestino do hospedeiro levando a um agravamento dos sintomas (CHARTIER e PARAUD, 2012). A especificidade das espécies de *Eimeria* a seus hospedeiros permitiram a inferência de alguns autores sobre os achados paleoparasitológicos. *E. macusaniense* encontrada em coprólitos de roedor, no sítio Orejas de Burro I, Argentina, datado de 3.720-3.978 anos AP, foi atribuído a contaminação do ambiente em que os coprólitos estavam circundados por restos de camelídeos (FUGASSA e BARBERENA, 2006). Da mesma forma, em estudo com coprólitos

de felinos, coletados de sítio arqueológico Cerro Casa de Piedra, Patagônia (Argentina) e datados de 6.540 ± 110 AP, pesquisadores também encontraram, entre outros parasitos, *Eimeria macusaniense*, portanto atribuíram esse achado a predação de camelídeos (FUGASSA et al., 2009). Ainda em outro estudo no mesmo sítio arqueológico (Cerro Casa de Piedra) dois coprólitos atribuídos provavelmente a humanos, datados de 3.480 e 2.740, foram analisados e foram encontrados também a mesma espécie de *Eimeria*, e novamente o achado foi atribuído ao consumo de vísceras de camelídeos (BELTRAME et al., 2010). Importante ressaltar que espécies de camelídeos extintos, *Lama gracilis* e *Palaeolama* sp. já tiveram seus vestígios recuperados de sítios arqueológicos da Patagônia (FUGASSA et al., 2008).

Pentatrichomonas hominis é um protozoário simbiótico encontrado em vertebrados e considerado uma das formas mais primitivas dos organismos eucariotos. Habita o intestino grosso de uma série de hospedeiros mamíferos como gatos, cães, porcos e primatas não-humanos. Apesar de comensal, um crescimento mais acentuado pode levar a diarreia (KIM et al., 2010). Existia uma discussão sobre qual agente seria o causador de diarreia crônica em gatos, *P. hominis* ou *Trichomonas foetus*, após estudos experimentais se tornou unanime que o causador dessa patologia era *T. foetus* (MOSTEGL et al., 2012). Porém, as chances do seu encontro em coprólitos são aumentadas pelo fato de *P. hominis* ser comensal, o que pode trazer à luz aspectos evolutivos importantes.

3. JUSTIFICATIVA

A paleoparasitologia pode fornecer informações sobre ecologia, dinâmica populacional, doenças em populações pré-históricas e processos evolutivos intrínsecos na relação parasito-hospedeiro (WOOD et al., 2013), mas também estabelecer relação entre espécies extintas e atuais. Existem poucas publicações relacionadas às espécies que foram estudadas no presente trabalho principalmente para recuperação de DNA antigo, portanto o emprego de técnicas moleculares ao estudo dos fósseis vai contribuir para o aprofundamento das pesquisas na área. O surgimento de trabalhos que utilizam testes imunológicos para a detecção de parasitos em amostras antigas vem trazendo resultados importantes para a área, alguns desses testes são rápidos e de fácil execução e necessitam de pouca quantidade de material podendo servir, inclusive, como um método de triagem para protocolos mais complexos, portanto a utilização desses testes adquire um valor especial quando se trata de amostras raras como é o caso das utilizadas pela paleoparasitologia.

4. OBJETIVOS

Geral:

Paleoparasitologia molecular e imunológica de megafauna e de outros mamíferos encontrados em sítios arqueológicos e paleontológicos do Brasil.

Específicos:

- Pesquisar DNA de hospedeiro, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* pela técnica de PCR em amostras ósseas de preguiça terrícola.
- Pesquisar DNA de *Toxoplasma gondii* em coprólitos de felinos.
- Pesquisar DNA de triatomíneo em coprólitos de felinos, canídeo e mocós.
- Pesquisar DNA de *Giardia duodenalis* em coprólito de *Palaeolama* sp. com ensaio prévio em modelos experimentais.
- Pesquisar DNA do hospedeiro em coprólito de *Palaeolama* sp. com base em sequências de lhamas modernas com ensaio prévio em coprólitos experimentais de *Lama glama*.
- Fazer um levantamento de todo o aDNA disponível em coprólito de preguiça terrícola através de ensaio metagenômico.
- Testar o diagnóstico molecular para *Eimeria* sp. e *Pentatricomonas* sp. em amostras recentes positivas para esses protozoários, para posterior aplicação da técnica em modelos experimentais e amostras antigas.
- Testar o emprego do diagnóstico imunocromatográfico para *T. gondii* em modelos experimentais e material antigo.
- Testar o emprego do diagnóstico imunocromatográfico para *Giardia duodenalis* em modelos experimentais e material antigo.

- Avaliar o potencial de reaproveitamento de amostras usadas nos testes moleculares e imunocromatográficos.

- Realizar uma revisão abrangente sobre os achados parasitários em espécimes de animais extintos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAS

5.1.1 Descrição das amostras antigas

a) Fragmento de coprólito de preguiça terrícola *Nothorotherium maquinense*, de 12.200±120 anos (datação por radiocarbono), encontrado no município de Morro do Chapéu, mais especificamente na Gruta dos Brejões, Bahia. Amostra coletada na década de 80 e cedida ao Dr. Adauto Araújo pelo professor Cástor Cartelle da Universidade PUC- MG, que por sua vez cedeu ao Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos da UFF para análise, código na coleção de Paleoparasitologia ENSP-Fiocruz: A121. Essa amostra foi previamente analisada pela microscopia óptica e não foram observadas estruturas parasitárias (informação passada por Gleisse Nunes, uma das responsáveis pela coleção de Paleoparasitologia ENSP-Fiocruz).

b) Coprólitos de felinos de diversas localidades, identificadas pelos códigos da coleção de Paleoparasitologia da ENSP-Fiocruz: A848 (Sítio do Meio, PI – 9.150±60 AP); A1670 (Toca dos Coqueiros, PI – 8.870±60 AP); A1590 (Toca do Morcego, PI – 9.200 AP); e amostras provenientes do Sítio Furna do Estrago, PE, A739a e A739b (1.040±50AP); A743 (1.040±50 AP); A829a (1.610±70AP); A841a, A841b, A841c e A841d (1.610±70AP). Todas estas amostras fizeram parte de trabalhos anteriores em que o DNA extraído não havia sido esgotado (VILLARROEL, 2013; FREIRE, 2015), portanto, usou-se o DNA já extraído.

c) Coprólito de canídeo: identificadas pelos códigos na coleção de Paleoparasitologia da ENSP-Fiocruz como A1633 (Toca dos Coqueiros, Piauí – 8.870±60AP). Este foi usado em estudo anterior (FRÍAS, 2013), portanto, também foi usado DNA já extraído.

d) Coprólitos de roedores: identificadas pelos códigos na coleção de Paleoparasitologia da ENSP-Fiocruz como A351 (Boqueirão da Pedra Furada, Piauí – 7.230±80AP); A359 (Boqueirão da Pedra Furada, Piauí – 8.170±80AP); A1172D e A1192 (Toca da Baixa dos Caboclos, Piauí – 400 ± 50AP); A768 (Toca de Cima dos Pilões, Piauí – 2.290±60AP); A773 (Sítio Antônio, Piauí – 9.670±140AP); A1580 (Toca do extrema II, Piauí – 4.730±110AP). Todas estas amostras também haviam sido usadas em trabalho prévio (FRÍAS, 2013), portanto, foi usado DNA já extraído.

e) Coprólito de *Palaeolama* sp. e sedimento: identificados pelo código na coleção de Paleoparasitologia da ENSP-Fiocruz como A364 e A520 (Gruta dos Brejões, Morro do Chapéu, BA – Pleistoceno superior ~125.000-10.000AP). A amostra A364 já havia mostrado positividade para *Giardia duodenalis* em teste imunoenzimático -ELISA (SILVA, 2013).

f) Amostras ósseas de costela de uma preguiça terrícola, identificada como do gênero *Eremotherium*, datada de 30.000 a.C, proveniente da Serra da Capivara, sítio Lagoa dos Porcos, Piauí, e cedida pela Fundação Museu do Homem Americano (FUMDHAM). As amostras retiradas da costela foram coletada pela Dr^a Marcia Chame e trazidas para coleção de Paleoparasitologia da ENSP-Fiocruz, que as disponibilizou para este estudo. Foram usadas 5 sub-amostras dessa mesma preguiça (183753-6, 185875, 185878, 185880-1). Parte destas amostras já haviam tido seu DNA extraído para pesquisa de *Leishmania* sp. e foram negativas. Optou-se nesse estudo por usar o DNA já extraído.

As informações sumarizadas sobre estas amostras estão dispostas no quadro 1.

Quadro 1: Amostras antigas ósseas e de coprólitos, segundo código, tipo, animal, sítio e datação, utilizadas no presente estudo.

N°	Código	Tipo	Animal	Sítio	Datação	Laboratório de origem	
1	A121	Coprólito	<i>Nothorotherium maquinense</i> (Lund) Lyderkker, 1889	Gruta dos Brejões, Morro do Chapéu, BA	12.200±120 anos	Cástor Cartelle (Museu PUC-MG)	
2	183753-6 (SPG1)	Medula óssea de costela	<i>Eremotherium</i> sp.	Lagoa dos Porcos, PI	30.000 a. C.	FUMDHAM	
3	185875 (SPG2)						
4	185878 (SPG3)						
5	185880-1 (SPG4)	Medula óssea (não da costela)					
6	185880-1 (SPG5)						
7	A1670	Coprólito	Felídeo	Toca dos Coqueiros, PI	8.870±60 AP	Coleção do Laboratório de Paleoparasitologia do Departamento de Ciências Biológicas da ENSP-FIOCRUZ	
8	A1633		Canídeo				
9	A848		Felídeo	Sítio do Meio, PI	9.150±60 AP		
10	A773			Sítio Antônio, PI	9.670±140 AP		
11	A359	Coprólito + sedimento	Roedor	Boqueirão da Pedra Furada, PI	8.170±80 AP		
12	A351				7.230±80AP		
13	A1172 D				Toca do Baixão dos Caboclos, PI		400±50AP
14	A1192						
15	A768				Roedor		Toca de Cima dos Pilões, PI
16	A1590	Coprólito	Felídeo	Toca do Morcego, PI	9.200AP		
17	A1580		Roedor	Toca do Extrema II, PI	4.730±110 AP		
18	A739a		Felídeo	Sítio Furna do Estrago, PE			1.040±50AP
19	A739b						
20	A743						
21	A829a						
22	A841a						
23	A841b						
24	A841c						
25	A841d						
26	A364	Coprólito + sedimento	<i>Palaeolama</i> sp.	Gruta dos Brejões, Morro do Chapéu, BA	Pleistoceno superior		
27	A520b						

a.C=Antes de Cristo; AP=Antes do Presente

5.1.2 Descrição das amostras modernas usadas como controle e/ou para confecção dos modelos experimentais

As amostras modernas utilizadas no presente estudo foram cedidas por pesquisadores e/ou utilizadas em estudos anteriores. A descrição das mesmas e o respectivo objetivo da sua utilização estão discriminados no quadro 2.

Quadro 2: Amostras modernas, segundo código, tipo, hospedeiro, descrição e objetivos, utilizadas no presente estudo.

Nº	Código	Tipo	Hospedeiro	Descrição	Origem	Objetivo
1	-	Fezes frescas	Felídeo	Positivo para <i>T. gondii</i> pela microscopia	Cedidas pela Dra. Maria Regina Reis Amendoeira-IOC/Fiocruz	Controle positivo para posterior confecção de um coprólito experimental
2	-	DNA extraído a partir de lavado peritoneal	Camundongo	Positivo para toxoplasmose com cepa RH	Cedidas pela Dra. Maria Regina Reis Amendoeira-IOC/Fiocruz	Controle positivo nas PCRs para <i>T. gondii</i>
3	-	DNA extraído a partir de sangue	Felídeo	-	Coleção de parasitologia da UFF	Controle positivo da PCR para o hospedeiro felino
4	-	Fezes frescas	Lhama	-	Cedida pelo Riozoo	Testar os <i>primers</i> para o hospedeiro
5	-	Saliva	Lhama	-	Cedida pelo Riozoo	Testar os <i>primers</i> para o hospedeiro
6	E1	Fezes	Humano	Positiva para <i>G. duodenalis</i> , pertencente ao Genótipo B3	Guapimirim, Rio de Janeiro (ALVES, 2016)	Usada para testar o <i>kit</i> imunocromatográfico e avaliar a viabilidade de reaproveitamento de amostras
7	103	DNA já extraído	Bovino	Suspeita de <i>Eimeria</i> sp. (PALMEIRA, 2012)	Coletadas e cedidas por Priscila Fajardo da Universidade Estadual de Londrina-Paraná para coleção de parasitologia da UFF	Analisar a viabilidade de uma padronização para o seu diagnóstico em coprólitos experimentais e posteriormente no material antigo
8	Boneca		Ovino			
9	Boneca	Fezes	Ovino	Positiva para <i>G. duodenalis</i> genótipo E		
10	HP21	Fezes	Humana	Positiva para <i>G. duodenalis</i> , genótipo A	Usada por Uchôa (2017)	Testar o <i>kit</i> imunocromatográfico
11	-	Fezes	Felídeo	Positiva para <i>G. duodenalis</i> , genótipo F	Pertencente a coleção de parasitologia da UFF	Testar o <i>kit</i> imunocromatográfico
12	-	Fragmento de costela	Camundongo	Infectado com <i>T. gondii</i>	Cedida por Dra. Maria Regina Reis Amendoeira (LELES et al., 2016b).	Controle positivo no teste imunocromatográfico
13	57	Fezes	Felídeo	Positiva para tritricomonadídeo suspeita de ser <i>Tritrichomonas foetus</i>	Município do Rio de Janeiro cedido por Bethânia Bastos, aluna do doutorado em Clínica e Reprodução Animal-UFF	Analisar a viabilidade de uma padronização para o diagnóstico de <i>Pentatrichomonas hominis</i> em coprólitos experimentais e posteriormente no material antigo*
14	54	Cultura de fezes	Felídeo	Suspeita de estar positiva para <i>Tritrichomonas foetus</i>	Cedida por Bethânia Bastos	Usar como um possível controle positivo para pesquisa de <i>Pentatrichomonas hominis</i> **

* Trofozoítas de *T. foetus* podem ser confundidos com os de *P. hominis*, que por sua vez é um microorganismo comensal do intestino de mamíferos (GOOKIN et al., 2007).

** A especificidade de muitas culturas de *T. foetus* são questionáveis podendo haver crescimento de *P. hominis*, que por sua vez é um microorganismo comensal do intestino de mamíferos (GOOKIN et al., 2007).

5.1.2.1 Coprólitos experimentais

Afim de reproduzir as condições em que se encontram as amostras antigas dessecadas (coprólitos), confeccionou-se coprólitos experimentais a partir de amostras modernas através da dessecação em estufa a 44°C. Do dia 22/03/2017 ao dia 20/04/2017 as amostras modernas selecionadas foram colocadas na estufa às 9h da manhã e a mesma era desligada às 17h da tarde todos os dias exceto nos finais de semana ou seja, foram 22 dias, até que os pesos não variassem mais. Os coprólitos experimentais foram confeccionados tanto para os ensaios moleculares quanto testes imunocromatográficos. Foram feitas alíquotas de diferentes quantidades, e em alguns casos em duplicata para se testar modificações no protocolo, sugerido pelo fabricante dos kits imunocromatográfico, e também para o teste de reaproveitamento de amostras. A discriminação das amostras usadas e condições dos ensaios serão descritas nas sessões em que os experimentos serão melhor detalhados.

5.2 ENSAIOS MOLECULARES

5.2.1 Extração do DNA das amostras antigas de animais extintos

a) Coprólito de preguiça terrícola *Nothotherium maquinense*:

A extração foi feita em capela de fluxo laminar do Laboratório de Citogenética do CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório) – FIOCRUZ, local onde não são realizadas outras extrações, para evitar possíveis contaminações que poderiam ocorrer no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Antes de iniciarmos a extração todas as bancadas e o interior da capela foram higienizadas com álcool 70% e solução DNAZap™ PCR DNA Degradation Solutions (Invitrogen™) além de cobertas com papel autoclavado. Todos os tubos utilizados foram autoclavados e os fornecidos pelo kit já eram estéreis. Utilizamos toucas, máscaras e luvas estéreis sem talco, evitando ao máximo contaminação com DNA exógeno.

Foram feitas duas alíquotas com 300mg do coprólito cada e com cada alíquota o processo de extração foi o mesmo. Adicionou-se aproximadamente 270µl de água nuclease *free*. A mistura foi incubada em banho seco a 37°C por 45 minutos (homogeneizando a cada 10 minutos). Então a amostra passou por um choque térmico que consistiu em banho seco a 94°C por 2 minutos seguido de imersão em nitrogênio líquido por 30 segundos, esta etapa foi repetida três vezes, com a finalidade de romper possíveis estruturas parasitárias como ovos de helmintos, cistos e oocistos de protozoários e liberar o seu DNA.

Seguiu-se então a extração com o kit de extração QIAmp® DNA Stool Mini Kit, com as seguintes modificações: na etapa de incubação após a adição do Buffer AL ela foi feita a 65°C por duas horas. E a etapa de eluição foi feita em 50µl para um microtubo e depois a mesma coluna foi transferida para outro microtubo e sofreu nova eluição de 50µl para evitar desperdício de material. Assim resultando em 4 tubos com produto extraído.

Após o processo de extração o produto ainda não estava límpido, portanto passou por um processo de purificação, que foi feito com o kit Ilustra™MGFZ™. Com as seguintes modificações: A adição do tampão tipo 3 foi de 250µl e eluição feita em 50µl. A extração foi acompanhada de controle negativo, que consistiu em um tubo com apenas água e que passou pelo mesmo processo que as amostras, inclusive a purificação.

O DNA total extraído dessa amostra foi encaminhado a empresa 'Helixxa - Genomics Service Provider' para ensaio metagenômico.

O resíduo de amostra com o primeiro tampão do kit de extração foi congelado, considerando-se que no futuro pudesse ser aproveitado em alguma análise por se tratar de uma amostra rara e valiosa.

b) Coprólito da *Palaeolama* sp.

A extração foi feita no laboratório de aula prática do Instituto Biomédico da UFF, onde não são realizados ensaios de biologia molecular, para evitar possíveis contaminações com *amplicons* ou DNA que poderiam ocorrer no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos, onde as amostras modernas são processadas.

Antes de iniciarmos a extração todas as bancadas utilizadas foram higienizadas com hipoclorito e álcool a 70% e coberta com papel autoclavado. Todos os tubos utilizados foram

autoclavados e os fornecidos pelo kit já eram estéreis. Utilizamos toucas, mascarar e luvas estéreis sem talco, evitando ao máximo contaminação com DNA exógeno.

Foram aliqotados 250µl de cada amostra (A364 e A520b), não foi acrescentada água nucleasse *free* pois as amostras já se encontravam úmidas, esse processo foi acompanhado por um controle negativo de extração (contendo 250µl de água estéril). Assim como o coprólito da preguiça terrícola, foi feito um choque térmico que consistiu em banho seco a 94° C por 2 minutos seguido de imersão em nitrogênio líquido por 30 segundos, esta etapa foi repetida três vezes, com a finalidade de romper possíveis estruturas parasitárias como ovos, cistos e oocistos e liberar o seu DNA.

Seguiu-se então a extração com o kit de extração QIAmp® DNA Stool Mini Kit, com as seguintes modificações: na etapa de incubação após a adição do Buffer AL ela foi feita a 65° C por duas horas. E a etapa de eluição, para cada amostra, foi feita em 50µl para um microtubo e depois a mesma coluna foi transferida para outro microtubo e sofreu nova eluição de 50µl para evitar desperdício de material. O controle negativo passou por apenas uma eluição de 100µl.

O resíduo que sobrou da primeira etapa da extração também foi armazenado para utilizar em uma análise posterior, considerando a raridade das amostras.

5.2.2 Extração do DNA das amostras modernas usadas como controles e/ou modelos experimentais

a) Amostra moderna de fezes de felino:

Também foi utilizado o mesmo kit de extração QIAmp® DNA Stool Mini Kit porém separado para amostras modernas. As condições da extração foram as mesmas citadas anteriormente com a diferença de que esta extração, por se tratar de amostra moderna, foi feita no Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos da UFF.

c) Amostras de fezes de lhama (Zoológico do Rio):

Para as fezes da lhama foi feita sedimentação espontânea (LUTZ, 1919) e coleta de 200µl de sedimento. Seguiu-se com o pré-tratamento que consistiu em um choque térmico (3 ciclos de 30'' hidrogênio líquido – 2' termociclador a 98° C) para depois utilizar o kit de extração QIAmp® DNA Stool Mini Kit, com as seguintes modificações: no passo 8 a incubação

com proteinase k foi feita a 60° C por 2 horas, no passo 3 utilizou-se a temperatura de 94° C por 5' + vortex e no passo 4 pipetou-se 25µl, ao final foram feitas duas eluições de 50 µl.

d) Saliva de lhama e cultura de tricomonadídeo:

O DNA foi extraído apenas com o choque térmico supracitado.

5.2.3 Alvos moleculares

Os alvos moleculares utilizados para cada amostra estão descritos no quadro 3 e 4 a seguir.

Quadro 3: Alvos moleculares utilizados para as amostras antigas

Amostra	Tipo	Organismo	Alvos	Combinação de primers / tamanho amplificado	Referências
Preguiça terrícola	Osso	Hospedeiro	Citocromo b	NScytbF1/R1 (344pb) NScytbF2/R2 (157pb) NScytbF3/R1 (366pb)	VILLARROEL, 2013
		<i>Trypanosoma cruzi</i>	Região intergênica do gene mini-exon	TC/TCI (350pb) TC/TCII (300pb)	SOUTO, 1996
			DNA ribossomal 18S	TCRUF/R (98pb)	<i>In house</i>
		<i>Toxoplasma gondii</i>	DNA nuclear ITS-1	TgNP1/2 (214pb) NN1/2 (356pb)	HURTADO et al., 2001
Felídeos	Coprólito	<i>Toxoplasma gondii</i>			<i>In house</i>
Roedor		Triatomíneo	Gene ribossomal 18S	TRIF/R (102pb)	
Canídeo		Triatomíneo			
<i>Palaeolama</i> sp.	Coprólito + sedimento	Hospedeiro	Citocromo b	LhacytbF1/R1 (488pb) LhacytbF2/R2 (128pb) LhacytbF2/R1 (588pb)	VILLARROEL, 2013
		<i>Giardia duodenalis</i>	Beta-giardina	b-giaF1/R1 (324pb) b-giaF1/R2 (147pb)	
			Gene glutamato desidrogenase	GiarF/R (~500pb) Gdh_H e Gdh_A (214pb)	

Quadro 4: Alvos moleculares utilizados para as amostras modernas

Amostra	Tipo	Organismo	Alvos	Combinação de primers /tamanho amplificado	Referência
Lhama	Fezes frescas	Hospedeiro	Citocromo b	LhacytbF1/R1 (488pb)	<i>In house</i>
	Fezes dessecadas			LhacytbF2/R2 (128pb)	
	Saliva			LhacytbF2/R1 (588pb)	
Humano (Código E1)	Fezes dessecadas	<i>Giardia duodenalis</i>	Beta-giardina	b-giaF1/R1 (324pb)	VILLARROEL, 2014; ALVES, 2016
				b-giaF1/R2 (147pb)	
Ovino (Boneca)	Fezes dessecadas	<i>Giardia duodenalis</i>	Gene glutamato desidrogenase	Gdh_H (214pb)	LEW et al., 2003; CEBRA et al., 2012
	DNA (previamente extraído)	<i>Eimeria</i> sp.	Gene ribossomal 18S	Gdh_A (214pb)	
Bovino (Código 103)	DNA (previamente extraído)	<i>Eimeria</i> sp.		Gene ribossomal 18S	EF1/ER1 (tamanho variável)
Felino	Fezes frescas (código 57)	<i>Pentatrichomonas hominis</i>	Gene ribossomal 18S		Th3/Th5 (339pb)
	Cultura de fezes (código 54)				

5.2.4 Descrição da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Destaca-se que para aquelas amostras em que foram utilizados o DNA já extraído, já se sabia que as mesmas não continham inibidores da PCR, sendo desnecessária essa verificação para essas amostras. Destaca-se que naquelas reações de PCR em que estão descritas amostras modernas juntamente com amostras antigas, estas foram feitas em ambiente separado, mas como a condição da PCR era a mesma mudando pequenos parâmetros optou-se por descrevê-las nas mesmas sessões.

5.2.4.1 PCR para o hospedeiro (preguiça terrícola)

- Amostra óssea (SPG-1, SPG-2, SPG-3, SPG-4, SPG-5):

Foram desenhados *primers* a partir de uma sequência do gene mitocondrial citocromo b de 648pb de preguiça terrícola da espécie *Nothrotheriops shastensis* depositadas no GenBank (número de acesso AF232015.1) (GREENWOOD, 2001). NScytbF1 (*forward*): 5'ACACCTGCCGAGACGTAAAC- 3' e NScytbR1 (*reverse*): 5'GTGAAAGGCGAAGAATCGGGT-3' que amplifica fragmento de 344pb; NScytbF2 (*forward*): 5' CACGCATTCATCGACCTACCA -3' e R2 (*reverse*): 5' GTGCAACGGATGAAAAGGCTG -3' que amplifica um fragmento de 157pb. Um outro *primer* F3 (*forward*): 5'CACAGCCTTTTCATCCGTTGC-3' foi associado ao *reverse*

NScytbR1, que amplifica 366 pb. A utilização de alvo para essa espécie se deu devido a disponibilidade no banco de sequências, mesmo não sendo a espécie descrita para a amostra consideramos a possibilidade de haver semelhança genética e uma possível confirmação da origem do material. A condição utilizada na PCR foi: tampão [1x]; Mg [2mM]; dNTP [0,2mM]; *primers* [200ng cada]; 2,5u taq platinum (invitrogen); 5µl de DNA. Para a PCR NScytbF1/R1 e NScytbF2/R2 utilizou-se ciclagem: 7'94°C; 45 ciclos [30''94°C, 30''55°C, 40''72°C]; 7'72°C. Para a combinação NScytb F3/R1 a ciclagem utilizada foi: 7'94°C; 45 ciclos [20''94°C, 20''55°C, 30''72°C]; 7'72°C. A reação foi acompanhada do controle negativo da extração e da PCR.

5.2.4.2 PCR para *Trypanosoma cruzi*

- Amostras ósseas preguiça terrícola (SPG-1, SPG-2, SPG-3, SPG-4, SPG-5)

Foram utilizados nas PCRs três *primers* descritos na literatura (SOUTO, 1996) que amplificam fragmentos de DNA da região intergênica do gene mini-exon de *T. cruzi*. TC (*reverse*): 5'CCCCCCTCCCAGGCCACACTG-3', TCI (*forward*): 5'GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3' e TCII (*forward*): 5'CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3'. Sendo o tamanho dos fragmentos TC/TCI de 350pb e TC/TCII de 300pb.

Também foi desenhado um par de *primers* com base em sequências de *T. cruzi* depositadas no GenBank que amplificam fragmento de DNA nuclear da região 18S do gene ribossomal que é multicópia, com tamanho de 98pb. TCRUF (*forward*): 5'AGCTGCCAGTAGGATTCAGAA- 3' e TCRUR (*reverse*): 5'CCGCAGAGAAGGATACAAGCG- 3'. A condição utilizada nas PCRs foram: tampão [1x]; Mg [2,5mM]; dNTP [0,2mM]; *primers* [200ng], 2,5u Taq platinum (invitrogen); 5µl de DNA. As ciclagens foram: TC-TC I e TC-TC II: 7'94°C; 45 ciclos [30''94°C, 30''55°C, 40''72°C]; 7'72°C e TCRUF/R: 7'94°C; 45 ciclos [20''94°C, 20''55°C, 30''72°C]; 7'72°C. A reação foi acompanhada do controle negativo da extração e da PCR.

5.2.4.3 PCR para *Toxoplasma gondii*

- Amostras ósseas da preguiça terrícola: SPG-1, SPG-2, SPG-3, SPG-4, SPG-5; coprólitos de felinos: A848, A1670, A1590; fezes modernas de felino positiva para *T. gondii* e lavado peritoneal (taquizoita) de camundongo experimentalmente infectado com *T. gondii*.

Usamos *primers* já descritos na literatura (HURTADO et al., 2001), que amplificam um fragmento de DNA nuclear de 214pb da região ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) a qual é multicópia. TgNP1 (*forward*): 5'-GTGATAGTATCGAAAGGTAT-3' e TgNP2 (*reverse*): 5'ACTCTCTCTCAATGTTTCCT-3'. A condição usada na PCR foi: Tampão [1x]; Mg [2mM]; dNTP [0,2mM]; *primer* [200ng de cada] (única diferença); 2,5U Taq platinum (Invitrogen); 5µl DNA. Ciclagem: 5'94°C; 45 ciclos [20''94°C, 20''55°C, 30''72°C]; 7'72°C. Também foi acompanhado um controle negativo da PCR.

- Coprólitos de felinos: Amostras não reidratadas A739a, A739b, A829a, A841a, A841b, A841d, amostras reidratadas A739a, A739b, A743, A841a, A841c), fezes modernas de felino positiva para *T. gondii* e lavado peritoneal (taquizoita) de camundongo experimentalmente infectado com *T. gondii*.

Trabalhou-se com o DNA já extraído dos coprólitos de felinos supracitados, tanto proveniente de coprólitos que passaram por reidratação com fosfato trissódico quanto de coprólitos que não passaram por esse passo, pois em trabalho prévio avaliou-se a real necessidade da adição dessa solução reidratante para ensaios moleculares (LELES et al., 2016a), portanto no nosso estudo tínhamos disponíveis para o estudo amostras reidratadas e não reidratadas e escolhemos utilizar ambas mesmo que fossem provenientes da mesma amostra. Usamos *primers* NN1/NN2 que amplificam um fragmento grande de 356pb da região ITS1 (18S-5.8S rRNA) do parasito *Toxoplasma gondii*: NNI (5'-CCITTGAATCCCAAGCAAACATGAG-3') e NN2 (5'-GCGAGCCAAGACATCCATTGCTGA-3'). Ciclagem: 5'94°C; 45 ciclos [30''94°C, 45''65°C, 70''72° C]; 7'72°C. Também foi acompanhado um controle negativo da PCR.

5.2.4.4 PCR para hospedeiro felino

- Fezes modernas de felino positiva para *T. gondii* e DNA extraído a partir de sangue de gato doméstico.

Para certificar que as amostras modernas testadas não estavam inibidas utilizamos um par de *primers* para o hospedeiro felino PCytb que amplifica um fragmento de 204pb da região do citocromo b de felino construído por Villarroel (2013) sendo PCytbF (*foward*) 5'-TGCAATCCTCCGATCCATCCCCA-3' e PCytbR (*reverse*) 5'-GGATGTTCTACGGGTTGGCCGC-3'. A condição usada na PCR foi: Tampão [1x]; Mg

[3mM]; dNTP [0,2mM]; primer [200ng], Taq. Platinum (invitrogen) 2,5U; DNA 5µl, sendo. Ciclagem: 5'94°C; 45 ciclos [20''94°C, 20''60°C, 30''72°C]; 7'72°C.

5.2.4.5 PCR para o inseto triatomíneo

- Coprólitos de felinos, canídeo e roedores (amostras A1670, A848, A773, A359, A1633, A1172D, A351, A768, A1590, A1192, A1580, A841c, A739a, A739b, A829a)

Usamos *primers* desenhados para amplificar um fragmento de 102pb da região do gene ribossomal 18S, de triatomíneos com base em um banco de sequências construído para esse estudo a partir de sequências depositadas no Genbank. TRIF (*foward*): 5' GGTGTA ACTGGCATGTCGCG 3' e TRIR (*reverse*): 5' CGGCCAACGGAAGTACACAC 3'. A condição usada na PCR foi: Tampão [1x]; Mg [2mM]; dNTP [0,2mM]; *primer* [200ng], Taq. Platinum (invitrogen) 2,5U; DNA 5µl, sendo 3µl dos controles negativos de extração. Ciclagem: 5'94°C; 45 ciclos [20''94°C, 20''60°C, 30''72°C]; 7'72°C. Sabe-se que a condição usada permitiria a amplificação de triatomíneos, pois um membro do grupo de pesquisa (Elisa Pucu de Araújo) validou esse ensaio em amostras modernas que fazem parte da sua tese de doutorado que está em andamento no programa PPGMPA-UFF.

5.2.4.6 PCR para *Eimeria* sp.

- Fezes frescas de bovino (103) e ovino (Boneca) positivas para coccídeo na microscopia

Essa amostra foi positiva para coccídeo porém a espécie não tinha sido identificada e *Eimeria* era uma suspeita (PALMEIRAS, 2012). Como algumas das amostras antigas que temos correspondem a coprólitos de *Palaeolama* sp. e, sabendo que este parasito já havia sido recuperado de amostras desses animais (FUGASSA et al., 2008) optamos por incluir esse parasito nas análises. Usamos *primers* desenhados por Lew e colaboradores (2002) que amplificam uma região nuclear entre genes ribossomais e que é multicópia ITS-1 (internal transcribed spacer 1), sendo EF1 (*foward*) 5' AAGTTGCGTAAATAGAGCCCTC 3' e ER1 (*reverse*) 5' AGACAT CCATTGCTGAAA G 3' e tendo tamanho variável dependendo da espécie de *Eimeria*, por exemplo *E. macusaniense* (233bp) e *E. lamae* (267bp) (CEBRA et al. 2012). A condição da PCR foi: Tampão [1x]; Mg [3mM]; dNTP [0,2mM]; *primer* [200ng], Taq. Platinum (invitrogen) 2,5U; DNA 5µl. Ciclagem: 5'95°C; 45 ciclos [30''94°C, 30''55°C, 30''72°C]; 5'72°C.

5.2.4.7 PCR para *Pentatrichomonas hominis*

Usamos *primers* desenhados por Gookin e colaboradores (2007) e utilizados por Kim e colaboradores (2010) que amplificam sequência do gene ribossomal 18S de 339bp, sendo: Th3 (*foward*) 5' TGTAACGATGCCGACAGAG 3' e Th5 (*reverse*) 5' CAACACTGAAGCCAATGCGAGC 3'. A condição da PCR foi: Tampão [1x]; Mg [3mM]; dNTP [0,2mM]; primer [200ng], Taq. Platinum (invitrogen) 2,5U; DNA 5µl. Ciclagem: 5'95°C; 50 ciclos [1'95°C, 1'64°C, 2'72°C]; 5'72°C.

5.2.4.8 PCR para o hospedeiro camélídeo

- Saliva, fezes frescas, coprólito experimental de lhama, coprólito de *Palaeolama* sp. (amostras A520b e A364)

Os *primers* foram desenhados com base em estudo a partir de sequências de lhamas modernas depositadas no Genbank. Os alvos amplificam fragmentos do gene mitocondrial citocromo b: LhacytbF1 (*foward*): 5' GTCGYGGGCTTTACTACGGC 3' LhacytbR1 (*reverse*): 5'GGGGTTAGCGGGRGTATAGT 3' para amplificar fragmento de 488pb; LhacytbF2 (*foward*): 5' CACACATCTGCCGAGACGTR 3' e LhacytbR2 (*reverse*): 5' GAAGGCGTAGGARCCGTAGT 3' de 128pb e uma *semi-nested* LhacytbF2/R1 de 588pb.

Foram testadas duas condições de PCR diferentes, variando a quantidade de magnésio: Tampão [1x]; Mg [4 mM ou 2mM]; dNTP [0,2mM]; *primer* [200ng], Taq. Platinum (invitrogen) 2,5 U; DNA 5µl. Para F1/R1 e F2 /R2 a ciclagem foi: 5'94°C; 35 ciclos [20''94°C, 40''55°C, 60''72°C]; 7'72°C. Para F2/R2 a ciclagem foi: 5'94°C; 35 ciclos [20''94°C, 20''55°C, 30''72°C]; 7'72°C. Para os coprólitos experimentais e coprólito o número de ciclos foi de 45.

5.2.4.9 PCR para *Giardia duodenalis*

- Ovino (Boneca): fezes frescas e coprólitos experimentais.

A amostra de ovino corresponde ao genótipo E, seria o genótipo mais provável de ser encontrado no coprolito de *Palaeolama* sp., portanto essas fezes foram usadas como controle nesse estudo para testar se os *primers* idealizados para antigo funcionariam nesta amostra. Porém, não se pode descartar o fato de no coprólito da palaeolama estarem presentes os genótipos zoonóticos A e B, assim também avaliaram-se outras condições. Esse ensaio foi baseado nos estudos prévios realizados por Vilarroel (2014).

Para o alvo Beta-Giardina, que corresponde a um gene conservado porém cópia única, foram utilizados para PCR primária os *primers* β -giaF1 (*foward*): 5'-TGAACCAGCGCGTCAGCAGG-3' e β -giaR1 (*reverse*) 5'-GGCGTCGTTTGGATGGCGA-3' de 324pb e para uma semi-nested PCR foram usados os *primers* β -giaF1 com β -giaR2 (*reverse*): 5'-GCCTGGCGCTTCCTCGACTC-3' de 147pb. Ciclagens: β -giaF1/R1: 5'94°C; 45 ciclos [30''94°C, 30''59°C, 30''72°C] 7'72°C e para β -giaF1/R2: 5'94°C; 35 ciclos [30''94°C, 30''61°C, 30''72°C] 7'72°C (VILLARROEL, 2014). Para o alvo multicópia Gdh (gene glutamato desidrogenase) para genótipos A e B foram utilizados os *primers*: Gdh_HF1 (*foward*) 5'-CTTCCGYGTBCCMTGGATGG-3' Gdh_HR1 (*reverse*)5'-RAAGTCGGAGCCGCCCTTRC-3'. E para os genótipos animais: Gdh_AF1 (*foward*) 5'-CTTCCGYGTBCCMTGGATGG-3' e Gdh_AR1 (*reverse*) 5'-RAAGTCRGAGCCRCCCTTGC-3' que amplificam fragmento de 214pb (VILLARROEL, 2014).

As condições usadas nas PCRs foram: β giaF1/R1: Tampão [1x], dNTP [0.2 mM]de magnésio [3 mM] primer [150 ng]; β giaF1/R2 e Gdh, Tampão [1x]; Mg [3mM]; dNTP [0,2mM]; primer [150ng], Taq. Platinum (invitrogen) 2,0U; DNA 5 μ l. A ciclagem para este alvo foi: 94°C5'; 45 ciclos [30''94°C, 30''59°C, 30''72°C] 7'72°C.

5.2.5 Cr terios de autenticidade

Como crit rios de autenticidade para o estudo com aDNA utilizamos: controles negativos de extra o e controles negativos das PCRs (consistem de tubos que passaram pelos mesmos processos de extra o e PCR por m sem conter a amostra em si, apenas  gua nucleasse *free* e os reagentes, dessa forma servindo como um sentinela, para poss veis contamina es no processo); extra o realizada em outro laborat rio onde n o se extraem e amplificam grandes quantidades de DNA moderno; montagem das PCRs e aplica o do DNA aos "MIXs" em  reas separadas entre si e separadas de onde se trabalha com DNA moderno; utiliza o de kits de extra o e purifica o exclusivos para material antigo; quando da utiliza o de  gua nuclease *free* sempre utilizada unicamente para cada rea o independente sendo a sobra sempre descartada ap s a utiliza o e nunca reutilizada; durante todos os trabalhos com material antigo foram utilizados equipamentos de prote o individual com a inten o de minimizar a contamina o das amostras: uso de luvas, m scaras, toucas e jalecos descart veis; utiliza o de produtos para descontamina o das bancadas e utens lios (solu o DNAZapTM PCR DNA

Degradation Solutions (Invitrogen™), álcool 70%, hipoclorito de sódio); utilização de papel autoclavado para cobrir as superfícies de trabalho; extração em capela de fluxo (para o coprólito da preguiça); utilização de luz germicida (UV) antes e após a utilização das capelas na extração e montagem das PCRs; utilização de ponteiros sempre com filtro e somente utilizadas para material antigo; tubos sempre previamente autoclavados. Quando possível, a inclusão de *primers* que amplificam fragmentos maiores que 500pb no intuito de rastrear contaminações.

5.2.6 Corrida eletroforética e purificação dos produtos amplificados

As corridas eletroforéticas em gel de agarose foram feitas a uma concentração de 2,3% a 2,2% dependendo do tamanho dos fragmentos. Foram aplicados 8 µl do produto da PCR com adição de 1,5 µl de corante (azul de bromofenol) para quase todas as amostras, exceto nos casos em que foi necessário sacar banda do gel, ou seja, recuperar aquele DNA que participou na corrida, onde todo o produto amplificado foi aplicado. Os marcadores utilizados foram de 50pb e 25pb da marca Promega. Para algumas corridas fez-se o uso de um peso molecular de 1kb. Ao fim da corrida o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador da marca L-PIX EX Loccus Biotecnologia.

Os kits utilizados para purificação das amostras, tanto para o sequenciamento quanto para retirar inibidores da reação (quando necessário) foram das marcas Illustra™ GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification Kit WIZARD® seguindo o protocolo do fabricante.

5.2.7 Edição e análise das sequências

Os produtos da PCR foram sequenciados em ambas as fitas em sequenciador automático 3100 Applied Biosystems como descrito pelo fabricante na plataforma de sequenciamento do MIP, Instituto Biomédico-UFF e em sequenciador 48-capilar PDTIS/FIOCRUZ. Os programas Chromas versão 1.45 (School of Health Science, Griffith University, Queensland, Austrália), 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 que então foram comparadas as depositadas no Genbank.

5.3 IMUNODIAGNÓTICO

Além dos ensaios moleculares citados anteriormente foram utilizados: um teste imunocromatográfico em cassete fabricado pela ECO Diagnóstica LTDA, desenvolvido para a detecção qualitativa de antígeno do *Toxoplasma gondii* (Toxo Ag) em amostras de fezes, plasma e soro animal. Também foi usado um outro teste imunocromatográfico em fita, fabricado pela mesma empresa, chamado *Giardia* Ecoteste, desenvolvido para detecção qualitativa de antígenos de *Giardia lamblia* (= *G. duodenalis*) em amostras de fezes humanas.

5.3.1 Amostras para o teste *Toxoplasma gondii*

- Amostras recentes positivas para *T. gondii*, provenientes de infecção experimental de camundongo foram usadas como controle, tanto amostras frescas como dessecadas no intuito de simular um processo de mumificação natural (essas amostras fizeram parte de um estudo prévio realizado por Leles e colaboradores 2016b). Ressalta-se que a época da realização deste teste, não tínhamos amostras de fezes de felinos positivos para *T. gondii* para análise. Assim foram usadas: a) Fragmento de costela dessecada em estufa (cepa RH); b) Costela dessecada em estufa (cepa ME49); e c) Costela camundongo fresca (cepa taquizoita) foi usada como controle positivo.

É importante ressaltar que essas amostras positivas foram manipuladas no Laboratório de coprodiagnóstico da Parasitologia da UFF fisicamente separado de onde foram feitos os ensaios com as amostras antigas.

- Amostras antigas: coprólitos de felinos referidas anteriormente para análise molecular (A739b, A743, A802g, A841c).

5.3.1.1 Metodologia do teste

Foi utilizado o protocolo sugerido pelo *kit* onde as amostras foram misturadas a um tampão diluente fornecido pelo *kit* e três a quatro gotas então adicionadas ao cassete, havendo algumas modificações:

Para os coprólitos antigos de felinos estes foram incubados em água nuclease *free* em banho seco por cerca de três a cinco minutos. Retirou-se então 200µl do tampão fornecido pelo *kit* no intuito de concentrar os antígenos.

Para as costelas de camundongo positivas utilizou-se a mesma metodologia anterior, porém utilizamos vortex para homogeneizar a amostra com o tampão.

5.3.2 Amostras para o teste *Giardia duodenalis*

Ressalta-se que o fabricante indica o teste para diagnóstico em amostras humanas, sendo assim foi necessário validar o teste em amostras frescas de animais e também humanas que foram usadas como controle, sabidamente positivas pela microscopia para esse protozoário e já previamente genotipadas pelo alvo B-giardina (LELES et al. 2013), antes de prosseguir com este ensaio nos modelos experimentais e amostras antigas.

- Amostras frescas: ovino (Boneca) genótipo E, Humana (E1) genótipo B, Humana (HP21) genótipo A, Felino (2) genótipo F.

- Amostras experimentalmente dessecadas: uma vez verificado a viabilidade do uso deste *kit*, foram selecionadas duas amostras para confecção do coprólito experimental e realização do teste, ovino (Boneca) e humana (E1), pois geraram um sinal mais forte e por estarem em quantidade suficiente para o estudo.

5.3.2.1 Metodologia do teste

Para as fezes frescas utilizou-se 100µl de amostra a qual foi adicionado 1ml do tampão fornecido pelo *kit*, a mistura foi homogeneizada através de vortex e após alguns minutos, quando as partículas decantaram 150µl foram pipetados para um novo tubo em que se colocou a fita para a observação do resultado.

Com o objetivo de verificar se um pré-tratamento nas amostras seria de efeito positivo foram feitas duas alíquotas de 100µl e duas de 200µl para cada amostra de ovino fresca, em que uma foi direto para o teste, segundo recomendações do fabricante e a outra passou pelo pré-tratamento, que consistiu em um aquecimento a 40°C por 10'. A intenção dos 40° C era de deixar em uma temperatura próxima a corporal e evitar desnaturação de proteínas com temperatura muito elevada. Após esse pré-tratamento seguiu-se com a metodologia descrita anteriormente.

A mesma avaliação foi feita para os experimentalmente dessecados de ovino, assim também foi avaliado se a quantidade de amostra e aquecimento interfeririam no rendimento do teste. Uma vez que fosse avaliado a melhor metodologia seria empregada nos coprólitos de *Palaeolama* sp. e preguiça terrícola.

5.4 TESTE PARA AVALIAÇÃO SOBRE REAPROVEITAMENTO DE AMOSTRAS

5.4.1 Amostras

Fezes frescas humanas (E1), Fezes dessecadas humanas (E1), Fezes frescas ovino (boneca), fezes dessecada de ovino (Boneca), Coprólito de preguiça terrícola (A121), Coprólitos de *Palaeolama* sp. (A520b e A364).

5.4.2 Metodologia

Para avaliar a possibilidade de se reaproveitar amostras testadas pelo método molecular no imunocromatográfico utilizamos a amostra E1 positiva para *Giardia*. Primeiramente utilizamos as fezes frescas, o seu DNA foi extraído através do *kit* QIAmp® DNA Stool Mini Kit segundo Alves (2016). O resíduo dessa extração consistiu numa mistura de fezes e o primeiro tampão utilizado. O excesso do tampão foi retirado com auxílio de uma pipeta automática e o resíduo que seria descartado foi então utilizado no *kit* imunocromatográfico para detecção de *Giardia duodenalis*. Adicionou 1ml do tampão do teste imunocromatográfico a 200µl do resíduo da extração do DNA, a mistura foi homogeneizada através de vortex e após alguns minutos, quando as partículas decantaram 150µl foram pipetados para um novo tubo em que se colocou a fita para a observação do resultado. Uma mesma alíquota dessa amostra foi transformada em um coprólito experimental e o mesmo procedimento foi realizado.

O inverso também ocorreu, mas esse teste foi realizado com a amostras do ovino (Boneca): 200µl de fezes frescas foram utilizadas no teste imunocromatográfico como descrito acima, e o que sobrou da fase de decantação foi separado do sobrenadante e submetido ao processo de extração do DNA e posterior PCR para detecção do DNA do parasito *Giardia duodenalis*. Os alvos e condições usadas foram as mesmas realizadas previamente para genotipagem dessa amostra, alvo B-giardina (PCR primária com os alvos G7/G759 e *nested* PCR Giar F/R), segundo Alves (2016). As amostras que passaram por este experimento foram sequenciadas. A itenção desse experimento foi averiguar se a reutilização da amostra promoveu alguma alteração nucleotídica ou se geraria sequências de baixa qualidade. Os mesmos procedimentos foram testados com uma alíquota da amostra que se transformou em um coprólito experimental.

Após obter êxito nos ensaios, a metodologia foi aplicada aos resíduos de extração do DNA que haviam sido armazenados dos coprólitos de preguiça terrícola (A121) e *Palaeolama* sp. (A520b e A364).

5.5 REVISÃO DE LITERATURA: PARASITOS EM ANIMAIS EXTINTOS E SEUS VESTÍGIOS

Na revisão foram usados os descritores: *parasites*, *extinct animals*, *coprolites*, *microorganisms*, *infectious disease*, *vertebrates*, *âmbar*, *paleoparasitology*, *archaeoparasitology* e também uma combinação entre eles usando os operadores AND ou OR na língua inglesa, os quais foram procurados nas bases de dados, pubmed, periódicos CAPES, Google scholar. E também busca ativa em revistas da área, livros, e nas próprias referências de alguns dos artigos utilizados. Não houve limite de data na busca.

5.6 ASPECTOS ÉTICOS

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UFF isentou de passar por avaliação projetos que trabalham com amostras animais antigas (ANEXO 1). A maior parte das amostras recentes usadas nessa dissertação são de trabalhos prévios com aprovação em seus respectivos comitês. Contudo, recentemente foi necessário a inclusão de uma amostra que não fez parte de trabalhos prévios (amostra de saliva e fezes de Lhama do Zoológico do Rio de Janeiro S/A – ANEXO 2), o CEUA já foi informado.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ENSAIOS MOLECULARES

6.1.1 Alvo molecular para hospedeiro preguiça terrícola (*Eremotherium* sp.)

Conforme demonstrado na figura 7, nenhuma das amostras amplificou o alvo no tamanho esperado e para duas amostras foi possível visualizar mesmo que não nitidamente uma amplificação (*lanes* 9 e 10 - assinalado em vermelho).

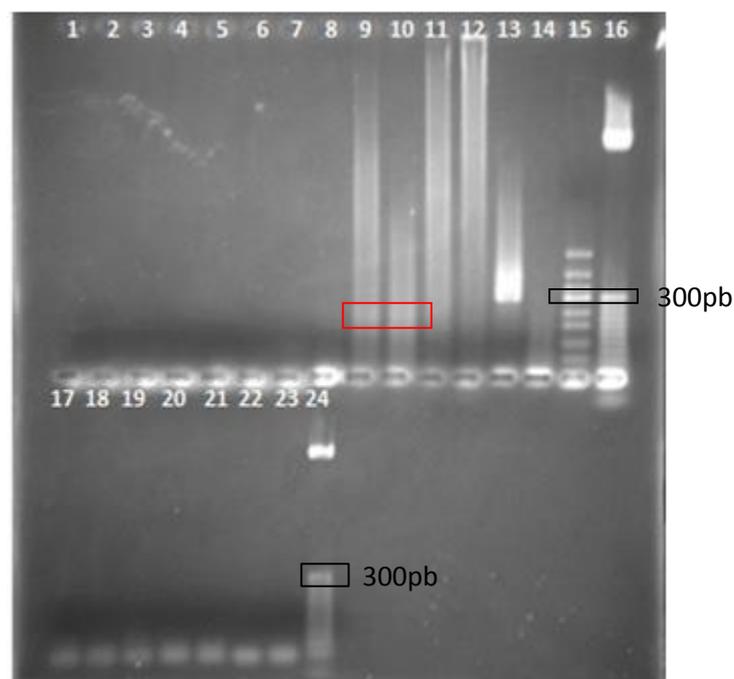


Figura 7: Corrida eletroforética para amostras ósseas de preguiça terrícola usando alvos para o hospedeiro (*Nothrotheriops shastensis*).

Legenda: Linhas 1a7 (NScytbF1/R1): 1- SPG1, 2- SPG2, 3- SPG3, 4-SPG4, 5-SPG5, 6- negativo da extração 7- negativo da PCR. Linhas 8 a14 (NScytbF3/R1): 8- SPG1, 9-SPG2,10-SPG3, 11-SPG4, 12-SPG5, 13- negativo da extração, 14- negative da PCR. Linha 15: marcador de 50pb.Linha16: marcador de 25pb. Linhas 17 a 23(NScytbF2/R2): 17- SPG1, 18- SPG2, 19- SPG3, 20- SPG4, 21- SPG5, 22- negativo da extração, 23- negativo da PCR. Linha 24: marcador de 25pb.

Apesar de ser possível visualizar as duas amplificações (*lanes* 9 e 10), muito DNA foi usado na *nested* PCR e ainda com a repetição usando menos DNA *template* a corrida eletroforética continuou com o mesmo padrão, por isso não foi feito o sequenciamento. Mais amostras deste material devem ser usadas para novas extrações com avaliação de outras

condições de PCR. Contudo, não se pode descartar o fato da sequência de DNA do hospedeiro depositada no Genbank ser diferente da amostra encontrada no Brasil, sendo assim os *primers* não hibridizariam no seu DNA, fato este que é difícil ser avaliado uma vez que não temos como usar um controle para o hospedeiro neste caso. Os *primers* foram desenhados a partir de sequências de preguiça terrícola da espécie *Nothrotheriops shastensis* depositadas no GenBank (número de acesso AF232015.1) (GREENWOOD, 2001), pois não há sequência disponível no Genbank para a espécie usada neste trabalho, assim mesmo não sendo a espécie descrita para a amostra consideramos a possibilidade de haver semelhança genética e uma possível confirmação da origem do material. Também não se pode descartar a possibilidade de não haver DNA do hospedeiro na amostra, devido a grande degradação inerente ao material antigo.

6.1.2 Alvo para *Trypanosoma cruzi*

Nenhuma das amostras amplificou para o alvo TC/TCII, e nenhuma amplificação foi visualizada nos controles negativos da extração e PCR.

Para o alvo TC/TCI nenhuma amplificação foi visualizada no controle negativo da extração, contudo foi visualizado amplificações inespecíficas no controle negativo da PCR.

Para uma das amostras (SPG3) foi observada uma amplificação na altura esperada de 350pb (figura 8, linha 3). Outras amplificações ainda que não na altura esperada para esse alvo foram obtidas nas amostras antigas. Dado a importância e raridade do material todas as amplificações foram sequenciadas a fim de determinarmos a origem deste DNA e principalmente se este é endógeno ou exógeno à amostra (figura 8). Também foi obtida uma amplificação para amostra SPG1 (linha 17) para o alvo "*in house*" TCRUF/R a qual embora não estando na altura esperada (cerca de 250pb) também foi sequenciada (figura 8). Porém, nem todas as sequências geradas tiveram qualidade suficiente para serem analisadas.

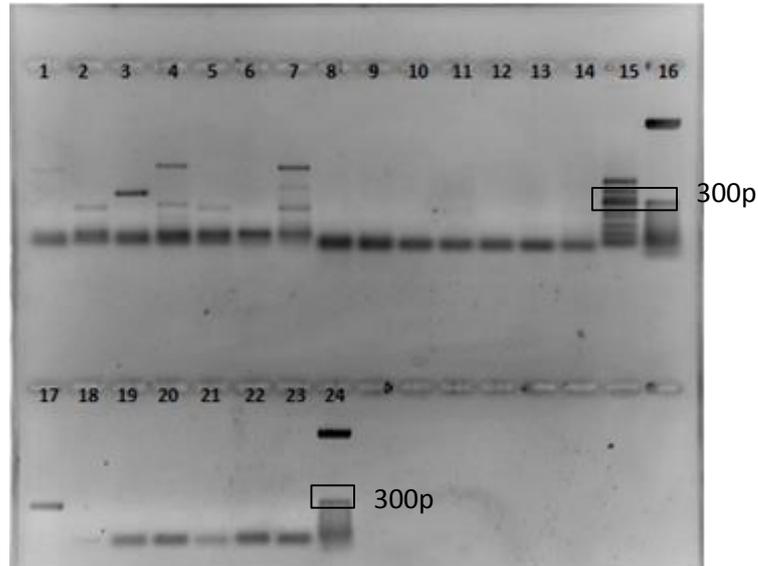


Figura 8: Corrida eletroforética para amostras ósseas de preguiça terrícola (*Eremotherium* sp.) usando alvos para *Trypanosoma cruzi*.

Legenda: Linhas 1 a 7 (TC/TCI): 1- SPG1, 2- SPG2, 3- SPG3, 4-SPG4, 5-SPG5, 6- negativo da extração, 7- negativo da PCR. Linhas 8 a 14 (TC/TCII): 8- SPG1, 2-SPG2, 3-SPG3, 4-SPG4, 5-SPG5, 6- negativo da extração, 7- negativo da PCR. Linha 15: marcador de 50pb. Linha 16: marcador de 25pb. Linhas 17 a 23 (TCRUF/R): 17- SPG1, 18- SPG2, 19- SPG3, 20- SPG4, 21- SPG5, 22- negativo da extração, 23- negativo da PCR. Linha 24: marcador de 25pb.

A amostra com amplificação na altura esperada (SPG3) para o alvo TC/TCI foi negativa para o parasito de interesse, porém a sequência obtida demonstrou 82% de identidade no BLAST com 204 de 248 nucleotídeos e Evalue de 6e-51 com uma bactéria saprófita *Pseudomonas putida* W619 (CP000949.1) (Fig. 9).

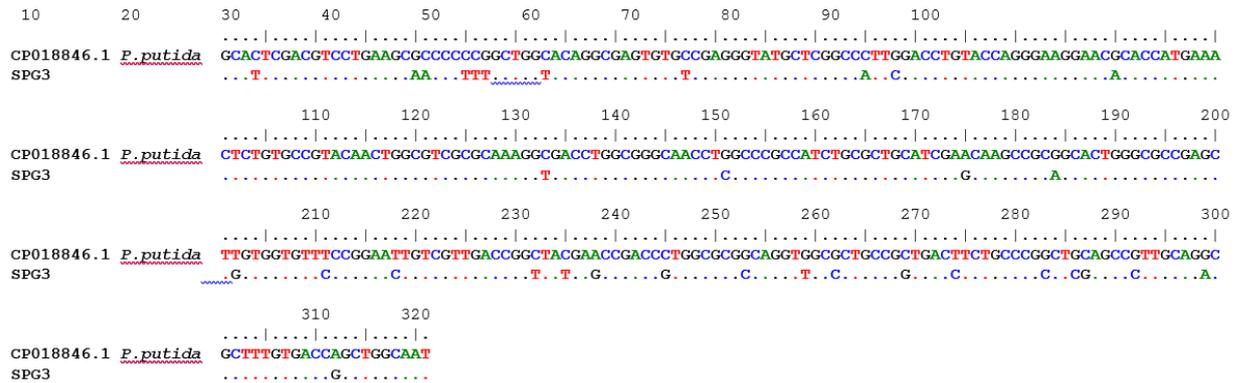


Figura 9: Alinhamento comparando a sequência obtida da amostra óssea (SPG3) de preguiça terrícola *Eremotherium* sp. com os *primers* para TC/TCI com sequência da bactéria *Pseudomonas putida* através do programa *online* BLAST.

Com o sequenciamento da amostra SPG1 obteve-se uma sequência de boa qualidade. Porém, não houve similaridade com nada que já foi depositado no Genbank até o momento, mas diminuindo o padrão de “*Highly similar sequences*” para “*more dissimilar sequences*” os dois organismos de maior similaridade foram:

Identidade de 179 de 211 nucleotídeos comparados (85%) da sequência com *Bradyrhizobium diazoefficiens* NK6, sendo Evalue de $9e-58$, e número de acesso AP014688.1 e identidade de 169 de 202 nucleotídeos comparados (84%) na mesma sequência para *Nitrobacter hamburgensis* X14 sendo Evalue $3e-51$, número de acesso CP000322.1.

Devido a qualidade ruim das sequências geradas, o sequenciamento do controle negativo da reação com o *primer* TC/TCI permitiu avaliação apenas de uma das ampliações, a menor, que mostrou similaridade com DNA humano.

Apesar dos *primers* TC/TCI/TCII já terem sido usados em análises com material antigo que obtiveram sucesso na amplificação do *T. cruzi* (LIMA et al., 2008; FERNANDES et al., 2008) neste estudo não foi possível amplificar fragmentos de DNA de *T. cruzi* com esses *primers*. O objetivo de se testar as amostras ósseas de preguiça extinta para este parasito está na sua capacidade de infectar preguiças atuais (HAMILTON et al., 2012) sendo então uma parasitose importante para ser pesquisada em animais do passado, uma vez que a discussão sobre a origem e evolução deste parasito é bastante extensa. Porém, outras ampliações foram visualizadas com um dos pares de *primers* utilizados, o TC/TCI, aquelas provenientes da

amostra de medula óssea de preguiça (SPG3) propiciaram um sequenciamento de alta qualidade, tendo similaridade com o DNA de uma bactéria presente no solo chamada *Pseudomonas putida* (Fig. 9). Esta é uma bactéria aeróbica, gram negativa, capaz de biocatalizar alguns produtos químicos como a espuma de poliestireno (NICOLETTI et al., 2015). A presença desta bactéria no espécime estudado pode ser explicada, seja porque é uma bactéria de solo podendo ter aderido ao osso durante o processo de sedimentação, uma vez que com o tempo a matriz óssea vai sendo substituída por sedimento, e neste caso pertencer ao sedimento à época em que viveu a preguiça, ou ser um achado mais recente. Porém a presença desta bactéria também pode ter sido cerreada e/ou multiplicada pelo uso de espuma plástica para proteção do fóssil já que o uso destes materiais é comum nas coleções pois protegem os espécimes contra impactos que poderiam causar danos à peça. Essas espumas também envolvem uma série de equipamentos incluindo os utilizados em laboratórios, não sendo impossível a contaminação ter ocorrido em qualquer parte do processo de transporte ou ensaios moleculares realizados no laboratório com o espécime. Porém, neste último caso se esperaria que esta bactéria fosse recuperada no controle negativo de extração ou PCR, fato que não ocorreu, uma vez que o controle negativo da extração não apresentou nenhuma amplificação, e nenhuma amplificação do controle negativo da PCR estava na mesma altura do amplicon recuperado para essa amostra. Esse achado é especialmente importante para as coleções, pois o uso do plástico que beneficia a proteção da peça pode em contrapartida prejudicar os estudos que visam a busca do DNA antigo, uma vez que qualquer DNA moderno amplifica preferencialmente ao antigo, presente na amostra.

Adicionalmente outros questionamentos podem ser levantados com esse achado, o fato do alvo para *T. cruzi* ter amplificado sequência de *Pseudomonas* nos permite questionar a especificidade dos *primers* uma vez que novas sequências estão constantemente sendo depositadas nos bancos genéticos *on line*. Nesse caso, por exemplo, a sequência da bactéria havia sido depositada no Genbank após a descrição dos *primers* por Souto (1996).

Outra sequência depositada após a publicação dos *primers* TC/TCI (SOUTO, 1996) que foi recuperada da amostra SPG1 (TC/TCI) também de costela de *Eremotherium* teve similaridade com o organismo *Bradyrhizobium diazoefficiens* NK6 (AP014688.1) publicado em 2015. Membros do gênero *Bradyrhizobium* constituem um importante grupo de rhizobia, alguns dos quais formam simbiose com alguns cultivos importantes economicamente como a soja (DELAMUTA et al., 2013). *Bradyzobia* da soja são bactérias de solo que fixam

simbioticamente o nitrogênio da atmosfera nos tecidos nodulares das raízes das plantas de soja. A primeira vez que sequências de seu genoma foram publicadas foi em 2002 (IIDA et al., 2015). *Bradyrhizobium diazoefficiens* foi recentemente reclassificado como uma nova espécie de base morfo-fisiologia, genótipo e diferenças genômicas da *Bradyrhizobium japonicum* (GOMES et al., 2014). Várias cepas são muito eficazes em fixar o nitrogênio quando em simbiose com a soja mas a espécie também inclui simbiose com outros hospedeiros (DELAMUTA et al., 2013). Originalmente os solos brasileiros eram livres de *Bradyrhizobium* e inoculantes comerciais estrangeiros foram usados pela primeira vez no século XX. Pesquisas por cepas localmente adaptáveis começaram imediatamente e continuam até hoje (SIQUEIRA et al., 2014). Portanto, a presença desta bactéria na amostra pode ser explicada pela contaminação do solo com esta bactéria, que foi adicionada nas plantações, ou como mencionado para *P. putida*, uma similaridade de sequência por causa do tamanho diminuto do fragmento ou por não constar no banco de sequências (Genbank) o “match” para a que foi recuperada da amostra com esse par de primers.

Esta mesma amostra (SPG1) apontou, com menor similaridade, para o organismo *Nitrobacter hamburgensis* (CP000322.1.), publicada no Genbank em 2014. *Nitrobacter* é um gênero de bactérias litoautotróficas que são capazes de fazer a conversão de amônia em nitrito e nitrato, é importante no ciclo do nitrogênio e está relacionado ao suprimento de nitrato como fonte de nitrogênio para plantas. É também importante para eutrofização e lixiviação. Sendo fundamental em todos os ecossistemas. A espécie *N. hamburgensis* é originada de Hamburgo, na Alemanha (NAVARRO et al., 1992). A similaridade da sequência recuperada do osso da preguiça *Eremotherium* poderia ser explicada por contaminação, uma vez que é uma bactéria presente no solo, porém sua origem na Alemanha atesta contra isso e a menor similaridade também. Possivelmente se trata de uma similaridade decorrente de uma deposição de sequência posterior e considerando o fragmento pequeno. Dificilmente se trata de uma bactéria presente na amostra ou mesmo a contaminando. Porém, todo o resultado deve ser relatado, ademais novos estudos podem vir a encontrar esta bactéria em outros espécimes, portanto esse resultado se tornaria útil na discussão.

Contudo, devemos ressaltar que especificamente para os casos das bactérias *Bradyrhizobium* e *Nitrobacter* não se pode descartar uma contaminação no laboratório uma vez que o controle negativo da PCR apresentou ampliações em altura similar, e a qualidade ruim do sequenciamento não tenha permitido a análise dessas sequências na mesma altura. Porém, o

sequenciamento de um *amplicon* do controle negativo da reação com o *primer* TC/TCI mostrou similaridade com DNA humano, certamente uma contaminação. O contato com DNA humano durante todos os processos que o espécime é submetido desde a escavação é muito grande, sendo praticamente impossível detectar precisamente onde ocorreu nesta amostra. E mais uma vez reforça a inespecificidade dos *primers*, o fato dele também amplificar DNA humano pode ser um fator complicador nas pesquisas com DNA antigo, pois qualquer DNA moderno presente na amostra será amplificado preferencialmente ao DNA antigo, podendo falsear um resultado ou mesmo não favorecer a amplificação do agente alvo ainda que ele estivesse presente na amostra.

Assim, embora o objetivo inicial tenha sido a busca por *T. cruzi* essa pesquisa mostrou a importância de se sequenciar tudo o que amplifica na amostra pois pode ser um achado endógeno e contemporâneo a época do fóssil, ou ainda que seja exógeno, discussões relevantes podem deixar de serem feitas por aqueles que julgam que amplificações inespecíficas ou resultados aparentemente indesejados devam ser ignorados ou não relatados. As discussões referentes a estes achados foram recentemente publicadas (ANEXO 4).

6.1.3 Alvo para *Toxoplasma gondii*

As amostras ósseas da preguiça terrícola e os coprólitos de felinos A848, A1650 e A1590 não amplificaram para este alvo, e os controles negativos da extração e PCR estavam livres de amplificações. Porém, para todos os demais coprólitos de felinos usados no estudo foram obtidas amplificações nos negativos tanto de extração quanto de PCR. Ainda que repetições deste ensaio tenham sido realizadas estes foram inconclusivos devido a inconsistência nos resultados, ou seja, mostraram-se positivas e negativas em diferentes reações. Devido a isso, e também pelo fato de termos utilizado uma metodologia que havia sido padronizada para tecidos (LELES et al., 2016b), mas ainda não testada em coprólitos, resolvemos verificar o funcionamento dos *primers* utilizados para *T. gondii* (TgNP1/2 e NN1/2) em fezes de felinos modernas, positivas pela microscopia óptica para esse apicomplexa (cedidas pela Dra. Maria Regina Reis Amendoeira), e DNA extraído de lavado peritoneal de camundongo experimentalmente infectados com *T. gondii* da cepa RH (como controle positivo da reação) também cedido pela pesquisadora supracitada. A primeira PCR não gerou nenhuma amplificação, portanto efetuamos uma reamplificação que também não mostrou amplificação para as fezes do felino, somente para o controle positivo. Assim, foi também usado o alvo para

o hospedeiro felino (PCytb) para verificar se a reação poderia estar inibida, e foi verificado que não havia inibição. O resultado se encontra na figura 10.

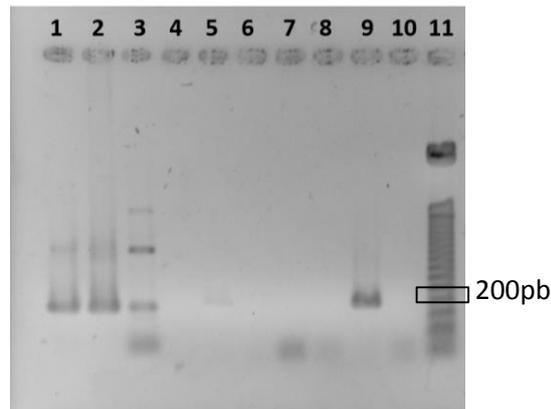


Figura 10: Corrida eletroforética de reamplificação das amostras modernas positivas para *T. gondii*, usando os alvos para o hospedeiro felino (PCytb) e para *T. gondii* (NN1/2, TgNP1/2).

Linhas 1 a 3 (PCytb): 1 – fezes modernas de felino positivas para *T. gondii*, 2 – controle positivo (DNA extraído de sangue de gato doméstico) e 3 – controle negativo PCR. Linhas 4 a 6 (NN1/2): 4 - fezes modernas de felino positivas para *T. gondii*, 5 - controle positivo (lavado peritoneal de camundongo - taquizoita) e 6 - controle negativo PCR. Linhas 7 a 8 (TgNP1/2 e NN1/2): 7 – *nested* TgNP1/2 + NN1/2, 8 – fezes modernas de felino reamplificadas. Linhas 9 a 10 (TgNP1/2): 9 - controle positivo (lavado peritoneal de camundongo - taquizoita) e 10 - controle negativo. Linha 11: Marcador de 50pb.

Apesar de ser uma infecção com grande importância nos dias atuais, pouco se sabe sobre a toxoplasmose no passado. Até o momento apenas um relato de 2013, do achado de *T. gondii* foi publicado, onde o parasito foi evidenciado através da metagenômica em amostra de múmia egípcia (KHAIRAT et al., 2013). Além disso estudos com amostras experimentais de camundongos dessecados mostraram o potencial de bons resultados na procura deste parasito em material antigo (TERRA et al., 2004). E recentemente, foi desenvolvido um protocolo para recuperar DNA de ossos e tecidos, em modelos experimentais dessecados (LELES et al., 2016b) onde foi possível recuperar o DNA das amostras, mesmo as experimentalmente dessecadas, ainda que as amplificações tivessem menor intensidade. O desenvolvimento dessa metodologia aumentou o potencial de estudos paleoparasitológicos, pois o material ósseo é mais disponível nas coleções do que os tecidos moles. Assim, nesse estudo foram utilizados os mesmos *primers* e condições proposto por Leles e colaboradores (2016b). Como supracitado, as reações de PCR

para o parasito nas amostras arqueológicas tiveram que ser interrompidas devido a contaminações e também, devido a inconsistência nos resultados, uma vez que algumas amostras de felinos mostraram-se positivas e negativas em diferentes reações com o mesmo produto extraído, assim ainda que em algumas ocasiões o controle negativo não tenha amplificado e as amostras sim, os resultados não puderam ser validados. Porém, o estudo com as amostras modernas permitiu evidenciar que a metodologia que foi padronizada para o estudo de ossos e tecidos moles em modelos experimentais propostas por Leles e colaboradores (2016b) não foi eficiente na recuperação do parasito em amostras fecais de felinos positivas na microscopia. Porém, também não se pode descartar problemas com a amostra fecal usada como controle positivo, uma vez que foi relatado pela pesquisadora Dr^a. Regina Amendoeira que cedeu as amostras que estas já estavam armazenadas em seu laboratório há muitos anos. Assim não havendo até o momento padronização para diagnóstico molecular de *T. gondii* em coprólitos de felinos, esses resultados mostram a necessidade de novos ensaios em modelos experimentais com outras amostras fecais de felinos com presença de oocisto de *T. gondii* para validação da metodologia para estudos paleoparasitológicos. Pois, um resultado positivo em amostras arqueológicas ou paleontológicas da América do Sul poderia contribuir com as discussões sobre a origem da toxoplasmose, uma vez que após a afirmação de Lehmann e colaboradores (2006) de que *T. gondii* teria se originado na América do Sul, travou-se um debate na literatura científica entre aqueles que não compartilham da mesma opinião, e mostraram resultados divergentes (SIBLEY; AJIOKA, 2008).

6.1.4 Alvo para o inseto triatomíneo

Foi obtida uma amplificação para a amostra A768 (roedor) na altura de aproximadamente 200pb (figura 11), o *amplicon* foi sequenciado.

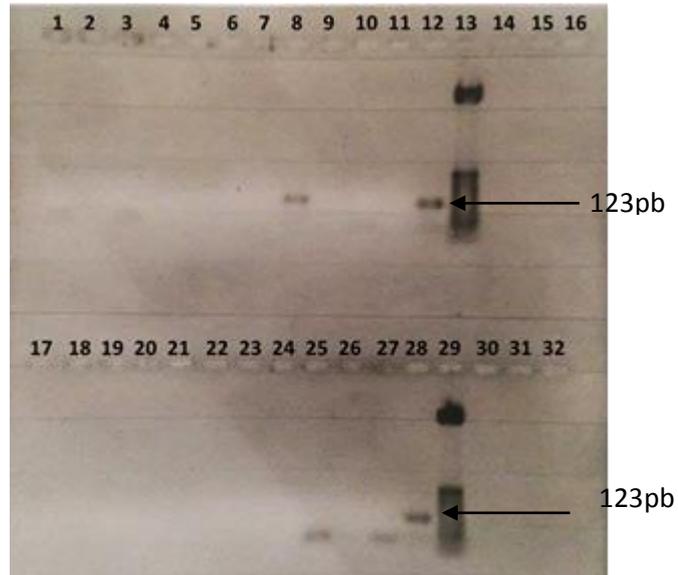


Figura 11: Corrida eletroforética para os coprólitos de animais com alvo para o inseto triatomíneo

Legenda: Linhas 1 a 11: (*primer* TRIF/TRIR) 1 – A1670, 2 – A848, 3 – A773, 4 – A359, 5 – A1633, 6 – A1172D, 7 – A351, 8 – A768, 9 – A1590, 10 – A1192, 11 – A1580. Linha 12 – produto amplificado de 123pb (usado com marcador). Linha 13 – Marcador de 25 pb. Linhas 17 a 22: (*primer* TRIF/TRIR) sendo – 17 – negativo da extração E5, 18 – negativo da extração E6, 19 – negativo da extração E7, 20 – A841c, 21 – A739a, 22 – A739b, 23 – A829a, 24 – negativo da extração 27/05/2014, 25 – negativo da extração 26/06/2014, 26 – negativo da PCR, 27 – segundo controle negativo da PCR. Linha 28 – produto amplificado de 123pb (usado como marcador). Linha 29 – Marcador de 25pb.

O sequenciamento da amostra A768 mostrou um cromatograma de alta qualidade (figura 12), contudo, não apresentou similaridade a nenhuma sequência depositada no Genbank até hoje. É possível que no futuro, com adição de novas sequências ao Genbank, o organismo referente ao encontrado no presente trabalho seja identificado. Isso ressalta a importância do depósito mesmo de sequências desconhecidas para que sirvam de comparação para outras pesquisas.

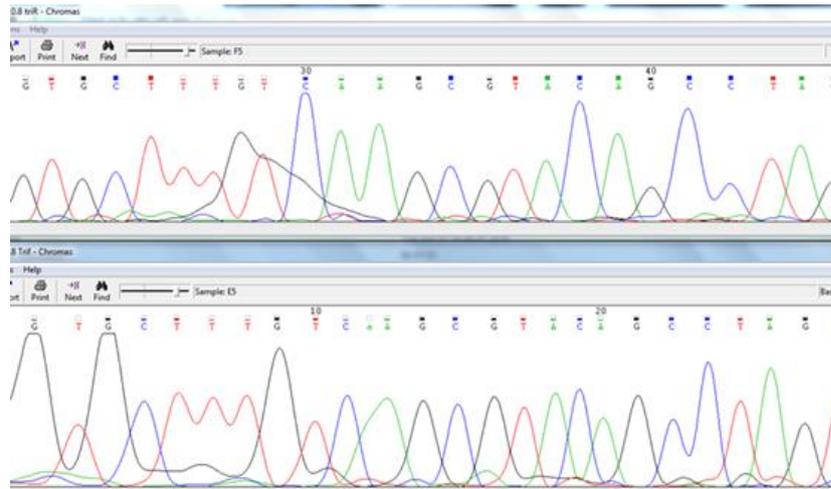


Figura 12: Cromatograma obtido com a amostra A768 (roedor) para o alvo molecular do triatomíneo (TRIF/R)

Em contrapartida não foi possível recuperar DNA de triatomíneos de nenhuma amostra animal. O conteúdo de um coprólito são retratos do último momento do indivíduo até que aquelas fezes fossem geradas, sendo assim pode ser que naquele dia de fato o animal não tivesse ingerido esse artrópode ou ainda a ingestão desse artrópode poderia não ser uma rota de transmissão de importância, ocorrendo esporadicamente, limitando o seu encontro. Ainda que a ingestão tenha ocorrido o DNA pode ter se degradado não sendo possível sua identificação. Outra possibilidade é que o alvo usado não tenha amplificado o DNA de eventuais espécies de triatomíneos presentes nos coprólitos, porém, os *primers* usados amplificam uma grande variedade de espécies, e as condições usadas mostram-se eficiente em controles positivos previamente testados pelo nosso grupo de pesquisa. Alguns trabalhos mostram que o uso de mais marcadores podem aumentar as chances do encontro do DNA alvo, não sendo incomum no estudo com coprólitos, que se obtenha ampliações de agentes parasitários por determinado alvo molecular e por outro não. Souza (2010) na tentativa de recuperar DNA de *Ascaris* sp. em coprólitos, não obteve concordância entre os diferentes alvos usados.

6.1.5 Alvo *Eimeria* spp.

Foram obtidas ampliações para as amostras de ovino e bovino (figura 13, linhas 1 e 2, retângulos em vermelho) em altura próxima a do esperado para espécie *Eimeria lamae* (267pb) e *Eimeria macusaniensi* (233pb). Porém, a de ovino embora tenha mostrado uma

amplificação fraca na altura esperada, apresentava também outras amplificações muito acima do esperado, sendo assim optou-se pelo sequenciamento apenas da amostra de bovino.

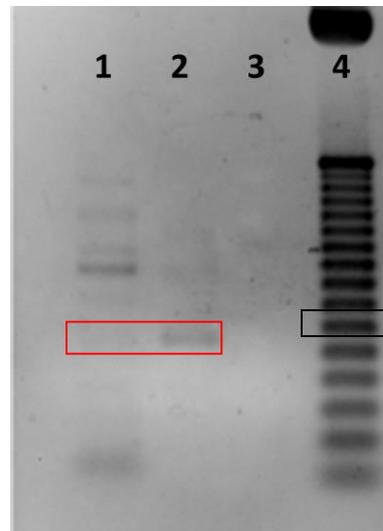


Figura 13: Corrida eletroforética para a PCR feita a partir de DNA já extraído das fezes de animais com suspeitos de infecção por *Eimeria* spp.

Legenda: Linha 1 - Ovino Boneca, Linha 2 - 103 Bovino, Linha 3 - controle negativo da PCR Linha 4 - Marcador molecular 50pb.

Com o sequenciamento desta amostra de fezes de bovino (103) obteve-se uma sequência de boa qualidade. Porém, não houve similaridade com o alvo esperado, mas sim, em um pequeno fragmento, com uma bactéria termofílica, *DeFluviitoga tunisiensis*. O alinhamento mostrou 46 de 52 nucleotídeos comparados (88%) da sequência com a bactéria, sendo Evaluate 2e-06, número de acesso LN824141.1. Sendo assim, não foi possível prosseguir com o experimento em coprólitos experimentais e nas amostras antigas. Outros estudos serão necessários com novas amostras fecais recentes positivas para esse coccídeo para padronização da metodologia.

Eimeria sp. é um protozoário que possui espécies específicas de camelídeos, é o caso da espécie *Eimeria macusaniense* (FUGASSA et al., 2008). A amostra de bovino que havia sido selecionada para testar os *primers* e condições da PCR tinha apresentado coccídeo no exame coproparasitológico com posterior caracterização morfológica pela microscopia óptica, com indicativo para o gênero de *Eimeria* sp (PALMEIRAS, 2012). Os *primers* utilizados não eram específicos, foram desenhados com base em sequencias das espécies *E. tenella*, *E. necatrix*, *E.*

acervulina, *E. brunetti*, *E. máxima* (LEW et al. 2003) e se mostrou eficiente na detecção de *E. macusaniensis* e *E. lamae* (CEBRA et al. 2012). No presente estudo, ao sequenciar o amplicon obtido da amostra que tinha altura compatível para o gênero, parte dele foi similar a uma sequência de bactéria termofílica, anaeróbia, *Defluviitoga tunisiensis* (número de acesso LN824141.1), esta bactéria foi isolada pela primeira vez de um biodigestor na Tunísia (HANIA, et al. 2012). Algumas possibilidades para esse resultado são que os *primers* não amplificassem a espécie de *Eimeria* sp. em questão uma vez que foram desenhados primeiramente para espécies que parasitam aves, e ainda que tivessem funcionado para espécies encontradas em camelídeos, o hospedeiro no presente estudo foi um bovino, ou que o coccídeo identificado morfologicamente não fosse *Eimeria* sp. Pode-se considerar também que se a bactéria presente na amostra estivesse em grande quantidade o DNA dela seria amplificado preferencialmente ao DNA de *Eimeria* sp. E considerando que apenas um fragmento de 52 nucleotídeos foi compatível a sequência desta bactéria dos 234 recuperados pelo sequenciamento da amostra, é mais provável que seja uma similaridade aleatória. Mais estudos se fazem necessários também no intuito de averiguar se o método de extração usado foi eficiente para pesquisa deste protozoário.

6.1.6 Alvo para *Pentatrichomonas hominis*

Os *primers* utilizados para o alvo *P. hominis* em cultura de fezes de gato com suspeita de infecção por *Tritrichomonas foetus* (tema da tese de doutorado da aluna Bethânia Bastos em Clínica e Reprodução Animal da UFF, com co-orientação de Beatriz Brener) amplificaram na altura esperada para *P. hominis* (350pb), agente etiológico comprovado pelo sequenciamento nucleotídico. Contudo, não havia mais amostra fecal correspondente a essa cultura, assim foi feita uma PCR para outra amostra fecal de felino também com suspeita de *T. foetus*, em que a cultura também amplificou na altura esperada para *P. hominis*, mas ainda não temos o resultado para o sequenciamento proveniente dessa cultura. Contudo, a amostra fecal correspondente a essa cultura que amplificou na altura esperada para *P. hominis*, não amplificou. Assim, futuramente serão necessários novos experimentos para continuidade da pesquisa com fezes que amplifiquem para esse alvo e comprovem o agente etiológico, para que se possa prosseguir com modelos experimentais e testes em coprólitos de felinos.

6.1.7 Alvo para o hospedeiro camelídeo

6.1.7.1 Apartir de amostras de fezes frescas de *Lama glama*

Obteve-se sucesso nas amplificações para todos os alvos avaliados e em todas as amostras. Foram selecionadas 6 amostras para o sequenciamento: uma amostra de saliva (linha 1) e de fezes (linha 3) da PCR feita com os *primers* LhacytbF1/R1 e uma amostra de saliva (linha 8) e uma amostra de fezes (linha 10) da PCR feita com os *primers* LhacytbF2/R2, ambas mostraram controle negativo de PCR e extração livres de contaminação como evidenciado na figura 14.

As sequências da amostra de saliva da lhama em que se utilizou os *primers* LhacybF1/R1 (linha 1), possuía muitos “ruídos” deixando a edição dificultada. Porém mesmo assim assumiu identidade de 99% com sequências de *Lama glama*, *Lama guanicoe cacsilensis*, *Lama pacos* e *Lama guanicoe huanacos*. O alinhamento mostrou 332 dos 333 nucleotídeos comparados (99%) da sequência com DNA mitocondrial de *Lama glama*, sendo Evaluate 1e-170, número de acesso AP003426.1.

As sequências obtidas com as fezes frescas de lhama, para o mesmo par de *primers* (linha 3) teve resultado semelhante ao obtido com a saliva embora a sequência obtida tenha apresentado melhor qualidade. Assim, verificou-se 99% de identidade com as sequências de *Lama glama*, *Lama guanicoe cacsilensis*, *Lama pacos* e *Lama guanicoe huanacos*. O alinhamento mostrou 433 dos 434 nucleotídeos comparados (99%) da sequência com DNA mitocondrial de *Lama glama*, sendo Evaluate 0.0, número de acesso AP003426.1.

Com os *primers* LhacytbF2/R2 a amostra de saliva (linha 8) gerou sequências de baixa qualidade, ainda assim, o pequeno fragmento que foi recuperado após a edição obteve a similaridade esperada com as sequências de DNA mitocondrial de camelídeos depositadas no Genbank. Verificou-se 100% de similaridade com as sequências de *Lama glama*, *Lama pacos*, *Lama guanicoe huanacos*, *Lama guanicoe cacsilensis* e *Lama pacos huacaya*. O alinhamento mostrou 73 dos 73 nucleotídeos comparados (100%) da sequência com DNA mitocondrial de *Lama glama*, sendo Evaluate 8e-29, número de acesso AP003426.1.

Utilizando os *primers* LhacytbF2/R2 (linha 10) verificou-se 98% de similaridade com as sequências de *Lama glama*, *Lama pacos*, *Lama guanicoe huanacos*, *Lama guanicoe cacsilensis* e *Lama pacos huacaya*. O alinhamento mostrou 78 dos 80 nucleotídeos comparados (98%) da sequência com DNA mitocondrial de *Lama glama*, sendo Evaluate 9e-29, número de acesso AP003426.1.

Com a *semi-nested* utilizando os *primers* LhacytbF2/R1 foram obtidas ampliações na altura esperada (588pb) mostrando que funcionam, porém as amostras não foram sequenciadas uma vez que os demais *primers* para o hospedeiro também haviam amplificado, e em material arqueológico não se espera detectar fragmentos maiores que 500pb, contudo este alvo poderia ser usado como um critério para autenticidade dos achados antigos.

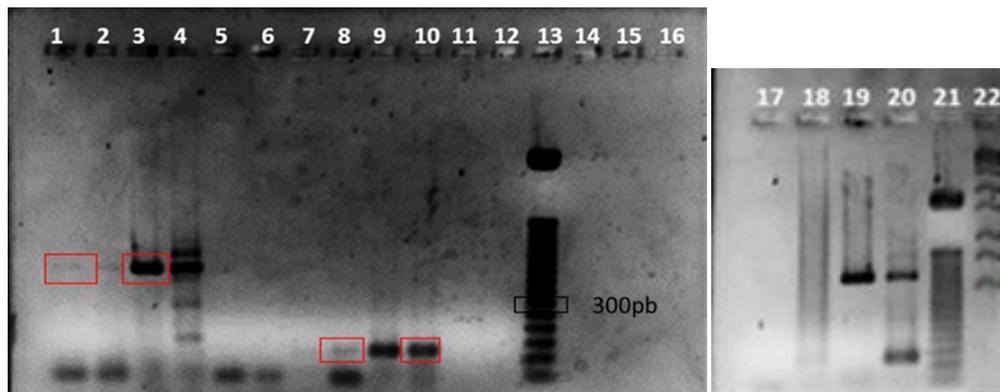


Figura 14: Corrida eletroforética dos produtos de PCR para o hospedeiro feita com as fezes frescas de *Lama glama*

Legenda: Linhas 1 a 6: (*primers* Lhacytb F1/R1) 1- saliva (Mg[2mM]); 2 – saliva (Mg[4mM]); 3 – fezes (Mg[2mM]); 4 – fezes (Mg[4mM]); 5 – c- PCR (Mg[2mM]) e 6 – c- extração (Mg[2mM]). Linhas 7 a 12: (*primers* Lhacytb F2/R2), sendo 7 – saliva (Mg[2mM]); 8 - saliva (Mg[4mM]); 9 - fezes (Mg[2mM]); 10 - fezes (Mg[4mM]); 11 - c- PCR (Mg[4mM]); 12 - c- extração (Mg[4mM]). Linha 13 – marcador de 50 pb. Linhas 17 a 20: *semi-nested* (*primers* LhacytbF2/R1) sendo 17 - saliva (Mg[2mM]); 18 - saliva (Mg[4mM]); 19 - fezes (Mg[2mM]); 20 - fezes (Mg[4mM]). 21 – marcador de 50pb. 22 – marcador 1Kb

6.1.7.2 A partir de fezes dessecadas de *Lama glama* (coprólitos experimentais)

As PCRs feitas para o hospedeiro camelídeo a partir dos coprólitos experimentais não geraram ampliações com nenhum dos pares de *primers*, apenas os controlos positivos, que consistiram das fezes frescas (Figura 15).

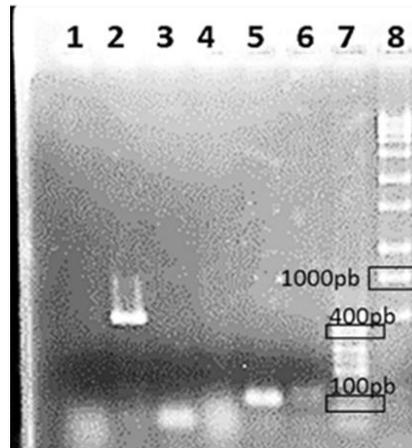


Figura 15: Corrida eletroforética dos produtos de PCR para o hospeiro feita com os coprólitos experimentais de *Lama glama*

Legenda: Linhas 1 a 3: (*primers* Lhacytb F1/R1 -488pb) 1 - Fezes lhama dessecada; 2 - Controle positivo; 3 - Controle negativo. Linhas 4 a 6: (*primers* Lhacytb F2/R2 -128pb) 4 - Fezes lhama dessecadas; 5 - Controle positivo; 6 - Controle negativo. Linha 7 - Marcador 50pb Linha 8 - Marcador 1kb

Com o objetivo de aumentar as chances de obter amplificações a partir dos coprólitos experimentais confeccionados com as fezes da lhama, parte dos produtos de PCR foram reamplificados, e parte foram purificados. Para verificar se a amostra estava inibida fizemos PCR utilizando diretamente o DNA juntamente com o amplicon obtido da amostra fresca. Além disso repetimos diretamente do DNA para averiguar se poderia ter havido algum problema no ensaio anterior.

Foram observadas amplificações com o uso do alvo LhacytbF2/R2 para a amostra de lhama que foi reamplificada e para o controle negativo (altura entre 150 e 100pb). Com o alvo LhacytbF1/R1 amplificações para a amostra reamplificada, para a direto do DNA após purificação e para o controle negativo (altura de 500pb). Foram sequenciadas as amostras correspondentes a linha 1 e 9, ou seja, uma para cada par de *primer*. Abaixo a figura 16 com o gel e correspondente legenda.

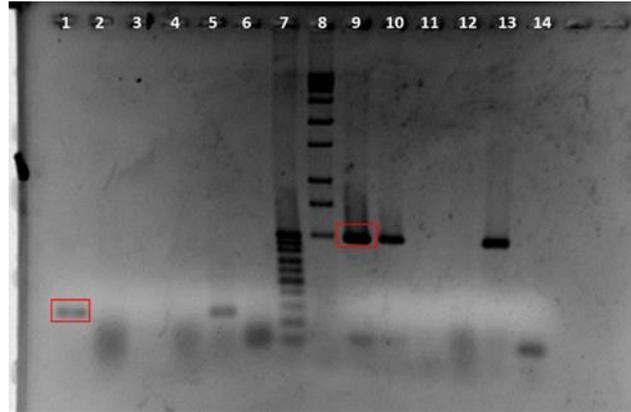


Figura 16: Corrida eletroforética dos produtos de PCR para o hospedeiro feita a partir de coprólitos experimentais de *Lama glama*

Legenda: Linhas 1 a 6:(LhacytbF2/R2 -128pb) 1 - Lhama filhote dessecada 200µl reamplificado; 2 - Lhama filhote dessecada direto do DNA; 3 - Lhama filhote dessecada 200µl purificada; 4 - Lhama filhote fresca (amplicon) + Lhama filhote dessecada não purificada; 5 - Controle positivo; 6 - Controle negativo. Linha 7 - Marcador 50pb; 8 - Marcador 1kb. Linhas 9 a 14: (Lhacytb F1/R1 - 488pb) 9 - Lhama filhote dessecada 200µl reamplificado; 10 - Lhama filhote dessecada direto do DNA; 11 - Lhama filhote dessecada 200µl purificada; 12 - Lhama filhote fresca (amplicon) + Lhama filhote dessecada não purificada; 13 - Controle positivo; 14 - Controle negativo.

A sequência obtida a partir da amostra dessecada reamplificada com os *primers* LhacytbF1/R1 (linha 1) foi compatível com sequências de camelídeos depositadas no Genbank, tendo identidade de 100% com sequência de *Lama glama* (AP003426.1). Assim como a sequência obtida utilizando-se os *primers* LhacytbF2/R2 (linha 9) da qual utilizou-se diretamente o DNA extraído, gerando uma identidade de 98% com sequência de *Lama glama* (AP003426.1).

Ainda que tenha havido algumas inconsistências quanto às ampliações entre o alvo maior (488pb) e menor (128pb), uma vez que esperávamos que o menor amplificasse preferencialmente em todas as PCRs, e também ampliações inesperadas nos controles negativos, uma vez que são alvos novos e que ainda não haviam sido trabalhados no laboratório, pode-se fazer algumas observações importantes. O fato de se obter resultados positivos nos coprólitos experimentais somente após a reamplificação e uma segunda purificação mostra a dificuldade do trabalho com DNA antigo, uma vez que o pouco tempo que o material ficou submetido a dessecação em estufa já foi suficiente para degradar em parte o seu DNA e concentrar inibidores. Como obtivemos resultados promissores com os alvos mesmo no

material dessecado, optou-se por dar continuidade a pesquisa com os coprólitos dos camelídeos, em laboratório separado conforme discriminado na metodologia.

6.1.7.3 A partir dos coprólitos de *Palaeolama* sp.

Para aumentar as chances de recuperação do aDNA da amostra uma PCR reconstrutiva foi feita, conforme recomendado para DNA degradado (GOLEMBERG et al., 1996). Mas também foram feitas PCRs para o hospedeiro lhama utilizando diretamente o DNA extraído. A imagem obtida do gel após corrida eletroforética evidenciou ampliações somente para o alvo menor (Lhacytb F2/R2), de acordo com o esperado para DNA antigo, porém apesar de algumas ampliações se encontrarem na altura esperada (128pb), os negativos tanto da PCR quanto da extração também evidenciaram as mesmas ampliações, o que indica que ocorreu contaminação.

Nova PCR foi feita então para o alvo LhacytbF2/R2, porém novamente houve contaminação dos controles de PCR e de extração, isso tornaria impossível validar qualquer resultado como sendo proveniente da amostra, portanto optamos por não sequenciar as amostras, e aguardar até que novas extrações e experimentos possam ser realizados com segurança em outro laboratório

Contudo, ressalta-se que na possibilidade desses camelídeos extintos terem alguma similaridade no gene citocromo b com camelídeos atuais, esse é um alvo que poderia ser usado com êxito na pesquisa para DNA antigo, já que para os coprólitos experimentais as ampliações foram obtidas.

6.1.8 Alvo para *Giardia duodenalis*

6.1.8.1 A partir de amostras de fezes de ovino dessecadas (coprólitos experimentais).

Para os coprólitos experimentais foram utilizados *primers* para amplificar fragmentos pequenos já que era um modelo para ser testado em antigo. Para a PCR primária com os *primers* β -giaF1/R1, em que se esperava um fragmento de 324pb foi selecionado para o sequenciamento a amostra dessecada (linha 17) e o controle positivo (linha 18) para verificar se corresponde ao fragmento esperado mesmo que o controle negativo tenha contaminado. Da *semi-nested* a banda evidenciada, correspondente a amostra, não estava na altura esperada (147pb) (linha 20)

porém o controle positivo (linha 21) foi sequenciado pois a altura estava mais próxima da esperada.

As amostras e controles positivos para os alvos Gdh para os genótipos zoonóticos A e B (linhas 23 e 24) e genótipos animais (linhas 26 e 27) também foram sequenciados pois estavam na altura esperada (214pb) e tinham os controles negativos sem amplificações. As amostras selecionadas estão marcadas em vermelho na figura 17.

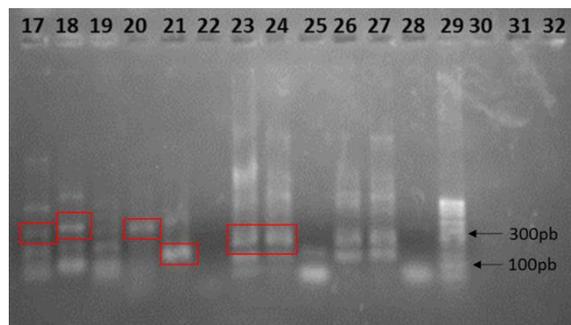


Figura 17: Corrida eletroforética para amostras dessecadas de ovino feita para os alvos de *Giardia duodenalis*

Linhas 17 a 19: (*primers* β -gia F1/R1 - 324pb) 17 - Boneca 200 μ l com aquecimento dessecada; 18 - Controle positivo; 19 - Controle negativo. Linhas 20 a 21: (*primers* β -gia F1/R2 - 147pb) 20 - Boneca 200 μ l com aquecimento dessecada; 21 - Controle positivo; 22 - Controle negativo. Linhas 23 a 25: (*primers* GdhF1/R1H - 214pb) 23 - Boneca 200 μ l com aquecimento dessecada; 24 - Controle positivo; 25 - Controle negativo. Linhas 26 a 28: (*primers* Gdh F1/R1A - 214pb) 26 - Boneca 200 μ l com aquecimento dessecada; 27 - Controle positivo; 28 - Controle negativo. Linha 29 - Marcador 50pb.

A sequência obtida com o controle positivo com os *primers* da semi *nested* para o alvo β -giaF1/R2 apresentou similaridade com sequências do gene beta-giardina de *Giardia duodenalis* (KY483960.1), tendo 104 dos 107 nucleotídeos analisados gerando uma identidade de 97% e Evalue 6e-42. Além de outras sequências depositadas no Genbank para o mesmo gene de *Giardia*.

Com as amplificações obtidas com o par de primers β -giaF1/R1 para o controle positivo foi possível recuperar uma sequência de boa qualidade que apresentou similaridade com sequências do gene beta-giardina depositadas no Genbank para o protozoário *Giardia duodenalis* (DQ116606.1), com identidade de 99% sendo 284 dos 288 nucleotídeos compatíveis e Evalue de 2e-140. Infelizmente o cromatograma gerado com a amostra dessecada

não apresentou qualidade para uma sequência segura, o que reforça que o dessecamento mesmo que por pouco tempo é suficiente para degradação do DNA, ressaltando a dificuldade de recuperação do DNA desse protozoário no registro arqueológico, somado ao fato desse gene ser cópia única. Villarroel (2013), já havia relatado as dificuldades do diagnóstico molecular de *G. duoensis* em coprólitos.

A sequência obtida com o alvo Gdh para detecção de genótipos animais para o controle positivo, ou seja, as fezes frescas, não estava com boa qualidade em toda sua extensão, assim, após a edição, o fragmento recuperado apresentou identidade de 96% com *Flavonifractor plautii* (CP015406.2) tendo compatibilidade de 51 dos 53 nucleotídeos analisados e E-value de $3e-15$. Já a amostra que foi dessecada a partir dessa mesma amostra fresca, também gerou uma sequência de baixa qualidade, após editada apresentou 90% de identidade com *Corynebacterium phocae* (CP009249.1) tendo compatibilidade de 78 dos 87 nucleotídeos analisados e E-value de $1e-22$. Esses resultados mostram que mesmo usando alvos que poderiam facilitar a amplificação do genótipo E, ao qual pertencia essa amostra, não foram eficientes, amplificando DNA de outros organismos que poderiam estar presentes nessas fezes em maior quantidade que os cistos de *Giardia* sp. Mostra também que o tempo que as fezes permaneceram na estufa para confecção do coprólito experimental pode ter favorecido o crescimento de outros organismos. No entanto, as espécies de bactérias com as quais a sequência apresentou similaridade não podem ter sua presença nas fezes de ovino facilmente explicada, como é o caso *Corynebacterium phocae* que é uma bactéria encontrada em animais marinhos (DU et al., 2010) já a *Flavonifractor plautii*, é encontrada no trato digestório de humanos e outros animais, interessante que o meio de cultura desta última é em meio enriquecido com sangue de ovino, considerando que a amostra é proveniente de ovino, é possível que seja uma bactéria endógena a amostra (KASAI et al., 2015; EECKHAUT et al. 2011). Porém, devemos considerar que o tamanho dos fragmentos recuperados foram pequenos, e mudanças em bases nucleotídicas após a dessecação podem fazer com que apareçam resultados falso positivos e inesperados como é o caso da *Corynebacterium phocae*.

Para o controle positivo, ou seja as fezes frescas, com o alvo Gdh para os genótipos A e B, a sequência recuperada apresentou 85% de identidade com a bactéria *Corynebacterium aquilae* (CP009245.1) tendo 86 dos 101 nucleotídeos analisados compatíveis e E-value de $4e-19$, esta possui esse nome por ter sido descrita de águia imperial *Aquila adalberti* (GARAYZÁBAL et al., 2003). Também apresentou similaridade variada com outros

organismos, porém nenhum deles representantes do gênero *Giardia* sp. A amostra dessecada das fezes de ovino, para este mesmo alvo gerou sequência que teve similaridade com a mesma espécie de bactéria que a amostra utilizando os *primers* para os genótipos animais gerou, *Corynebacterium phocae* (CP009249.1) a sequência não estava boa e o pequeno fragmento recuperado mostrou 55 dos 57 nucleotídeos analisados compatíveis em uma identidade de 96% com essa bactéria, Evalue de 8e-17.

Villarroel (2013) havia proposto a metodologia aqui empregada para o estudo da giardíase em contexto arqueológico, contudo ela não havia testado amostras com genótipo E que possivelmente seria o genótipo que identificaríamos no coprólito da *Palaeolama* que era o nosso objetivo final, por isso esses ensaios foram previamente necessários. Frías (2013) obteve êxito nas amplificações para os coprólitos experimentais, contudo relatou dificuldades no ensaio com coprólitos, também mostrando a presença de bactérias. Em nosso estudo, as dificuldades foram ainda maiores, pois nem mesmo com os coprólitos experimentais conseguiu-se identificar o agente etiológico.

6.1.8.2 A partir dos coprólitos de *Palaeolama* sp.

Considerando o trabalho de Silva (2013) no qual ela detectou por ELISA o antígeno do parasito *Giardia* sp. outras PCRs foram feitas em que, além do alvo pequeno para hospedeiro LhacytbF2/R2, também utilizou-se os alvos para este protozoário. Utilizamos os *primers* β -giaF1/R1, *semi-nested* β -giaF1/R2, Gdh_H, Gdh_A, G7/G759, *nested* GiarF/R, sendo os dois últimos utilizados como controle de contaminação por ter mais de 500pb.

Apesar da obtenção de amplificações no coprólito, os negativos tanto da PCR quanto de extração também apresentaram amplificação na mesma altura. Portanto, optamos por não prosseguir com o sequenciamento, pois ainda que a sequência obtida dos controles negativos pudesse ser diferente das obtidas nas amostras seria temeroso fazer qualquer afirmação. Adicionalmente o alvo para pesquisa de *Giardia* sp. já não havia se mostrado específico nas amostras frescas e modelos experimentais, tendo amplificado DNA de bactérias, resultado que tivemos acesso só após o experimento com os coprólitos já realizados. Assim, seria interessante a repetição deste método de diagnóstico quando possível em outro laboratório e com novos reagentes diminuindo ao máximo o risco de contaminação, considerando que a amostra não foi esgotada e existem alíquotas que não foram trabalhadas.

Os resultados dos ensaios moleculares encontram-se sumarizados no quadro 5.

Quadro 5: Resultado dos sequenciamentos obtidos no presente estudo.

Hospedeiro	Alvo	Primer	Amostra	Similaridade*	
Preguiça terrícola (<i>Eremotherium</i> sp.)	Região intergênica do gene mini-exon de <i>T. cruzi</i>	TC/TCI	Osso (SPG3)	<i>Pseudomonas putida</i> (CP000949.1)	
			Osso (SPG1)	<i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> (AP014688.1)	
				<i>Nitrobacter hamburgensis</i> (CP000322.1)	
	c- PCR	DNA humano			
	DNA ribossomal multicópia 18S de <i>T. cruzi</i>	TCRUF/R	Osso (SPG1)	Sem qualidade	
Roedor	Gene ribossomal 18S de triatomíneos	TRIF/R	Coprólito (A768)	Sem similaridade	
Bovino (103)	Gene ribossomal 18S de <i>Eimeria</i> spp.	EF1/ER1	Fezes frescas (103)	<i>Defluviitoga tunisiensis</i> (LN824141.1)	
<i>Lama glama</i> - fezes frescas	Citocromo b de Camelídeos	LhacytbF1/R1	Saliva	<i>Lama glama</i> (AP003426.1) e outros camelídeos	
			Fezes frescas		
LhacytbF2/R2		Saliva			
		Fezes frescas			
<i>Lama glama</i> - fezes dessecadas	Citocromo b de Camelídeos	LhacytbF2/R2	Produto reamp.	<i>Lama glama</i> (AP003426.1) e outros camelídeos	
		LhacytbF1/R1	Produto reamp.		
Ovino (Boneca)**		Beta-giardina de <i>G. duodenalis</i>	β-giaF1/R1	Fezes dessecadas	Sem qualidade
				c+ (fezes frescas)	<i>Giardia duodenalis</i> (DQ116606.1)
	β-gia F1/R2		c+ (fezes frescas)	<i>Giardia duodenalis</i> (KY483960.1)	
	Gene glutamato desidrogenase (Gdh) de <i>G.</i> <i>duodenalis</i>	Gdh_H	Fezes dessecadas	<i>Corynebacterium phocae</i> (CP009249.1)	
			c+ (fezes frescas)	<i>Corynebacterium aquilae</i> (CP009245.1)	
		Gdh_A	Fezes dessecadas	<i>Corynebacterium phocae</i> (CP009249.1)	
c+ (fezes frescas)	<i>Flavonifractor plautii</i> (CP015406.2)				

*Organismos cujas sequencias depositadas no Genbank apresentaram similaridade com as obtidas no presente estudo.

**As amostras de ovino dessecadas tiveram controles positivos sequenciados para verificar se poderíamos validar os positivos uma vez que os alvos não foram testados nas fezes frescas anteriormente.

6.1.9 Ensaio metagenômico

As amostras para o ensaio metagenômico, provenientes de coprólito da preguiça terrícola, foram enviadas à empresa 'Helixxa - Genomics Service Provider' para a realização da análise. Quando o DNA extraído foi enviado, a empresa comunicou que a amostra possuía

a quantidade mínima [ng/ μ l] necessária indicada pelo kit comercial que usariam no ensaio que era recomendado para amostras com baixa concentração de DNA, portanto o ensaio seria prosseguido, não sendo necessária uma nova extração. Porém, recebemos posteriormente a notícia que o teste não havia funcionado, segundo a empresa as amostras continham EDTA o que era incompatível com o Kit utilizado por eles, apesar das amostras terem sido purificadas com kit que não continha EDTA na solução de eluição final. Após nossa contestação dessa alegação, a empresa nos enviou um parecer técnico relatando outros problemas detectados na qualidade do DNA extraído que impediram que as bibliotecas genômicas fossem geradas para análise. Toda a amostra foi usada no ensaio não se tendo mais DNA extraído da mesma para novas análises, e também não há mais material dessa amostra, exceto o resíduo da primeira etapa de extração que normalmente é descartado e que foi congelado, devido a sua raridade. O ensaio metagenômico foi financiado com recursos do projeto INOVA-ENSP e bolsa Jovem Cientista Faperj (n. processo nº 202.785/2015). Esse ensaio foi realizado principalmente por ser hoje a metodologia que mais informações trariam sobre o DNA contido na amostra, mesmo que pouca quantidade tivesse disponível para análise, como era o caso. Mas, infelizmente não se obteve êxito com esse ensaio, mostrando as dificuldades para análise metagenômica em amostras extintas, ainda que a empresa tenha assegurado experiência na área. O parecer técnico da empresa está disposto no ANEXO 3.

6.2 TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS

6.2.1 Teste *Toxoplasma gondii*

Todas as amostras antigas foram negativas (figura 18). Já para as amostras ósseas modernas sabidamente positivas para *T. gondii*, tanto nas amostras frescas quanto dessecadas foi possível visualizar uma segunda linha bem fraca, porém presente indicando a positividade (figura 19).



Fig. 18: Teste imunocromatográfico para *T. gondii* com amostras de coprólitos de felinos
 Legenda: Coprólitos felinos usados A739b, A743, A802g e A841c; a ausência de uma segunda linha indica amostras negativas.

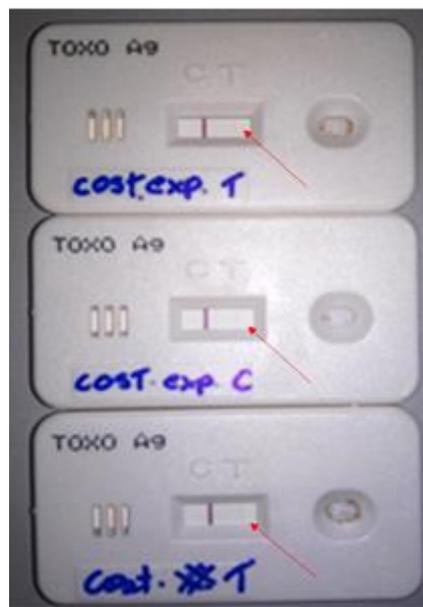


Fig.19: Teste imunocromatográfico para *T. gondii* com amostras positivas proveniente de camundongo experimentalmente infectado.

Legenda: Cassete demonstrando segunda linha fraca a direita da linha mais escura indicando positividade no exame para antígeno *Toxoplasma gondii* para as amostras Cost. Exp. T (costela dessecada de camundongo infectado experimentalmente – cepa RH), Cost. Exp. C (costela dessecada de camundongo infectado experimentalmente – cepa ME49) e Cost. # T (costela fresca de camundongo infectado experimentalmente – cepa RH)

O teste imunocromatográfico em cassete feito para a detecção do antígeno *T. gondii* mostrou-se com potencial para futuros estudos, a linha fraca evidenciada à direita indicou positividade para as amostras recentes dessecadas e frescas de camundongos sabidamente

positivos para esse apicomplexa (figura 18 e 19). O fato do material dessecado ter sido capaz de gerar positividade no exame levantou a possibilidade de se adaptar ao material antigo. Porém, essa linha que indicou a positividade era realmente muito tênue, portanto será necessário a adaptação de diferentes protocolos em amostra moderna dessecada para gerar resultados mais evidentes e para que se possa aplicar em material antigo. Se a adaptação fosse feita e funcionasse em material antigo isso facilitaria muito a triagem da infecção por *T. gondii* em amostras antigas com pouca quantidade de material e de forma fácil. Porém, não foi possível a realização de mais testes, pois a empresa está aguardando a liberação da ANVISA para a fabricação de mais *kits* e a previsão excedia o tempo disponível para a realização desta dissertação (2 anos).

Esse é um parasito de grande importância nos dias atuais principalmente para gestantes e imunocomprometidos, e é discutido a origem e evolução da espécie, principalmente através de análises filogenéticas (LEHMANN et al., 2006), seria de grande interesse o rastreamento deste parasito no passado.

6.2.2 Teste *Giardia duodenalis*

6.2.2.1 Amostras frescas

As amostras humanas (HP21e E1) genótipo A e B, respectivamente, felina genótipo F e ovina (Boneca) genótipo E foram positivas (figura 20). Interessantemente, o fabricante indica o uso do kit para amostras humanas. Mas como se viu usamos amostras previamente genotipadas tanto humanas quanto animais, o método foi eficiente em detectar o protozoário independente do genótipo, A, B, E ou F. Várias pesquisas tem usado testes imunológicos padronizados para amostra humanas em animais e vice-versa (i.e SOUZA et al., 2004; MEKARU et al. 2007; TZANNES et al., 2008), porém, grande parte desses estudos não associa aos genótipos, o que pode ser realizado em nossa pesquisa.

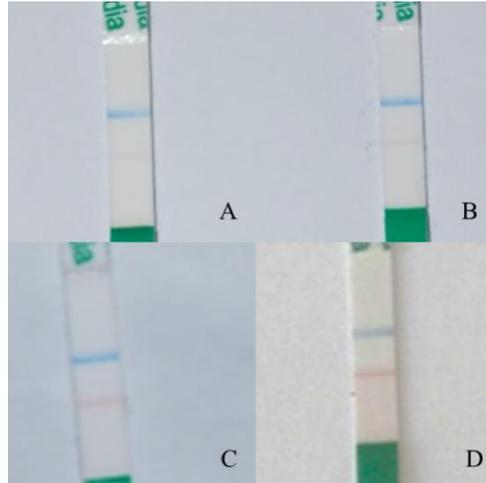


Figura 20: Resultados dos testes imunocromatográficos utilizando amostras frescas que não passaram pelo aquecimento prévio

Legenda: A linha azul superior corresponde ao controle do teste e a linha vermelha inferior demonstra a positividade para o antígeno de *Giardia duodenalis* sendo: A. HP21 (humana); B. Felina; C. Ovina; D. E1 (humana)

Ainda para as amostras modernas foi testado a utilidade de um aquecimento prévio, com a intenção de solubilizar melhor os antígenos, esse método mostrou não promover melhoras no sinal de positividade.

6.2.2.2 Coprólitos experimentais

Todos foram positivos, porém verificou-se que o sinal foi mais forte quando maior quantidade de amostras foi usada, e quando estas passaram por aquecimento prévio. A figura 21 mostra as fitas utilizadas para cada amostra e as diferentes intensidades de sinal.

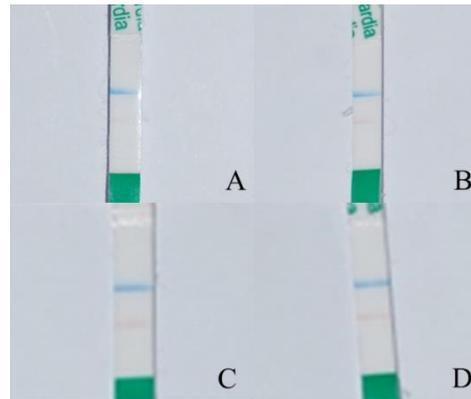


Figura 21: Resultado do teste imunocromatográfico utilizando os coprólitos experimentais feitos com amostras de ovino (Boneca).

Legenda: A linha azul superior corresponde ao controle do teste e a linha vermelha inferior demonstra a positividade para o antígeno de *Giardia duodenalis* sendo: A. ovino (100µl sem aquecimento prévio); B. ovino (100µl com aquecimento prévio); C. ovino (200µl sem aquecimento prévio); D. ovino (200µl com aquecimento prévio)

O teste imunocromatográfico mostrou-se assim muito eficiente na detecção do protozoário nos coprólitos experimentais, esse teste rápido ainda é pouco utilizado para pesquisa de *G. duodenalis* em amostras antigas, sendo mais comum o uso do ELISA (FRÍAS et al., 2013). Ressalta-se que a modificação feita com aquecimento otimizou os resultados, assim como aumentar a quantidade de amostra a ser usada no teste.

6.3 TESTE PARA AVALIAÇÃO SOBRE REAPROVEITAMENTO DE AMOSTRAS

6.3.1 Amostras frescas

Com o objetivo de avaliar se, ao reutilizar as amostras depois do teste imunocromatográfico, pela biologia molecular (PCR convencional) seria possível seu diagnóstico, e também se haveria alguma alteração nas sequências recuperadas, selecionamos uma amostra de fezes de ovino (Boneca), que havia sido usada no imunocromatográfico para detecção de *G. duodenalis*, para cada par de *primers* ou seja, G7/G759 que amplifica fragmento de ~700pb (linha 27) e GiarF/R (linha 23), que amplifica fragmento de ~500pb (figura 22).

Como mostra a figura 22 obtivemos amplificações nas alturas esperadas e os controles de PCR e extração livres de contaminação (linhas 29 e 30). As amostras selecionadas para o sequenciamento estão marcadas em vermelho.

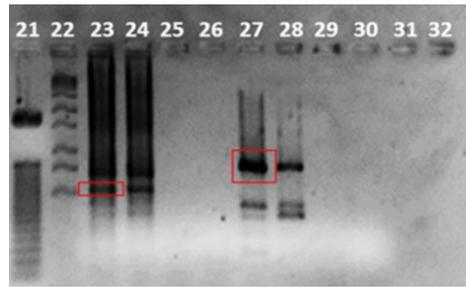


Figura 22. Corrida eletroforética para amostras frescas de animais, feita para o protozoário *Giardia duodenalis*

Legenda: 21 – marcador de 50pb. 22 – marcador 1Kb. Linhas 23 a 26: (*primers* GiarF/R) 23 – ovino (boneca); 24 – c+ (mesma amostra extraída ainda fresca); 25 – c- PCR; 26 – c- extração. Linhas 27 a 30: (*primers* G7/G759) 27 - ovino (boneca); 28 - c+ (mesma amostra extraída ainda fresca); 29 – c- PCR; 30 - c- extração.

As sequências obtidas com o uso de ambos os pares de *primers*, para a amostra de fezes frescas de ovino, foram compatíveis com sequências de *Giardia duodenalis* depositadas no Genbank com alta identidade. E ao compará-las as sequências que haviam sido obtidas diretamente das fezes frescas do mesmo indivíduo em um estudo prévio (resultados não publicados) foi verificado que não houve modificações nucleotídicas. Isso mostra que o reaproveitamento da amostra, utilizada no teste imunocromatográfico em questão, em reação de PCR convencional não interfere na sequência do DNA.

Uma vez que foi verificado que o material que sobrou do teste imunocromatográfico poderia ser usado para o diagnóstico molecular sem interferência na sequência nucleotídica, prosseguiu-se com o mesmo ensaio no coprólito experimental da amostra de ovino (Boneca) usou-se aquela amostra em que foi obtido maior intensidade do sinal do imunocromatográfico (200 microlitros com aquecimento). Também com o coprólito experimental obtivemos sucesso no diagnóstico molecular a partir do material reaproveitado do teste imunocromatográfico. Contudo, nesse caso verificou-se a alteração de 7 bases nucleotídicas. O que mostra que a alteração foi provocada pela dessecação e não pelo resíduo de tampão do teste imunocromatográfico, pois na amostra fresca essa alteração nucleotídica não foi averiguada. Essa pode ser uma observação relevante para estudos paleoparasitológicos, pois o pouco tempo de dessecação ao qual a amostra foi submetida já foi suficiente para causar modificações no DNA.

Já para verificar se o resíduo da extração do DNA total, por sua vez, poderia ser reutilizado no teste imunocromatográfico utilizamos a amostra humana (código E1) e o resultado mostrou-se positivo com a marca vermelha (figura 23).



Figura 23: Resultado do teste imunocromatográfico utilizando a amostra de fezes humanas (E1) frescas que passou pela extração do DNA

Legenda: A linha azul superior corresponde ao controle do teste e a linha vermelha inferior demonstra a positividade para o antígeno de *Giardia duodenalis*.

Seguiu-se com o experimento e outra alíquota das fezes foi dessecada para realizar o mesmo ensaio. O coprólito experimental feito com fezes humanas (E1) teve o DNA extraído e o resíduo desta extração foi testado na imunocromatografia. E, assim como com o resíduo da extração das fezes frescas, o resultado também foi positivo (figura 24). Mostrando que a alteração nucleotídica não interfere no diagnóstico imunocromatográfico, o que seria esperado já que as moléculas alvos em cada metodologia são distintas.



Figura 24: Resultado do teste imunocromatográfico utilizando resíduo da extração do coprólito experimental feito com as fezes de humano (E1)

Legenda: A linha azul superior corresponde ao controle do teste e a linha vermelha inferior demonstra a positividade para o antígeno de *Giardia duodenalis*.

Essa inovação metodológica é de grande importância para o estudo de amostras raras, pois ficou demonstrado que resíduos que seriam descartados nos testes imunocromatográficos podem ser usados para Diagnóstico molecular, e resíduos que são descartados da extração do

DNA podem ser reaproveitados para imunodiagnóstico. Assim, pequenas atitudes e inovações nos laboratórios podem contribuir para preservação do material arqueológico e paleontológico, ou mesmo amostras de coleções que são raras e disponíveis em pouca quantidade para estudo. Nosso trabalho soma forças a outras pesquisas que tem mostrado o quão importante é olhar para o material que outros pesquisadores tem ignorado. Recentemente Slon e colaboradores (2017) mostraram que é possível a recuperação de DNA de Neanderal e animais extintos em sedimento de caverna.

6.3.2 Coprólitos de preguiça terrícola e *Palaeolama* sp.

Após verificar que o teste funcionou para as amostras dessecadas e qual havia sido a melhor metodologia e após verificar que funcionava mesmo com o resíduo da extração, passamos para o teste nas amostras antigas que haviam sobrado após o processo de extração do DNA, que foram os coprólitos de *Palaeolama* sp. (A520b e A364) e o coprólito de preguiça terrícola (A121) do qual o resíduo foi o que sobrou da extração do DNA que foi para a metagenômica. Como resultado obteve-se positividade para os as amostras A364 e A121 (figura 25).

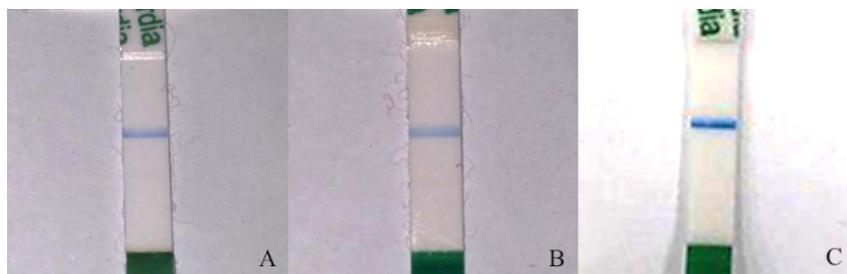


Figura 25: Resultado do teste imunocromatográfico utilizando amostras antigas

Legenda: A linha azul superior corresponde ao controle do teste e a linha vermelha inferior (A e B) demonstra a positividade para o antígeno de *Giardia duodenalis* sendo: A. Coprólito de preguiça terrícola (A121); B. Coprólito de *Palaeolama* sp. (A364); C. Coprólito de *Palaeolama* sp. (A520b)

Foi possível a confirmação do que havia sido observado com os coprólitos experimentais, ou seja, um resíduo que normalmente seria descartado ao ser reaproveitado permitiu resultado positivo portanto pode ser usado como método de triagem de amostras raras. Os testes imunocromatográficos tendem a ser métodos com menor custo e podem auxiliar pesquisas com poucos recursos financeiros. Sobre a positividade nas amostras A364 de

Palaeolama sp. e A121 da preguiça, *Nothorotherium maquinense*, algumas considerações podem ser feitas. Ambas foram recuperadas do mesmo sítio arqueológico, Gruta dos Brejões, município do Morro do Chapéu, Bahia. Esse fator é interessante, pois mostra que possivelmente esse era um parasito que circulava na região desde o Pleistoceno superior (~125.000-10.000 AP).

O protozoário *Giardia* sp. já foi encontrado em espécies de camelídeos atuais, sendo que o primeiro registro de giardiase em lhamas foi publicado por Kiorpes e colaboradores em 1987. Os cistos foram recuperados das fezes de um juvenil da espécie *Lama glama* que apresentava um quadro de diarreia, nos Estados Unidos. Em outro trabalho Trout e colaboradores (2008) publicam o achado de *G. duodenalis* genótipo A em alpacas de Maryland, EUA, mostrando que também compartilham do genótipo zoonótico. Já em espécies de preguiças existentes não foram encontradas publicações registrando essa parasitose, é possível que este fato esteja relacionado à dificuldade de se criar estes animais em cativeiro e assim dificultando uma coleta regular de fezes para recuperar os cistos. Portanto, a positividade na amostra antiga é um achado importante que mostra que este é um parasito que circulava entre os ancestrais das preguiças atuais e outros animais do mesmo sítio. Novos estudos com outras amostras deste mesmo sítio arqueológico serão importantes para atestar a circulação desse protozoário na região.

6.4 REVISÃO DE LITERATURA: PARASITOS DE ANIMAIS EXTINTOS E SEUS VESTÍGIOS

Foram encontrados 39 trabalhos no total, sendo 14 deles sobre inclusões em âmbar. Dos outros 25: 16 utilizaram coprólitos, 4 ossos, 2 sedimentos, 1 lagerstätte (depósito sedimentar que proporciona preservação excepcional de fósseis) e 2 fóssil em rocha ou matriz. A Classe de parasitos mais encontrados foi a dos nematódeos (24 ou 43,63%) e depois os protozoários (15 ou 27,27%). Os animais estudados foram muito variados. A metodologia mais empregada nos estudos foi a microscopia óptica. Sem considerar os trabalhos com âmbar em que utilizou-se exclusivamente a microscopia, das 27 metodologias utilizadas para o diagnóstico, 20 foram por microscopia óptica (74,07%), 3 por biologia molecular (11,11%), 2 por ELISA (7,4%), 1 por análise de morfologia óssea (3,7%) e 1 por fatores lipídicos (3,7%).

6.4.1 Descrição e contribuições dos estudos

O Parasitismo é inerente a vida. Parasitos são encontrados em todas as espécies, sendo a própria vida na Terra uma possível consequência do parasitismo há 4,4-3,8 bilhões de anos (ARAUJO et al., 2003). Parasitos têm penetrado todos os nichos, suportado toda mudança e se adaptado a todo desafio. No que diz respeito a antiguidade e sucesso do parasitismo, a maioria dos fósseis exibem uma grande semelhança morfológica com seus parentes atuais (DITTMAR, 2009).

Animais extintos são tema de inúmeros estudos, os quais tentam compreender como eram, aonde e como viviam, do que se alimentavam e o motivo da extinção dessas muitas espécies que habitaram o planeta. O estudo de parasitos em amostras desses animais pode contribuir não só para o melhor entendimento da dinâmica das infecções ao longo do tempo mas também para recriar o cenário de vida desses animais

6.4.1.1 Coprólitos e sedimentos

O primeiro trabalho que se tem relato de microorganismos em coprólitos de vertebrados extintos foi feito por Renault e Bertrand em 1895, os autores estimaram uma contagem de até 140 mil bactérias por mm³ em coprólitos produzidos por vertebrados do Permiano (285-245 milhões de anos - Ma), na França. Já no século XX mais dois trabalhos pioneiros demonstram atividade microbiana fóssil, atribuído a bactéria denominada *Thiobacillus coproliticus*, em coprólitos de idade triássica (245-208 Ma) do estado do Arizona (LIPMAN; MCLEES², 1940 Apud SOUTO, 2011) e em coprólitos de idade Eocênica (58-37 Ma) do Estado de Wyoming EUA, identificando assim bactérias entéricas silificadas na forma de cocos, bastões e ovoides, e também esporos de fungos e de algas unicelulares de água doce (BRADLEY³, 1946 Apud SOUTO, 2011).

Já em 2006 surge o primeiro relato para helmintos e protozoários em coprólito mineralizado do Cretáceo (144-66 Ma). O estudo foi feito a partir de um único coprólito de dinossauro de Bernissart, na Bélgica. Foi possível observar cistos de protozoários classificados

²LIPMAN, C.; MCLEES, E. A new species of sulfuroxidizing bacteria from a coprolite. *Soil Science*, 50: 429-433, 1940

³BRADLEY, W. H. Coprolites from the bridger formation of Wyoming: their composition and microorganisms. *American Journal of Science*, 244: 215-239, 1946.

como *Entamoebites antiquus*, ovos de trematoda *Digenites proterus* e ovos de nematoda *Ascarites priscus* e *Ascarites gerus*. Apesar de ser difícil a identificação da origem dos coprólitos os autores concordam que seria provavelmente de um carnívoro, *Megalosaurus dunkeri* Dames (POINAR E BOUCOT 2006).

Em coprólito mineralizado de 240 milhões de anos pertencente a Classe Cynodontia (grupo de animais que representam a transição dos répteis para os mamíferos) foi encontrado um ovo de ascarídeo baseado no gênero descrito no trabalho de Poinar e Boucot (2006), mencionado anteriormente, classificaram como *Ascarites rufferi* n. sp. (SILVA et al. 2014). No mesmo coprólito também foi encontrado ovo de oxiurídeo. Nematódeos da ordem Oxyurida são encontrados apenas em animais que não são exclusivamente carnívoros mas que ingerem grande quantidade de plantas. O hospedeiro foi estimado por conta da grande quantidade de fósseis desses animais presentes no sítio. O ovo foi assinalado como novo gênero e espécie: *Paleoxyuris cockburni* n. gen., n. sp. Interessante que ao descobrir o ovo, o mesmo ajudou a presumir a mais provável espécie que produziu o coprólito como sendo da família Traversodontidae, que inclui mamíferos primitivos e ancestrais não mamíferos (HUGOT et al. 2014).

Silva (2013) descreve, entre outros achados, ovo de namatódeo com uma possível larva no interior encontrado em coprólito mineralizado de dicinodonte, de mesma datação que o de cinodonte descrito anteriormente, e no mesmo sítio, Sítio Cortado, RS. Não foi possível identificar o ovo em nível mais específico uma vez que não havia morfologia preservada para a comparação com espécies de nematódeos atuais.

Em um estudo no Brasil, Dias e colaboradores (2013) visualizaram ovos de cestoda em coprólito de elasmobrânqueos (peixes cartilagosos) do Paleozoico (~ 270 milhões de anos) encontrado em sítio no Paraná. Através de cortes no coprólito foi possível observar diversos ovos e estruturas embrionárias compatíveis com a classe. O hospedeiro foi identificado de acordo com os componentes da dieta presentes no coprólito, escamas de peixes e fragmentos de ossos.

Ovos de helmintos já haviam sido descritos em coprólitos recuperados da região retal de elasmobrânqueo, tubarão extinto da espécie *Cobelodus aculeatus* (Cope 1894), também proveniente do Paleozoico (570-245 Ma) (ZANGERL & CASE⁴, 1976 Apud UPENIENCE 2001).

⁴ZANGERL, Rainer; CASE, G. R. *Cobelodus aculeatus* (Cope) an anacanthous shark from Pennsylvanian black shales of North America. *Palaeontographica Abteilung A*, p. 107-157, 1976.

Uma série de trabalhos também já identificaram parasitos em coprólitos de animais extintos mais recentemente, inclusive contemporâneos à espécie humana. Ferreira e colaboradores (1993) publicaram o achado de larvas de nematódeos em coprólitos mineralizados datados de pelo menos 1,5 milhões de anos antes do presente (AP) coletados de sítios paleontológicos da região central da Itália. Os sítios estudados consistiam de cavernas usadas como abrigo por membros da família Hyenidae Gray 1860 (Mammalia, Carnivora) portanto os coprólitos foram relacionados a estes animais além de serem compatíveis à família por seu formato e tamanho. No artigo, os autores mencionam que não havia características morfológicas nas larvas que permitissem sua identificação.

Dez anos depois, Bouchet e colaboradores (2003) revelaram o achado de ovos de nematoda em sedimento de sítio arqueológico de Menez-Dregan, França, datado de 300-500 mil anos AP. Tal sedimento foi coletado pois o sítio possuía artefatos líticos humanos. No material sedimentado ovos de parasitos foram identificados como *Toxocara canis* por causa de seu tamanho e formato e atribuídos a paleohyena, uma vez que a espécie extinta *Crocota c. spelea* era a espécie carnívora predominante na região durante o pleistoceno (GUÉRIN; PATOU-MATHIS, 1996; MISKOVSKY, 2002). Porém outros canídeos poderiam representar hospedeiros potenciais. Nota-se que neste caso o hospedeiro é sugerido de acordo com a sua abundância na região e o tipo de parasito que fora encontrado, e assim como no artigo citado anteriormente a este, isso mostra a importância da correlação de diferentes estudos nas inferências sobre as descobertas em paleoparasitologia. Silva (2013) encontrou em uma amostra de outro coprólito dessecado de Hiena extinta *Crocota crocuta spelaea*, datado do pleistoceno, de San Teodoro, Itália, um cisto de protozoário multinucleado não identificado. As Hienas extintas da Europa eram grandes carnívoros, carniceiras e caçadoras e pareciam ocupar os mesmos nichos que os humanos competindo diretamente por comida (BOUCHET et al., 2003), fato que parece despertar o interesse dos paleoparasitologistas pois muitas vezes a interação da espécie humana com outros animais pode levar ao aparecimento de zoonoses.

Outro trabalho com coprólitos de hiena extinta encontrados em Haro River Quarry, de datação até 1,2 milhões de anos atrás, revela ovos similares aos de *Toxocara* sp. Este sítio, localizado no Paquistão, possuía restos de muitos animais e foi atribuído a local de maternidade de Hienas com vestígios de pelo menos oito indivíduos da hiena gigante *Pachycrocota brevirostris*, incluindo 6 juvenis. A morte de 6 hienas filhotes menores que 9 meses de idade nesse sítio foi previamente atribuído a inundação da cova, porém o achado do ovo de *Toxocara* sp. levanta a hipótese de hiperparasitose uma vez que as lesões e pneumonia causadas por

Toxocara canis, hoje, são capazes de levar à morte de juvenis de lobos e cães (ACTON et al., 2000). Além disso, *Toxocara canis* pode ser transmitido pelo aleitamento dos filhotes, associado ao fato de hienas atuais terem hábitos coprofágicos e de aleitamento comunitário, as chances de contrair e disseminar o parasito são altas. Portanto, é possível que a infecção tenha levado à morte desses filhotes (PERRI et al., 2016).

Fugassa e colaboradores (2008) publicaram um trabalho onde estudam oocistos de protozoário identificados como *Eimeria macusaniense* recuperados de coprólitos e sedimento com datações entre 10.000 a 3.500 anos AP, provenientes de sítios arqueológicos na Argentina. Os autores relatam uma diminuição no tamanho dos oocistos ao longo do tempo e relacionam esta evolução às mudanças climáticas na transição Pleistoceno – Holoceno médio, e a adaptação a novos hospedeiros, levando ao surgimento da espécie *E. macusaniensis*, a especificidade deste protozoário a camelídeos atualmente e o fato de camelídeos extintos como a *Palaeolama* sp. e *Lama gracilis* (Mammalia, Artiodactyla) já terem sido identificados na região durante a transição Pleistoceno-Holoceno os coloca como possíveis hospedeiros. Novamente a identificação do animal ao qual o coprólito é atribuído está sendo feita baseando-se no tipo de ovo encontrado e no sítio de escavação, assim a paleoparasitologia vai ajudando, também, a identificar a origem zoológica dos coprólitos de diversas regiões.

Silva (2013) também relata um diagnóstico positivo para *Giardia* sp. a partir de ensaio imunoenzimático (ELISA), feito com amostra de coprólito de *Palaeolama* sp. datado do Pleistoceno superior (~126-11,5 mil anos atrás), e proveniente de Gruta dos Brejões, Bahia. Atualmente é atribuído a este protozoário grande potencial zoonótico e tem sido detectado em camelídeos como lhamas e alpacas (KIROPES; KIRKPATRICK; BOWMAN, 1987).

Estudos de fósseis indicam que *Palaeolama* foi uma espécie de lhama gigante, cerca de duas vezes o tamanho das lhamas atuais, que habitou o território brasileiro há aproximadamente 1,8 milhões de anos até provavelmente 8 a 10 mil anos antes do presente. Pertencem ao grupo dos camelídeos, juntamente com os camelos (*Camelus bactrianus*), dromedários (*Camelus dromedarius*), guanacos (*Lama guanicoe*), lhamas (*Lama glama*) e vicunhas sul americanas (*Vicugna vicugna*) (CARTELLE, 1994).

Na França, a caverna Caune de L' Arago, Pyrenees-orientales é um sítio que foi ocupado por humanos e outros animais por 300.000 anos, sendo de grande interesse para estudo. Neste sítio, foi encontrado um coprólito datado de 550.000 anos, época correlata a um período seco e frio naquela região. Neste coprólito, após reidratado, foi possível visualizar um ovo característico de Dicrocoelidae. A origem do coprólito é incerta, porém a presença de ossos

indica pertencer a um carnívoro, sabendo que os outros mamíferos que habitavam a caverna eram canídeos, felídeos e ursídeos, e o formato oval do coprólito não condizia com os dois primeiros sendo portanto, atribuído ao terceiro. Além disso, atualmente *Dicrocoelium* sp. já foi encontrado parasitando ursídeos. Os fósseis de ursídeos na caverna incluem *Ursus arctos* e o extinto *Ursos deningeri* (Mammalia, Carnivora). Porém, por possuírem uma dieta muito variável, o pseudoparasitismo não foi descartado (JOUY-AVANTIN et al., 1999).

Os primeiros relatos de helmintos em coprólitos de animais extintos referem-se a preguiças terrícolas. Apesar da ampla distribuição que as preguiças tiveram nas Américas (Phyllophaga, Xenarthra) quase todas foram extintas (STEADMAN et al., 2005).

Em 1938, Laudermilk e Munz fizeram um estudo objetivando pesquisar componentes de dieta em coprólito de "Nothrotherium" (= *Nothrotheriops shastensis*), Rampart Cave, Arizona, EUA, porém descreveram a presença de vários ovos de nematódeos preservados (LAUDERMILK; MUNZ⁵, 1938 Apud SCHMIDT et al., 1992).

Ringuelet em 1957 descreveu ovos semelhantes aos de nematódeos em coprólito de preguiça extinta da espécie *Myiodon histai* (Ameghino 1889) datado de 10.832±400 anos atrás, proveniente de sítio Caverna de Ultima Esperanza, Patagônia chilena. Posteriormente, Schmidt e colaboradores (1992) descreveram ovos de helmintos e cistos de protozoários de coprólito identificado como proveniente de outra espécie de preguiça extinta *Nothrotheriops shastensis*, datado de aproximadamente 10.500 anos atrás, em Rampart Cave, Estados Unidos. O trabalho descreve como novas espécies devido a antiguidade do material: *Archeococcidia nothrotheriopsae* n.sp., *Archeococcidia antiquus* n. sp., *Strongyloides shastensis* n. sp. e *Agamofilaria oxyura* n. sp.

Em trabalho realizado com coprólitos, de até 6.368±31AP, de aves extintas, Moa (Aves: Dinornithiformes), da Nova Zelândia (WOOD et al. 2013) foram feitas tanto análises microscópicas quanto de aDNA. Nas análises microscópicas foram observados ovos de nematódeos similares aos de *Heterakoidea* spp., Trichinellidae e um tipo não identificado. Já nas análises de aDNA os autores encontram resultados compatíveis com apicomplexa (espécie de *Cryptosporidium* e subordem Eimeriorina), Nematoda (superfamília Heterakoidea e família Trichostrongylidae) e Trematoda (ordem Echinostomida). Assim, enquanto que com a microscopia óptica foi possível reconhecer ovos similares apenas com uma classe, com a biologia molecular detectou-se a presença também de outras duas, reafirmando a importância

⁵LAUDERMILK, J. D.; MUNZ, P. A. Plants in the dung of *Nothrotherium* from Rampart and Muav Caves, Arizona. Carnegie Institution of Washington. Publication No 487: 271-281, 1938.

da multidisciplinaridade e a utilização de diferentes técnicas na paleoparasitologia.

A extinção de espécies não é um processo necessariamente muito antigo, e extinções mais recentes podem dizer muito sobre como e porque ocorrem, principalmente quando surge a espécie humana modificando os habitats. Nunes e colaboradores (2016) investigaram coprólitos de caprino extinto, de Mallorca, região oeste do Mediterrâneo, datado de 4950 ± 38 anos AP, e identificaram cisto de *Entamoeba* sp. somente pela microscopia, nove das amostras foram positivas para *Cryptosporidium* sp. no imunoenzimático (ELISA). Essa espécie de caprino foi extinta após a chegada dos humanos e seus animais domésticos na região, estas por sua vez atualmente albergam diferentes parasitos dos encontrados nesse estudo. Os autores consideram que a introdução de espécies domesticadas juntamente com parasitos que não existiam na região antes possa ter contribuído como um fator chave para a extinção da espécie *Myotragus balearicus* Bate 1909.

Em artigo publicado por Bajdek e colaboradores (2015) sete coprólitos mineralizados foram estudados. A análise foi feita a partir de cortes finos e observação ao microscópio. Uma série de estruturas foram então visualizadas e identificadas: fragmentos de ossos, escamas de peixes, fungos, bactérias, cianobactérias, invertebrados, protistas, possíveis ovos de invertebrados. Os coprólitos foram recuperados do sítio Bykovka Quarry, Vyazniki, Rússia e representa a transição do Permiano tardio para Triássico inferior (~250 Ma). As espécies que provavelmente produziram os coprólitos foram assinaladas como sendo de grandes terocéfalos (ancestrais dos mamíferos) (e.g. *Moschowiaisia vjuschkovi*), e médio a grande arcosauromorfos *Archosaurus rossicus* (grupo de répteis que surgiu no Permiano).

6.4.1.2 Fósseis em rocha

Crassey e Patterson em 1973 fizeram a primeira descoberta de fósseis copépodes parasitos, datados de aproximadamente 100 milhões de anos. Copépodes (Arthropoda, Crustacea) tanto parasitos quanto de vida livre, são abundantes hoje em ambientes marinhos e de água doce. Os espécimes foram encontrados nas câmaras branqueais de dois crânios de peixes teleósteos *Cladocycclus gardneri* (Agassiz, 1841), durante uma preparação em ácido acético. Os peixes foram recuperados de Formação Santana, Serra do Araripe, Ceará, Brasil. A Formação Santana possui fósseis datados do Cretáceo inferior, provavelmente Aptiana (~113.0–125.0 ma). *Cladocycclus gardneri*, o peixe hospedeiro, é um membro da família Ichthyodectidae, um grupo extinto de peixes teleósteos primitivos que vão do Jurássico superior

ao Cretáceo superior. Ostracodes, que são pequenos crustáceos associados aos peixes analisados nesse estudo, indicam que eles morreram em água doce, porém a superfamília Dichelesthioidea a que o parasito é relacionado é exclusivamente marinha, levando a hipótese de que estes peixes teriam adquirido os parasitos no mar e depois migraram para água doce. Além disso como é aceito que todos os parasitos evoluíram de ancestrais de vida livre, a descoberta de copépodes parasitos no Cretáceo inferior indica que os de vida livre já existiam antes disso.

Outro trabalho que chama atenção, é provavelmente a evidencia mais antiga de parasitismo que se tem publicado. Trata-se de estruturas circulares semelhantes a ganchos compatíveis aos de atuais platelmintos e acantocéfalos. Essas estruturas foram encontradas em fósseis de 13 juvenis de *Asterolepis ornata* Eichwald sensu Agassiz, 1840 e em 24 espécimes de *Lodeacanthus gaujicus* Upeniece, 1996, que são peixes pré-históricos, recuperados de Lode clay quarry, Latvia; datados do Devoniano (aprox. 882,7 milhões de anos). Muitos deles infectados com 2 a 9 parasitos cada, sendo ao todo 67 parasitos encontrados (UPENIENCE, 2001). O Devoniano marca o surgimento dos primeiros vertebrados.

Também em matriz rochosa um fóssil extremamente bem preservado de piolho foi coletado da cratera Eckfeld na Alemanha. O espécime datado de aproximadamente 44 milhões de anos mostra afinidades com piolhos de aves aquáticas. Baseado em análises filogenéticas possivelmente seus hospedeiros eram os ancestrais de anseriformes ou charadriiformes, porém o fóssil não se encontrava associado a nenhum deles. Foi denominada nova espécie *Megamenopon rasnitsyni* sp. nov. (WAPPLER et al. 2004).

Martill e Davis (1998) descobriram ovos similares a de ácaros em fóssil de pena de 120 milhões de anos da Formação Crato, região nordeste do Brasil. Acredita-se que ectoparasitos de aves tenham uma longa história de evolução tornando-os específicos. A descoberta de dinossauros com penas e os achados antigos destes ectoparasitas do Cretáceo inferior sugere que as aves podem ter herdado alguns ectoparasitos de dinossauros tetrápodes com penas.

6.4.1.3 Tecido

Apesar da maioria dos animais extintos citados aqui terem vivido num passado mais distante, alguns grupos tem estudado animais cuja extinção ocorreu mais recentemente. É o caso do Wyatt e colaboradores (2008). Os autores fizeram um estudo, através da biologia molecular, a partir de amostras de pele de duas espécies nativas, *Rattus macleari* e *Rattus*

natwitatis, de Christmas Island, no leste do Oceano Índico. As espécies foram extintas em um período de tempo muito curto de 9 anos (entre 1899 e 1908). A hipótese que já havia sido levantada por Durham (1908) era de que a espécie exótica *Rattus rattus* teria sido introduzida e carregado consigo pulgas infectadas por um tripanossomatídeo que por sua vez teriam encontrado nas espécies nativas hospedeiros susceptíveis e sensíveis que não resistiram a esta nova doença. No estudo os autores encontraram DNA de *Trypanosoma lewisi* em espécimes coletadas após a introdução da espécie invasora, enquanto o mesmo não foi verificado em espécimes coletadas antes de *Rattus rattus* chegar à ilha. Assim, a possibilidade da razão da extinção das espécies nativas ter sido pela infecção por *T. lewisi* não pode ser descartada.

6.4.1.4 Osso

Trabalhos dentro da paleopatologia também podem apontar para infecções que ocorreram em animais extintos sem, necessariamente, detectar o patógeno. Autores consideram modificações no osso craniano de tiranosaurídeo, compatíveis com lesões atualmente encontradas em aves causadas pela tricomoniase (*Trichomonas gallinae*) (WOLFF et al. 2009). Além de evidenciar a infecção no passado esse trabalho evidencia uma relação entre aves e dinossauros.

A identificação de patologia óssea característica de infecção por tuberculose em fóssil de bisão extinto (*Bison cf. antiquus*) da América do Norte, levou a estudos de DNA que comprovaram que bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* já circulavam em animais há mais de 17.000 anos atrás (ROTHSCHILD et al. 2001). Além do estudo com DNA, o mesmo fóssil de bisão teve fatores de virulência lipídicos característicos da infecção detectados (LEE, et al. 2012). Essa lesão óssea característica de tuberculose já havia sido encontrada em fósseis de ovelhas (*Ovis canadensis catclawensis*) e o boi extinto almiscarado (*Bootherium bombifrons*) do mesmo sítio arqueológico (Natural Cave Trap, em Wyoming). Esta caverna corresponde a uma câmara de 30 metros de profundidade e 4 metros de abertura que por mais de 100.000 anos sepultou animais como ursos, lobos, raposas e outros, até mesmo mamutes, sua profundidade tornava as quedas quase sempre fatais e a baixa temperatura (4-5°C) preservou os ossos. A presença das lesões características nos bovídeos e a confirmação por DNA no referido bisão indica que a tuberculose era disseminada no Pleistoceno tardio. Além disso, por não ter sido encontrado tais lesões em espécimes de *Antilocapra americanus* e

Equus spp. da região suspeita-se que a doença teria chegado com os bovídeos vindos do Norte (ROTHSCHILD et al. 2001).

6.4.1.5 Âmbar

Além das informações paleoparasitológicas que se pode recuperar diretamente de vestígios de vertebrados, tem-se também uma extensa variedade de estudos realizados a partir de âmbar, nos quais já foram identificados muitos protozoários. Por adquirir forma sistêmica nos hospedeiros vertebrados, são dificilmente encontrados pelos métodos tradicionais de microscopia em vestígios animais. Porém, quando os hospedeiros invertebrados foram aprisionados no âmbar ocorreu uma preservação de sua morfologia que muitas vezes pode então ser observada ao microscópio, levando luz aos protozoários do passado. Além disso, parasitos de invertebrados também são descritos em muitas peças de âmbar apresentando belas imagens.

O âmbar é uma resina produzida por algumas espécies vegetais que endurece quando exteriorizada, aprisionando assim animais pequenos como insetos. Ao endurecer o inseto fica preservado e também os parasitos a ele associados.

Em um artigo de 2004, Poinar e Poinar descreveram a presença de tripanossomatídeos em intestino de flebotomíneo aprisionado em âmbar de Burma, datado de aproximadamente 100-110 milhões de anos atrás. A identificação foi feita por microscopia, então os autores classificaram como novo gênero e espécie, *Paleoleishmania proterus* n. sp. Neste estudo estabeleceu-se *Paleoleishmania proterus* como o primeiro fóssil de Kinetoplastea provendo idade mínima para tripanossomatídeos digenéticos, e demonstrando que a associação protozoário-vetor já se estabelecia no Cretáceo Inferior.

Em 2007, Poinar identificou por microscopia flagelados em debris adjacentes a duas larvas de flebotomíneos aprisionadas em âmbar do Albiano superior do Cretáceo inferior (~105-100 Ma). Após polir o âmbar até o intestino médio de uma delas também foi possível observar flagelados, confirmando a associação parasitária. Os flagelados foram identificados como promastigotas da família dos tripanossomatídeos. Neste trabalho o autor considera que a presença dos flagelados no intestino da larva se deu pela ingestão das formas ambientais, sendo assim, seria possível que o ciclo vetor-hospedeiro vertebrado teria tido início por essa ingestão das formas parasitárias que permaneceriam no inseto até a forma adulta e então seriam transmitidos para vertebrados.

Em outro trabalho Poinar (2008) identificou no interior do trato alimentar de espécie extinta de *Lutzomyia adiketis* n. sp. o que seriam amastigotas, promastigotas e paramastigotas de tripanosomatídeos identificados como nova espécie *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. O inseto corresponde a uma inclusão em âmbar dominicano sendo este a primeira evidência fóssil de que flebotomíneos neotropicais já seriam vetores de tripanossomatídeos no Terciário médio (~30–20Ma) (POINAR Jr, 2008).

Em 2005 Poinar e Poinar descreveram uma série de achados em âmbar: em uma peça de âmbar de Burma do Cretáceo de cerca de 105-100 Ma, inseto da família Ceratopogonidae que em seu interior também possuía tripanossomatídeo, além de uma espécie de vírus chamado cypovirus (“Cytoplasmic polyhedrosis vírus – CPV”); um inseto flebotomíneo com um possível “nuclear polyhedrosis vírus – NPV”; e em âmbar dominicano espécies de fungos ectoparasitas em cutícula de mosquito *Culex*; crescimento fúngico em mosquito (Mycetophilidae) podendo chegar a mais de 40 Ma e em âmbar de uma lagarta (Lepidoptera) com tumores na cavidade corporal possivelmente de etiologia viral podendo alcançar 26 milhões de anos (POINAR; POINAR, 2005).

Outros tripanosomatídeos também já foram identificados em um interessante trabalho de Poinar (2005), onde o autor descreve o achado de inclusões em âmbar sendo uma delas de triatomíneo, nele havia uma gota fecal adjacente onde pode ser visualizado formas flageladas semelhantes a *Trypanosoma cruzi*. O âmbar da República Dominicana, mina de La Toca, datado de até 45 milhões de anos foi polido e levado ao microscópio. Os flagelados foram nomeados de *Trypanosoma antiquus* sp. n., uma nova espécie. Na mesma peça de âmbar haviam inclusões de outros dois artrópodes hematófagos e pelos de mamíferos compatíveis morfológicamente com pelos de morcegos. O conjunto de 3 artrópodes hematófagos e os pelos levam a hipótese de que a resina estava sendo depositada em cavidade de árvore habitada pelo hospedeiro mamífero, possivelmente morcego. Os morcegos são considerados os hospedeiros originais para triatomíneos que por sua vez são considerados vetores originais para *Trypanosoma schizotrypanum*. Sendo assim, *T. antiqua* sp. n. poderia ter sido parasito de morcego servindo de progenitor para linhagens que viriam a infectar outros mamíferos incluindo humanos.

Neste mesmo âmbar, no interior do outro inseto hematófago, o mosquito de gênero semelhante a *Culex*, foi possível a visualização através da microscopia óptica de formas evolutivas de *Plasmodium*. Foi nomeado então nova espécie, *Plasmodium domenicana* n. sp.

Interessantemente o intestino médio do mosquito apresentava células sanguíneas em decomposição indicando que o mesmo havia se alimentado pouco tempo antes de morrer.

Mas este não foi o único relato de *Plasmodium* em insetos preservados em âmbar, Poinar e Telford (2005) publicaram também outro artigo, de âmbar de Burma ainda mais antigo, datado de 100 milhões de anos atrás. Nele, um inseto provavelmente do gênero Protoculicoides (Ceratopogonidae: Diptera) foi analisado por microscopia e após o polimento do âmbar foi possível identificar oocistos no interior do abdômen do inseto, e no interior dos oocistos, esporozoítas. Analisando os caracteres morfológicos dos parasitos e por sua datação extrema se denominou novo gênero e espécie *Paleohaemoproteus burmactis* n. sp. Ainda através da análise morfológica do inseto e parasito os autores apontaram que o hospedeiro era, possivelmente, animais de sangue frio como grandes lagartos, crocodilianos ou dinossauros. Sendo este o primeiro relato de malária e de que répteis poderiam ter se infectado por haemosporida no Cretáceo superior (POINAR Jr. e TELFORD, Jr. 2005).

Ainda mais recentemente, em 2011, Poinar descreveu novo gênero de *Plasmodium* de morcego em âmbar domenicado de possíveis 45-30 milhões de anos. Estágios evolutivos foram encontrados no interior de fóssil da família Streblidae (em inglês *bat fly*). A presença nas glândulas salivares do inseto mostra a eficiência do mesmo como vetor. A espécie foi classificada como *Vetufebus ovatus* Poinar n. sp. (2011) denominado *Cretacimermis protus* n. sp. emergindo do abdome do inseto adulto, membro da família Ceratopogonidae (Diptera). O aparecimento de linhagens do parasito e *C. protus* mostra que a associação parasitária com Ceratopogonidae tem ocorrido desde pelo menos o Cretáceo superior. Existem ainda uma série de trabalhos descrevendo parasitos de invertebrados descritos em âmbar e as imagens capturadas são magníficas. Acredita-se que a luta do inseto ao tentar se livrar da resina até o momento de sua morte estimulava o parasito a deixar o hospedeiro e portanto o que se tem são belas imagens deste momento “congelado” no tempo.

A maioria dos trabalhos selecionados na revisão utilizam a microscopia óptica como método, apesar de já haver estudos pela biologia molecular e métodos de imunodiagnóstico estes ainda são inexpressivos, isso pode ser explicado tanto pelas dificuldades dessas novas técnicas, quanto ainda pelo seu alto custo, principalmente a biologia molecular.

Ao se tratar de âmbar, a microscopia é o único método que se tem utilizado até agora. Por serem geralmente espécimes de milhões de anos, o âmbar proporciona uma preservação excepcional e a transparência da resina permite a visualização de estruturas delicadas sendo

possível inclusive a identificação de protozoários no interior dos insetos aprisionados. Muitos dos artigos analisados não mencionam a palavra “paleoparasitologia”, no entanto estudam as infecções em animais extintos. Ainda foi possível constatar que a análise de ossos de animais extintos são um tema vasto, tendo muitos trabalhos que mostram infecções ósseas no passado e tentam recriar os eventos que propiciaram o aparecimento de tais lesões. Porém, por serem estudos exclusivos de morfologia óssea eles não foram avaliados no presente estudo.

Foram confeccionadas 3 tabelas com os resultados da revisão de literatura sobre parasitos em animais extintos. Elas foram dispostas em apêndices. Além disso foi publicada uma mini-revisão sobre parasitos no passado, disposta no ANEXO 5.

6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como pode ser observado, a pesquisa com material antigo é onerosa e cheia de dificuldades, fato que também motivou a publicação de um capítulo de livro em um E-book (ANEXO 6). Ainda que muitas vezes se preconize o uso de metodologias de nova geração por acarretarem grandes avanços nessa área, nesse estudo a metagenômica não teve êxito. Além de ter um custo muito alto e ser preciso muitos cuidados para evitar contaminação, tornando-se impraticável para muitos grupos de pesquisa da área. No entanto, com a revisão de literatura mostramos que há ainda muito a se fazer nesse campo do conhecimento, e que inovações em metodologias que já existem também são promissoras. O resultado que obtivemos reaproveitando amostras pode ser de grande valor para estudo com amostras raras por usar pouco material. E por serem mais baratos, os testes imunocromatográficos mostraram-se um bom método qualitativo para triagem de amostras antigas positivas para protozoários, e nesse trabalho foram os únicos testes capazes de detectar um dos parasitos de interesse, mostrando a circulação de *Giardia duodenalis* entre animais da megafauna do Brasil.

7. CONCLUSÃO

A sequência obtida para amostras ósseas de preguiça terrícola (*Eremotherium*) com os alvos para *T. cruzi* mostraram similaridade com bactérias que podem estar presentes no solo, mas também que biodegradam espuma de poliestireno. Já com os alvos para *T. gondii* e hospedeiro não foram obtidos resultados para sequenciamento.

As reações utilizando o alvo para *T. gondii* geraram resultados inconsistentes portanto será necessário rever a metodologia.

A sequência de alta qualidade obtida com os *primers* para triatomíneo para a amostra 768 de roedor e que não mostrou similaridade com nenhuma do Genbank, mostra que muito ainda está para ser desvendado.

A ausência de DNA de triatomíneo nas amostras animais podem ser um indicativo de que esse artrópode não era comumente ingerido por esses animais ou que não o foi no momento retratado pelos coprólitos estudados.

Não se obteve êxito no diagnóstico molecular de *Giardia* em coprólitos de palaeolama mesmo naquelas previamente positivas pelo imunodiagnóstico.

A metodologia padronizada para o alvo hospedeiro de *Lama glama* em coprólitos experimentais se mostrou promissora para o seu estudo em coprólitos de camelídeos extintos, contudo, isso não foi possível nesse estudo devido a possíveis contaminações no material antigo.

O ensaio metagenômico não gerou resultado sendo alegado baixa qualidade do DNA pela empresa que realizaria o mesmo.

Para estudos paleoparasitológicos de *Eimeria* sp. e *Pentatrichomonas* sp. os modelos experimentais não funcionaram, portanto serão necessários novos ensaios.

O teste imunocromatográfico para pesquisa de antígenos de *T. gondii* se mostrou promissor para futuras pesquisas paleoparasitológicas.

O teste imunocromatográfico para a detecção de antígeno de *Giardia duodenalis* de amostras humanas mostrou-se sensível a diferentes genótipos, até mesmo aqueles provenientes ovinos e felinos.

A metodologia proposta para reaproveitar o resíduo que sobra da extração do DNA em teste imunocromatográfico e vice-versa mostrou-se eficiente, tanto nas amostras frescas quanto nos coprólitos experimentais.

Giardia duodenalis provavelmente circulava entre os animais extintos da megafauna na região do Morro do Chapéu, Estado da Bahia há pelo menos 10.000 anos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACTON, Anne E.; MUNSON, Linda; WADDELL, William T. Survey of necropsy results in captive red wolves (*Canis rufus*), 1992-1996. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 31: 2-8. 2000.
- ALLISON, Marvin J.; BERGMAN, Tamara; GERSZTEN, Enrique. Further Studies on Fecal Parasites in Antiquity. *Am J Clin Pathol*, 112 (5): 605-609, 1999.
- ALVES, Elizabeth Brito da Silva. *Avaliação da dinâmica das parasitoses intestinais com caráter zoonótico nas áreas urbana e rural no município de Guapimirim/Rj*. Rio de Janeiro, 2016. Dissertação de Mestrado (Medicina de Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.
- ARAÚJO, Adauto.; JANSEN, Ana Maria; REINHARD, Karl; FERREIRA, Luiz Fernando. Paleoparasitology of Chagas disease - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro Vol. 104(Suppl. I): 9-16, 2009.
- ARAÚJO, Adauto; JANSEN, Ana Maria; BOUCHET, Françoise; REINHARD, Karl; FERREIRA, Luiz Fernando. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 98 (Suppl. I): 5-11. 2003.
- FARIÑA, R. A.; CASTILLA, R. Earliest evidence for human-megafauna interaction in the Americas. *Bar International Series*, v. 1627, p. 31, 2007.
- AUFDERHEIDE, Arthur C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, L. E. JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci*, v.101: 2034-2039, 2004.
- BARNOSKY, Anthony D. Megafauna Biomass Tradeoff as a Driver of Quaternary and Future Extinctions. In: AVISE, John C.; HUBBELL, Stephen P.; AYALA, Francisco J. *In the Light of Evolution: Volume II: Biodiversity and Extinction*. Washington D. C.: National Academy of Sciences. National Research Council. 2008, p. 432. Vol. II, cap. 12, p. 227-241.
- BARNOSKY, Anthony D.; LINDSEY, Emily L. Timing of Quaternary megafaunal extinction in South America in relation to human arrival and climate change. *Quaternary International*. v. 217, Issues 1-2, p. 10-29, 2010
- BELTRAME, M. O.; FUGASSA, M. H.; SARDELLA, N. H. First Paleoparasitological Results From Late Holocene in Patagonian Coprolites. *J. Parasitol.*, 96(3), pp. 648-651, 2010.
- BERGQVIST, Lilian Paglarelli; ALMEIDA, Edmilson Batista. Biodiversidade de mamíferos fósseis brasileiros. *Revista Universidade de Guarulhos. Geociências* IX(6): 54-68, 2004.
- BOUCHET, Françoise; ARAÚJO, Adauto; HARTER, Stephanie; CHAVES, Sérgio Miranda; DUARTE, Antonio Nascimento; MONNIER, Jean Laurent; FERREIRA, Luiz Fernando. *Toxocara canis* (Werner, 1782) Eggs in the Pleistocene Site of Menez-Dregan, France (300,000-500,000 Years Before Present). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 98(Suppl. I): 137-139, 2003

- CALLEN, Eric O. & CAMERON, T. W. M. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Scientist*. 8: 35-40. 1960.
- CARTELLE, Cástor. Tempo passado. Mamíferos do Pleistoceno em Minas Gerais., Belo Horizonte: *Editora palco*, 1994, 131 p. *Revista Brasileira de Zoologia* 2 (1994): 229-254, 1994.
- CARTELLE, Cástor; DE IULIIS, Gerardo. *Eremotherium laurillardi*: the Panamerican late Pleistocene megatheriid sloth. *Journal of Vertebrate Paleontology*, v. 15, n. 4, p. 830-841, 1995.
- CARTELLE, Cástor; DE LULIIS, Geraldo. *Eremotherium Laurillardi* (Lund) (Xenarthra, Megatheriidae), the Panamerican giant ground sloth: Taxonomic aspects of the ontogeny of skull and dentition. *Journal of Systematic Palaeontology* 4 (2): 199-209 p., 2006
- CARTELLE, Cástor. Preguiças terrícolas, essas desconhecidas. Separata de: Ciência Hoje/Paleontologia. Rio de Janeiro. Instituto Ch. Vol. 27 nº 161, p. 18-25, junho, 2000.
- CEBRA, Christopher K.; STANG, Bernadette V.; SMITH, Courtney C. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection of *Eimeria macusaniensis* in camelid feces. *AJVR*, Vol 73, No. 1, 2012.
- CHARTIER, Christophe; PARAUD, Carine. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Ruminant Research*, v. 103, n. 1, p. 84-92, 2012.
- COOPER, Alan.; POINAR, Hendrik N. Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, Vol. 289 (5482), p.1139, 2000.
- CRESSEY, Roger; PATTERSON, Colin. Fossil parasitic copepods from a Lower Cretaceous fish. *Science*, v. 180, n. 4092, p. 1283-1285, 1973.
- CZAPLEWSKI, Nicholas J.; CARTELLE, Cástor. Pleistocene bats from cave deposits in Bahia, Brazil. *Journal of mammalogy*. 79(3):784-803. 1998
- DEELDER, A. M.; MILLER, R. L.; DE JONGE, N.; KRIJGER, F. W. (1990). Detection of schistosome antigen in mummies. *The Lancet*, 335(8691), 724-725.
- DELAMUTA, Jakeline Renata Marçon; RIBEIRO, Renan Augusto; ORMEN-ORRILLO, Ernesto; MELO, Itamar Soares; ROMERO Esperanza Martínez; HUNGRIA, Mariangela. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3342–3351 2013
- DENTZIEN-DIAS, Paula C.; POINAR JR., George; FIGUEIREDO, Ana Emilia Q.; PACHECO, de Ana Carolina L.; HORN, Bruno L. D.; SCHULTZ, Cesar L. Tapeworm Eggs in a 270 Million-Year-Old Shark Coprolite. *PLoS ONE* 8(1), e55007, 2013.
- DITTMAR, Katharina. Old Parasites for a New World: The Future of Paleoparasitological Research. A Review. *Journal of Parasitology*, 95(2):365-371. 2009.
- DITTMAR, Katharina. Paleoparasitologia e DNA antigo. In: FERREIRA, Luiz Fernando; REINHARD, Karl Jan; ARAUJO, Adauto. *Fundamentos da Paleoparasitologia.*, Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 2011, p. 484, cap 18, p. 287-299.

DU, Zong-Jun et al. *Corynebacterium marinum* sp. nov. isolated from coastal sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 60, n. 8, p. 1944-1947, 2010.

DUARTE, Antônio Nascimento. *Estudo paleoparasitológico em Coprólitos do Sítio Arqueológico da Furna do Estrago Município do Brejo da Madre de Deus, Pernambuco – Brasil*. Itaguaí, 2013. 117 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – Instituto de Biologia Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1994.

DUBEY, Jitender P. The History of *Toxoplasma gondii* - The First 100 Years. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 55(6), pp. 467–475, 2008.

DURHAM, Herbert E. Notes on Nagana and on some Haematozoa observed during my travels. *Parasitology*, v. 1, n. 3, p. 227-235, 1908.

EECKHAUT, Venessa; IMMERSEEL, Filip Van; CROUBELS, Siska; BAERE, Siegrid De; HAESBROUCK, Freddy; DUCATELLE, Richard; LOUIS, Petra; VANDAMME, Peter. Butyrate production in phylogenetically diverse Firmicutes isolated from the chicken caecum. *Microbial Biotechnology*, 4(4), 503–512, 2011.

FAULKNER, Charles T.; PATTON, Sharon; JOHNSON, Sandra Strawbridge. Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, Van Buren County, Tennessee. *The Journal of parasitology*, p. 461-463, 1989.

FENG, Yaoyu; XIAO, Lihua. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of Giardia Species and Giardiasis†. *Clin. Microbiol.* VOL. 24, 2011

FERNANDES, Alexandre; IÑIGUEZ, Alena M.; LIMA, Valdirene S.; SOUZA, Sheila MF Mendonça; FERREIRA, Luiz Fernando; VICENTE, Ana Carolina P.; JANSEN, Ana M. 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*, Vol. 103(5): 514-516, 2008.

FERREIRA, L. F.; ARAUJO, A.; DUARTE, A. N. Nematode larvae in fossilized animal coprolites from Lower and Middle Pleistocene sites, Central Italy. *The Journal of parasitology*, p. 440-442, 1993.

FERREIRA, L. F.; BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; FERNANDES, O.; REINHARD, Karl; ARAÚJO, Adauto. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Acta Tropica*. 75; 79–84, 2000.

FERREIRA, Luiz Fernando; JANSEN, Ana Maria; ARAÚJO, Adauto. Chagas disease in prehistory. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83(3): 1041-1044, 2011.

FERREIRA, Luiz Fernando; REINHARD, Karl; ARAÚJO, Adauto. *Paleoparasitologia*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. p. 128 (Coleção Temas em Saúde).

FERREIRA, Luiz Fernando. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 98 (Suppl. I): 5-11. 2003.

FILHO, Reginaldo Peçanha; FILHO, José Dilermando Andrade. Artropodes e Parasitos Encontrados em Âmbar In: FERREIRA, Luiz Fernando; REINHARD, Karl Jan; ARAUJO, Adauto. *Fundamentos da Paleoparasitologia.*, Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 2011, p. 484, cap 10, p. 161-170.

FIORELLI, Lucas. E.; EZCURRA, Martín D.; HECHENLEITNER, E. Martín; ARGAÑARAZ, Eloisa.; TABORDA, Jeremias R. A.; TROTTEYN, M. Jimena; BACZKO, M. Belén; DESOJO, Julia B. The oldest known communal latrines provide evidence of gregarism in Triassic megaherbivores. *Scientific Reports*, 3: 3348. 2013.

FORNACIARI, G.; GIUFFRA, V.; FERROGLIO, E.; GINO, S.; BIANUCCI, R. *Plasmodium falciparum* immunodetection in bone remains of members of the Renaissance Medici family (Florence, Italy, sixteenth century). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 104, n. 9, p. 583-587, 2010.

FREIRE, Andressa dos Santos. *Paleoparasitologia da echinostomíase no Brasil*. Niterói 2015. 88 f. Tese (Mestrado Microbiologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2015.

FRÍAS, Liesbeth; LELES, Daniela; ARAÚJO, Adauto. Studies on protozoa in ancient remains- A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 1, p. 1-12, 2013.

FUGASSA, Martín H; BARBERENA, Ramiro. Cuevas y Zoonosis Antiguas: Paleoparasitología del Sitio Orejas de Burro 1 (Santa Cruz, Argentina). *MAGALLANIA*, (Chile), Vol. 34(2):57-62, 2006.

FUGASSA, Martín Horacio; BELTRAME, María Ornela; BAYER, María S; SARDELLA, Norma Haydée. Zoonotic parasites associated with felines from the Patagonian Holocene. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(8): 1177-1180, 2009.

FUGASSA, Martín Horácio; SARDELLA, N. H.; TAGLIORETTI, V.; REINHARD, Karl. J.; ARAÚJO, Adauto. Eimeriid oocysts from archaeological samples in Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology*. 94: 1418-1420, 2008.

FULTON, Tara L. Setting Up an Ancient DNA Laboratory. In: SHAPIRO, Beth; HOFREITER, Michael editors. *Ancient DNA – Methods and Protocols*. New York: Publisher Humana Press, 840:1-11, p. 247, 2012.

GARAYZÁBAL, J. F. Fernández; EGIDO, R.; VELA, A. I.; BRIONES, V.; COLLINS, M. D.; MATEOS, A.; HUTSON, R. A.; DOMÍNGUEZ, L.; GOYACHE, J. Isolation of *Corynebacterium falsenii* and description of *Corynebacterium aquilae* sp. nov., from Eagles. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53, 1135–1138, 2003.

GOLENBERG, Edward M.; BICKEL, Ann; WEIHS, Paul. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 24, n. 24, p. 5026-5033, 1996.

GOMES, Dougla Fabiano; BATISTA, Jesiane Stefânia da Silva; ROLLA, Amanda Alves Paiva; SILVA, Luciano Paulino da; BLOCH, Carlos.; GALLI-TERASAWA, Lygia Vitoria; HUNGRIA, Mariangela. Proteomic analysis of free-living *Bradyrhizobium diazoefficiens*: highlighting potential determinants of a successful symbiosis. *BMC Genomics*, 15:643, 2014.

GONÇALVES, Marcelo Luiz Carvalho; ARAUJO, Adauto; DUARTE, Rosemere; SILVA, Joaquim Pereira da; REINHARD, Karl; BOUCHET, Françoise; FERREIRA, Luiz Fernando. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. 6, p. 640-643, 2002.

GONÇALVES, Marcelo Luiz Carvalho; ARAÚJO, Adauto; FERREIRA, Luis Fernando. Human Intestinal Parasites in the Past: New Findings and a Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 98(Suppl. I): 103-118, 2003.

GOOKIN, Jody L.; STAUFFER, Stephen H.; LEVY, Michael G. Identification of *Pentatrichomonas hominis* in feline fecal samples by polymerase chain reaction assay. *Veterinary Parasitology*, v. 145, n. 1, p. 11-15, 2007.

GREENWOOD, Alex D.; CASTRESANA Jose; FELDMAIER-FUCHS Gertraud; PAABO, Svante. A Molecular Phylogeny of Two Extinct Sloths. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 18, No. 1, p. 94-103, 2001.

GUÉRIN, Claude; PATOU-MATHIS, Marylène. Les grands mammifères plio-pléistocènes d'Europe. Paris etc.: Masson, 1996.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; VALLEJO, G. A.; YOCKTENG, R.; CARDENAS-ARROYO, F.; FORNACIARI, G.; ARRIAZA, B.; AUFDERHEIDE, A. C. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4.000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Am J Phys Anthropol* 108: 401-407. 1999.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; YOCKTENG, R.; VALLEJO, G. A.; CARDENAS-ARROYO, F.T. *cruzi* DNA in human mummies. *Lancet* 349: 1370. 1997.

HALKYER, Nancy Carolina Orellana. *Paleogenética de populações pré-colombianas da Bolívia: Análises do mtDNA humano, e infecções por Trypanosoma cruzi e vírus linfotrópico das células T humanas (HTLV)*. Rio de Janeiro 2008. 85 f. Tese (Mestrado em Biologia Parasitária) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

HAMILTON, Patrick B.; TEIXEIRA, Marta M. G.; STEVEN, Jamie R. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. *Trends in Parasitology*, v. 28, n. 4, p. 136-141, 2012.

HANIA, Wajdi Ben; GODBANE, Ramzi; POSTEC, Anne; HAMDÍ, Moktar; OLLIVIER, Bernard; FARDEAU, Marie-Laure. *Defluviitoga tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a thermophilic bacterium isolated from a mesothermic and anaerobic whey digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1377-1382, 2012.

HIGUCHI R.; BOWMAN B.; FREIBERGER M. *et al.* DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature*, 312: 282-284, 1984.

HUGOT, Jean-Pierre; GARDNER, Scott L.; BORBA, Victor; ARAUJO, Priscilla; LELES, Daniela; DA-ROSA, Átila; DUTRA, Juliana; FERREIRA, Luiz Fernando; ARAÚJO, Adauto. Did the dinosaurs have pinworms? Discovery of a 240 million year old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of nematode parasites in vertebrates. *Parasites & Vectors*, 7:486, 2014

HURTADO, Ana; ADURIZ, Gorka; MORENO, Bernardino; BARANDIKA, Jesse; GARCIA-PEREZ, Ana L. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology* 102: 17–27. 2001.

IIDA, Takayuki; ITAKURA, Manabu; ANDA, Mizue; SUGAWARA, Masayuki; ISAWA, Tsuyoshi; OKUBO, Takashi; SATO, Shusei; CHIBA-KAKIZAKI, Kaori; MINAMISAWA, Kiwamu. Symbiosis Island Shuffling with Abundant Insertion Sequences in the Genomes of Extra-Slow-Growing Strains of Soybean *Bradyrhizobia*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 81, No 12, 2015.

JONES, Andrew K. G. Recent finds of intestinal parasite ova at York, England. *Papers on Paleopathology*, 4th European Members Meeting, Antwerpen, p. 7. 1982.

JOUY-AVANTIN, F.; COMBES, C.; MISKOVSKY, J. C.; MONÉ, H. Helminth eggs in animal coprolites from a Middle Pleistocene site in Europe. *The Journal of parasitology*, 376-379, 1999.

KASAI, Chika; SUGIMOTO, Kazushi; MORITANI, Isao; TANAKA, Junichiro; OYA, Yumi; INOUE, Hidekazu; TAMEDA, Masahiko; SHIRAKI, Katsuya; ITO, Masaaki; TAKEI, Yoshiyuki; TAKASE, Kojiro. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterology*, 15:100, 2015.

KHAIRAT, Rabab; BALL, Markus; CHANG, Chun-Chi Hsieh; BIANUCCI, Raffaella; NERLICH, Andreas G.; TRAUTMANN, Martin; ISMAIL, Somaia; SHANAB, Gamila M. L.; KARIM, Amr M.; GAD, Yehia Z.; PUSCH, Carsten M. First insights into the metagenome of Egyptian mummies using next-generation sequencing. *J Appl Genetics* 54:309–325, 2013.

KIM, Yun-Ah; KIM, Hye-Youn; CHO, Shin-Hyeong; CHEUN, Hyeong-II; YU, Jae-Ran; LEE, Sang-Eun. PCR Detection and Molecular Characterization of *Pentatrichomonas hominis* from Feces of Dogs with Diarrhea in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* Vol. 48. No 1:9-13, 2010.

KIORPES, A.L.; KIRKPATRICK, C.E.; Bowman, D.D. Isolation of *Giardia* from a Llama and from Sheep. *Can J Vet Res*, 51: 277-280, 1987.

LEHMANN, Tovi; MARCET, Paula L.; GRAHAM, Doug H.; DAHL, Erica R.; DUBEY, J. P. Globalization and the population structure of *Toxoplasma gondii*. *PNAS*, vol. 103, n. 30, p.11423–11428, 2006.

LELES, Daniela; FREIRE, Andressa; LOBO, Amanda; MALDONADO JR., Arnaldo; GARCIA, Juberlan; MONTEIRO, Ana Beatriz; ARAÚJO Adauto. Trabalhando com DNA parasitário de coprólitos: modelo experimental com o helminto intestinal *Echinostoma* sp. In: LELES, Daniela. Guia Prático para Estudo de Doenças Infecto-Parasitárias em amostras de Acervo e Coleções. Ebook: Editora Albatroz, 2016a. 54 p. cap. 3, p. 19-28.

LELES, Daniela; BRENER, Beatriz; MILLAR, Patrícia Riddell; SUDRÉ, Adriana Pittella. Caracterização molecular do gene B-giardina de *Giardia duodenalis* de ovinos, bovinos e felinos do Brasil. In: XXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA – III ENCONTRO DE PARASITOLOGIA DO MERCOSUL, 2013, Florianópolis.

LELES, Daniela; LOBO, Amanda; RHODES, Taís; MILLAR, Patrícia Riddell; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis; ARAÚJO, Adauto. Recovery of *Toxoplasma gondii* DNA in experimentally mummified skin and bones: Prospects for paleoparasitological studies to unveil the origin of toxoplasmosis. *Experimental Parasitology*. v.168, p.51 - 55, 2016b.

LEW, A.E.; ANDERSON, G.R.; MINCHIN, C.M.; JESTON, P.J.; JORGENSEN, W.K. Inter- and intra-strain variation and PCR detection of the internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences of Australian isolates of *Eimeria* species from chickens. *Veterinary Parasitology* v. 112, n. 1, p. 33-50, 2003.

LIMA, Valdirene S.; INIGUEZ, Alena M.; OTSUKI, Koko; FERREIRA, Luiz Fernando; ARAUJO, Adauto; VICENTE, Ana Carolina; JANSEN, Ana Maria. Chagas disease in ancient hunter-gatherer populations, Brazil. *Em Infect Dis* 14: 1001-1002. 2008.

LORENZEN, Eline D.; NOGUE´S-BRAVO, David; ORLANDO, Ludovic; Jaco; BINLADEN, Jonas; MARSKE, Katharine A.; UGAN, Andrew; BORREGAARD, Michael K.; GILBERT, M. Thomas P.; NIELSEN, Rasmus; HO, Simon Y. W.; GOEBEL, Ted; GRAF, Kelly E.; BYERS, David; STENDERUP, Jesper T.; RASMUSSEN, Morten; CAMPOS, Paula F.; LEONARD, Jennifer A.; KOEPFLI, Klaus-Peter; FROESE, Duane; ZAZULA, Grant; STAFFORD Jr., Thomas W.; AARIS-SØRENSEN, Kim; BATRA, Persaram; HAYWOOD, Alan M.; SINGARAYER, Joy S.; VALDES, Paul J.; BOESKOROV, Gennady; BURNS, James A.; DAVYDOV, Sergey P.; HAILE, James; JENKINS, Dennis L.; KOSINTSEV, Pavel; KUZNETSOVA, Tatyana; LAI, Xulong; MARTIN, Larry D.; MCDONALD, H. Gregory; MOL, Dick; MELDGAARD, Morten; MUNCH, Kasper; STEPHAN, Elisabeth; SABLIN, Mikhail; SOMMER, Robert S.; SIPKO, Taras; SCOTT, Eric; SUCHARD, Marc A.; TIKHONOV, Alexei; WILLERSLEV, Rane; WAYNE, Robert K.; COOPER, Alan; HOFREITER, Michael; SHER, Andrei; SHAPIRO, Beth; RAHBEK, Carsten; WILLERSLEV, Eske. Species-specific responses of Late Quaternary megafauna to climate and humans. *Macmillan Publishers Limited*. Nature. vol 479, 2011.

LUTZ, Adolpho. Schistosomum mansoni and Schistosomatosis observed in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 11, n. 1, p. 121-155, 1919.

MEKARU, Sumiko R.; MARKS, Stanley L.; FELLE, Allison J.; CHOUICHA, Nadira; KASS, Philip H. Comparison of Direct Immunofluorescence, Immunoassays, and Fecal Flotation for Detection of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia* spp. In Naturally Exposed Cats in 4 Northern California Animal Shelters. *J Vet Intern Med*. 21:959–965, 2007.

MITCHELL, Piers D.; STERN, Eliezer; TEPPER, Yotam. Dysentery in the crusader kingdom of Jerusalem: an ELISA analysis of two medieval latrines in the City of Acre (Israel). *Journal of Archaeological Science*, v. 35, n. 7, p. 1849-1853, 2008.

MOSTEGL, Meike M.; WETSCHER, Andreas; RICHTER, Barbara; NEDOROST, Nora; DINHOPL, Nora; WEISSENBOCK, Herbert. Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization. *Veterinary Parasitology*. v. 183, n. 3, p. 209-214, 2012.

NAVARRO, E.; FERNANDEZ, M. P.; GRIMONT, F.; CLAYS-JOSSERAND, A.; BARDIN, R. Genomic Heterogeneity of the Genus *Nitrobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. october .1992, p. 554-560. Vol. 42, No. 4.

NICOLETTI, Giovanni; CORBELLA, Marta; JABER, Omar; MARONE, Piero; SCEVOLA, Daniele; FAGA, Angela. Non-pathogenic microflora of a spring water with regenerative properties. *Biomedical Reports* 3: 758-762, 2015.

NOVO, Shênia Patrícia Corrêa; LELES, Daniela; ARAÚJO, Adauto. Trabalhando com DNA parasitário de ossos e tecidos moles: protozoários do gênero *Leishmania* spp. In: LELES, Daniela. Guia Prático para Estudo de Doenças Infecto-Parasitárias em amostras de Acervo e Coleções. Ebook: Editora Albatroz, 2015. 54 p. cap. 3, p. 19-28.

NUNES, Victor Hugo Borba; ALCOVER, Josep Antoni; SILVA, Valmir Laurentino; CRUZ, Paula Borba; SILVA, José Roberto Machado; ARAÚJO, Adauto José Gonçalves de. Paleoparasitological analysis of the extinct *Myotragus balearicus* Bate 1909 (Artiodactyla, Caprinae) from Mallorca (Balearic Islands, Western Mediterranean). *Parasitology International* 66 (2017) 7–11

PALMEIRA, Bruna Meirelles. *Estudo da Giardíase em Bovinos do Estado do Rio de Janeiro*. Niterói, 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

PERRI, Angela R.; HEINRICH, Susann; GUR-ARIEH, Shira; SAUNDERS, Jeffrey J. Earliest Evidence of *Toxocara* sp. in a 1.2-Million-Year-Old Extinct Hyena (*Pachycrocuta brevirostris*) Coprolite from Northwest Pakistan. *Journal of Parasitology*. 2016

POINAR, George; POINAR, Roberta. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist*, v. 155, n. 3, p. 305-310, 2004.

POINAR, George; POINAR, Roberta. Fossil evidence of insect pathogens. *Journal of invertebrate pathology*, v. 89, n. 3, p. 243-250, 2005.

POINAR Hendrik N.; SCHWARZ, Carsten; QI, Ji; SHAPIRO, Beth; MACPHEE, Ross D. E.; BUIGUES, Bernard; TIKHONOV, Alexei; HUSON, Daniel H.; TOMSHO, Lynn P. ; AUCH, Alexander; RAMPP, Markus; MILLER, Webb; SCHUSTER, Stephan C. Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth DNA. *Science*, VOL 311, 2006.

POINAR Jr, George. Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 102(5): 635-637, 2007.

POINAR Jr, George. *Vetufefrus ovatus* n. gen., n. sp. (Haemospororida: Plasmodiidae) vectored by a streblid bat fly (Diptera: Streblidae) in Dominican amber. *Poinar Parasites & Vectors*, 4:229, 2011.

POINAR, G.; TELFORD, S. R. *Paleohaemoproteus burmacis* gen. n., sp. n. (Haemospororida: Plasmodiidae) from an Early Cretaceous biting midge (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasitology*, v. 131, n. 1, p. 79-84, 2005.

- POINAR, George. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasites & vectors*, v. 1, n. 1, p. 22, 2008.
- POINAR JR, George. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v. 5, No 1, 2005.
- POINAR Jr, George; BOUCOT. Arthur James. Evidence of intestinal parasites of dinosaurs. *Parasitology*, 133, 245–249, 2006.
- POINAR JR. George. Evolutionary History of Terrestrial Pathogens and Endoparasites as Revealed in Fossils and Subfossils. Hindawi Publishing Corporation. *Advances in Biology* Volume 2014, Article ID 181353, 29 pages 2014.
- POINAR, Hendrik N.; HOFREITER, Michael; SPAULDING, W. Geoffrey; MARTIN, Paul S.; STANKIEWICZ, B. Artur; BLAND, Helen; EVERSLED, Richard P.; POSSNERT, Goran; PAABO, Svante. Molecular Coproscopy: Dung and Diet of the Extinct Ground Sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* 281, 402, 1998.
- REINHARD, Karl; BOUCHET, Françoise; FERREIRA, Luiz Fernando. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 96,640-643, 2002.
- RINGUELET, Raul A. Restos de probables huevos de nematodos en el estiércol del edentado extinguido *Myiodon listai* (Ameghino). *Ameghiniana*, v. 1, n. 1-2, p. 15-16, 1957
- ROQUE, Andre Luiz. R.; JANSEN, Ana Maria. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 3(3): 251–262, 2014.
- ROTHSCHILD, Bruce M.; MARTIN, Larry D.; LEV, Galit; BERCOVIER, Helen; BAR-GAL, Gila Kahila; GREENBLATT, Charles; DONOGHUE, Helen; SPIGELMAN, Mark; BRITTAIN, David. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clinical Infectious Diseases*, v. 33, n. 3, p. 305-311, 2001.
- RUFFER, Armand. Pathological notes on the royal mummies of the Cairo Museum. *Studies in the Paleopathology of Egypt*, p. 166-178, 1921.
- GONCALVES, Marcelo L. C.; ARAUJO, Adauto; FERREIRA, Luiz Fernando. Paleoparasitologia no Brasil. *Ciência e saúde coletiva*, 7: 191-196, 2002.
- SCHMIDT, Gerald D.; DUSZYNSKI, Donald W.; MARTINI, Paul S. Parasites of the extinct shasta ground sloth *Nothrotheriops shastensis*, in Rampart Cave, Arizona. *J. Parasitol.* 78(5), p. 811-816. 1992.
- SCHOBENHAUS, Carlos; CAMPOS, Diogenes de Almeida; QUEIROZ, Emanuel Teixeira de; WINGE, Manfredo; BERBERT-BORN, Mylène Luíza Cunha. *SÍTIOS GEOLÓGICOS E PALEONTOLÓGICOS DO BRASIL*. Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). Serviço Geológico do Brasil (CPRM) Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos – (SIGEP) Sítios. Brasília: DNPM, 2002. 554 p.

SIANTO Luciana; DE SOUZA, Mônica Vieira; CHAME, Marcia; LUZ, Maria de Fátima da, GUIDON, Niéde; PESSIS, Anne-Marie; ARAÚJO, Adauto. Helminths in feline coprolites up to 9000 years in the Brazilian Northeast. *Parasitology International* 63 851–857. 2014

SIANTO, L.; DUARTE, A. BORBA, V. H. N.; MAGALHÃES, J. G. de; SOUZA, S. M. and CHAME M. Echinostomes in Felid Coprolites from Brazil. *Journal of Parasitology*. Vol. 102, Issue 3, pg(s) 385-387, 2016.

SIBLEY, L. David; AJIOKA, James W. Population Structure of *Toxoplasma gondii*: Clonal Expansion Driven by Infrequent Recombination and Selective Sweeps. *Annu. Rev. Microbiol.* 2008. 62: 329-351.

SILVA, Pricilla A. *Parasitas intestinais em animais extintos*. Niterói, 2013. 77 f. Tese (Mestrado Microbiologia e Parasitologia Aplicadas) – Universidade Federal Fluminense, 2013.

SILVA, Priscilla A. da; BORBA, Victor H.; DUTRA, Juliana M.F.; LELES, Daniela; DA-ROSA, Atila A.S.; FERREIRA, Luiz Fernando; ARAUJO, Adauto. A new ascarid species in cynodont coprolite dated of 240 million years. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 86(1):265-269, 2014.

SIQUEIRA, Arthur Fernandes; ORMEÑO-ORRILLO, Ernesto; SOUZA, Rangel Celso; RODRIGUES, Elisete Pains; ALMEIDA, Luiz Gonzaga Paula; BARCELLOS, Fernando Gomes; BATISTA, Jesiane Stefânia Silva; NAKATANI, Andre Shigueyoshi; MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza; VASCONCELOS, Ana Tereza Ribeiro; HUNGRIA, Mariangela. Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. *BMC Genomics* 2014, 15:420.

SLON, Viviane; HOPFE, Charlotte; WEIß, Clemens L.; MAFESSONI, Fabrizio; RASILLA, Marco de la; FOX, Carles Lalueza; ROSAS, Antonio; SORESSI, Marie; KNUL, Monika V.; MILLER, Rebecca; STEWART, John R.; DEREVIANKO, Anatoly P.; JACOBS, Zenobia; LI, Bo; ROBERTS, Richard G.; SHUNKOV, Michael V.; LUMLEY, Henry de; PERRENOUD, Christian; GUŠIĆ, Ivan; KUĆAN, Željko; RUDAN, Pavao; AXIMU-PETRI, Ayinuer; ESSEL, Elena; NAGEL, Sarah; NICKEL, Birgit; SCHMIDT, Anna; PRÜFER, Kay; KELSO, Janet; BURBANO, Hernán A.; PÄÄBO, Svante; MEYER, Matthias. Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene Sediments. *Science* 10.1126/science.aam9695, 2017.

SOUTO, Ricardo P.; FERNANDES, Octavia; MACEDO, Andra M.; CAMPBELL, David A.; ZINGALES, Bianca. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molec and Bioc Parasitol* 83(2):141-152. 1996.

SOUTO, Roberto de Figueiredo. In: . Fundamentos da Paleoparasitologia. Luiz Fernando Ferreira, Karl Jan Reinhard, Adauto Araujo. Editora Fiocruz. Cap 9, p. 153-159. Rio de Janeiro 2011.

SOUZA, Daniela Leles de. *Paleogenética e paleoepidemiologia de Ascaris sp. (Linnaeus, 1758) e Trichuris sp. (Roederer, 1761)*. Rio de Janeiro, 2010. 218 fTese (Doutorado em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saude Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

SOUZA, Maria Lúcia de; KOBAYASI, Shoiti; RODRIGUES, Maria Aparecida Marchesan; SAAD-HOSSNE, Rogério; NARESSE, Luiz Eduardo. Prevalência de Helicobacter em cães

oriundos do biotério central da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP)-Botucatu. *Acta Cir. Bras.* vol.19 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2004.

STEADMAN, David W.; MARTIN, Paul S.; MACPHEE, Ross D. E.; JULL, A. J. T.; MCDONALD, H. Gregory; WOODS, Charles A.; ITURRALDE-VINENT, Manuel; HODGINS, Gregory W. L. Asynchronous extinction of late Quaternary sloths on continents and islands. *PNAS*, vol. 102, no. 33, 11763–11768, 2005.

TENTER, Astrid M.; HECKEROTH, Anja R.; WEISS, Louis M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol.* 30(12-13): 1217–1258, 2000.

TERRA, Márcia Andreia Barge Loução; BELLO, Alexandre Ribeiro; BASTOS, Otilio Machado; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis; COELHO, Janice Mary Chicarino de Oliveira; FERREIRA, Luiz Fernando; ARAÚJO, Araújo. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by polymerase chain reaction in experimentally desiccated tissues. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 185-188, 2004.

TROUT, James M.; SANTÍN, Mónica; FAYER, Ronald. Detection of Assemblage A, *Giardia duodenalis* and *Eimeria* spp. in alpacas on two Maryland farms. *Veterinary Parasitology* 153 (2008) 203–208.

TZANNES, Sophia; BATCHELOR, Daniel J.; GRAHAM, Peter A.; PINCHBECK, Gina L.; WASTLING, Jonathan; GERMAN, Alexander J. Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Isoospora* species infections in pet cats with clinical signs of gastrointestinal disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10, 1e8, 2008.

UCHÔA, Flávia Fernandes de Mendonça. *Estudo da infecção por Giardia duodenalis em seres humanos, cães e gatos na cidade de Niterói-RJ através de métodos morfológicos, imunológicos e caracterização molecular multilocus de genótipos*. Niterói, 2017. Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal) - Universidade Federal Fluminense.

UPENIECE, Ieva. The unique fossil assemblage from the Lode quarry (Upper Devonian, Latvia). *Fossil Record*, v. 4, n. 1, p. 101-119, 2001.

VERWEIJ, Jaco J.; STENSVOLD, C. Rune. Molecular Testing for Clinical Diagnosis and Epidemiological Investigations of Intestinal Parasitic Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 27, n. 2, p. 371–418, 2014

VILLARROEL, Liesbeth Martina Frías. *Protozoários intestinais em material arqueológico*. Rio de Janeiro 2013. 103 f. Tese (Mestrado em Ciências, na área de Epidemiologia em Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

WAPPLER, Torsten; SMITH, Vincent S.; DALGLEISH, Robert C. Scratching an ancient itch: an Eocene bird louse fossil. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 271, n. Suppl 5, p. S255-S258, 2004.

WIEGMANN, Brian M.; HERRMANN, Bernd; HUMMEL, Susanne. Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archaeological, Museum, Medical and Forensic Specimens. *American Scientist*. 400-40, 1996.

WILLERSLEV, Eske; COOPER, Alan. Review paper. ancient dna. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 272, n. 1558, p. 3-16, 2005.

WOLFF, Ewan D. S.; SALISBURY, Steven W.; HORNER, John R.; VARRICCHIO, David J. Common Avian Infection Plagued the Tyrant Dinosaurs. *PLoS ONE*, Vol. 4, Issue 9, e7288. 2009.

WOOD, Jamie R.; WILMSHURST, Janet M.; RAWLENCE, Nicolas J.; BONNER, Karen I.; WORTHY, Trevor H.; KINSELLA, John M.; COOPER, Alan. A Megafauna's Microfauna: Gastrointestinal Parasites of New Zealand's Extinct Moa (Aves: Dinornithiformes). *PLOS ONE*. Vol. 8, Issue 2, e57315. 2013.

ZANGERL, Rainer; CASE, G. R. *Cobelodus aculeatus* (Cope) an anacanthous shark from Pennsylvanian black shales of North America. *Palaeontographica Abteilung A*, p. 107-157, 1976.

9. APÊNDICES

9.1 QUADRO COM A APRESENTAÇÃO RESUMIDA DOS RESULTADOS DA REVISÃO DE LITERATURA – PARASITOS DE ANIMAIS EXTINTOS (PARASITOS DE VERTEBRADOS)

Espécie hospedeira	Parasito encontrado	Local	Datação	Técnica	Material	Referência
Cimodonte	1 ovo de Oxiurídeo e 1 ovo de Ascarídeo (<i>Ascarites sp.</i>)	Sítio Cortado, RS	Triássico médio	Microscopia óptica	Coprólitos	SILVA, 2013; POINAR Jr.; BOUCOT, 2006; SILVA et al., 2014
Dicinodonte	1 ovo larvado não identificado		Triássico médio	Microscopia óptica		
Hiena (<i>Crocuta crocuta spelaea</i>)	Cisto de protozoário multinucleado não identificado	Caverna San Teodoro, Itália	Pleistoceno	Microscopia óptica	Coprólitos	DENTZIEN-DIAS et al., 2013.
<i>Palaeolama sp.</i>	<i>Giardia sp.</i>	Gruta dos Brejões, BA	Pleistoceno superior	ELISA		
Tubarão	Ovo de platelminto	Formação Rio do Rasto, São Gabriel, Brasil Paraná	Paleozoico (~ 270 Ma)	Microscopia óptica	Coprólitos	FUGASSA et al., 2008.
Camelídeos	<i>Eimeria macusaniensis</i>	Cerro Casa de Piedra, Parque Nacional Perito Moreno, Argentina. Sítio arqueológico Nombre de Jesus, Argentina Orejás de Burro I, Argentina La Arcillosa II, Terra del Fuego, Argentina	10.000 AP 500 AP 3.500 AP 4.000 AP	Microscopia óptica	Coprólitos Sedimento	
Provavelmente dinossauro <i>Megalosaurus dunkeri</i> (Dames)	Cistos de protozoário, similar a cistos de Entamoeba / <i>Entamoebites antiquus</i> nov. gen. nov. sp. Trematode egg. <i>Digenites proterus</i> , nov. gen nov. sp. Nematode eggs: Ordem Ascaridídea Yamaguti, Família Ascaridídeae Blanchard. <i>Ascarites priscus</i> n. gen. sp. <i>Ascarites gerus</i> n. sp.	Bélgica	Cretáceo inferior (~146-100 ma)	Microscopia óptica	Coprólito	POINAR Jr.; BOUCOT, 2006.

Espécie hospedeira	Parasito encontrado	Local	Datação	Técnica	Material	Referência
Família Hyaeidae	Larva de nematoide não identificada	Costa S. Giacomo, Itália	1,5 ma AP	Microscopia óptica	Coprólitos	FERREIRA; ARAUJO; DUARTE, 1993
Canideo ou hiena	<i>Toxocara sp.</i> semelhante a <i>toxocara canis</i>	Sítio arqueológico Menez-Dregan, França	300.000-500.000 AP	Microscopia óptica	Sedimento	BOUCHET et al., 2003
<i>Pachyrocota brevirostris</i>	ovos similares aos de <i>Toxocara sp.</i>	Haro River Quarry	1,2 ma AP	Microscopia óptica	Coprólitos	PERRI et al., 2016
Preguiça gigante: <i>Nothotheriops shastensis</i>	<i>Agamoñilaria oxyura</i> n. sp.	Rampart Cave, Arizona, EUA	Aprox 10.500 ± 180 AP	Microscopia óptica	Coprólitos	SCHMIDT; DUSZYNSKI; MARTIN, 1992
	<i>Strongyloides shastensis</i>					
	<i>Archeococcidia</i> n. gen.					
	<i>Archeococcidia antiquus</i> n. sp.					
<i>Archeococcidia nothotheriopsae</i> n. sp.						
<i>Myotragus balearicus</i> Bate 1909 (Artiodactyla, Caprinae)	<i>Entamoeba sp.</i>	Cova Estreta, Pollença, Mallorca.	4.950 ± 38 AP	Microscopia óptica	Coprólitos	NUNES et al., 2017
	<i>Cryptosporidium sp.</i>			ELISA		
Moa: <i>Anomalopteryx didiformis</i> , <i>Dinomis robustus</i> , <i>Pachyornis elephantopus</i> , <i>Megalopteryx didimus</i>	Nematodeo tipo 1: similar a <i>Hetarakoidea spp.</i>	Dart River Valley e Kawarau Gorge	Até aprox. 6.368 ± 31 AP	Microscopia optica	Coprólitos	WOOD et al., 2013
		Dart River Valley				
Moa: <i>D. robustus</i> , <i>P. elephantopus</i> , <i>M didimus</i>	Nematodeo tipo 2	Dart River Valley				
Moa: <i>P. elephantopus e M didimus</i>	Nematodeo tipo 3 : similar a <i>Trichinellidae</i> (c. f. <i>Capitária</i>)	Dart River Valley e Euphrates Cave				
		Apicomplexa				
		Nematoda				
Moa: <i>M. didimus</i> , <i>D. robustus</i>		Dart River Valley, Euphrates Cave		Biologia molecular		
Moa: <i>M. didimus</i>	Trematoda					

Espécie hospedeira	Parasito encontrado	Local	Datação	Técnica	Material	Referência
Tiranossaurídeo	Protozoário tipo <i>Trichomonas gallinae</i>	não mencionado	não mencionado	Análise comparativa de lesões em aves atuais infectadas por <i>trichomonas gallinae</i>	Ossos	WOLFF et al., 2009
<i>Myiodon histai</i> (Ameghino 1889)	ovos semelhantes aos de nematódeos	Sítio Caverna de Última Esperanza, Argentina.	10.832± 400 AP	Microscopia óptica	Coprólito	RINGUELET, 1957
<i>Cobelodus aculeatus</i> (Cope 1894)	Ovos de helmintos	?	Paleozoico (570-245 ma)	Microscopia óptica	Coprólito	ZANGERL; CASE, 1976 Apud UPENIECE, 2001
<i>Cladocycylusgardneri</i> Agassiz (Família Leptodectidae)	Copépodes	Formação Santana, Serra do Araripe, CE, Brasil	100 ma AP	Microscopia óptica	Ossos	CRESSEY; PATTERSON, 1973
Possivelmente do extinto <i>Ursos deningeri</i>	Ovo característico de Dicrocoelidae	Caverna Caune de L' Arago, Pyrenees-orientales - França	550.000 AP	Microscopia óptica	Coprólito	JOUY-AVANTIN et al., 1999
<i>Asterolepis ornata</i> Eichwald sensu Agassiz, 1840 e <i>Lodeacanthus gaujicus</i> Upeniece, 1996	Ganchos compatíveis aos de atuais platelmintos e acantocéfalos	Lode clay quarry, Latvia	Devoniano (aprox. 882,7 ma)	Microscopia óptica	Fóssil em rocha observação	UPENIECE, 2001
Possivelmente ancestrais de anseriformes ou charadriiformes	<i>Megamenopon rasnitsyni</i> sp. nov.	Eckfeld, Alemanha	44 ma AP	Microscopia óptica	Fóssil + Matriz	WAPPLER; SMITH; DALGLEISH, 2004
Em fóssil de pena	Ovos similares a de ácaros	Formação Crato, Nova Olinda, nordeste do Brasil	120 ma AP	Microscopia óptica	Lagerstätten	MARTILL e DAVIS, 1998
<i>Rattus macleari</i>	<i>Trypanosoma lewisi</i>	Christmas Island, leste do Oceano Índico	Entre 1899 e 1908	Biologia molecular	Tecido	WYATT et al., 2008
<i>Rattus natwitatis</i>						

Espécie hospedeira	Parasito encontrado	Local	Datação	Técnica	Material	Referência
<i>Bison</i> cf. <i>antiquus</i>	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Natural Cave Trap, Wyoming	> 17.000 AP	Biologia molecular Fatores de virulência lipídicos	Ossos	ROTHSCHILD et al., 2001 LEE et al., 2012
Grandes terocéfalos (e.g. <i>Moschowhatisia yiuschkovi</i>) e médio a grandes arcossauros (e.g. <i>Archosaurus rossicus</i>)	fungos, bactérias, invertebrados, ovos de invertebrados, protistas ciliados	Bykovka Quarry, Vyazniki, Rússia	Transição do Permiano tardio para Triássico inferior	Microscópio de luz normal e polarizada, microscópio óptico, e microscopia eletrônica (cortes finos)	Coprólitos	BAJDEK et al., 2015

9.2 QUADRO COM A APRESENTAÇÃO RESUMIDA DOS RESULTADOS DA REVISÃO DE LITERATURA – PARASITOS DE ANIMAIS EXTINTOS (PARASITOS EM ÂMBAR)

Hospedeiro	Parasito	Local	Material	Técnica	Datação	Referência	
Psychodidae (Diptera)	<i>Paleoleishmania proterus</i> n. sp.	Hukawng Valley, Myanmar (Burma)	Âmbar de Burma	Microscopia óptica	Cretáceo superior (100-110 ma)	POINAR Jr.; POINAR, 2004	
Streblidae (Diptera)	<i>Vetufebrius ovatus</i> Poinar, n. sp.	La Búcara mine, República Dominicana	Âmbar dominicano		20-15 ma (foraminífera)/45-30 ma (coccolíthos)	POINAR Jr., 2011	
Culicidae (Diptera)	<i>Plasmodium dominicana</i> n. sp.	La Toca mine, República Dominicana	Âmbar dominicano		20-15 ma (foraminífera)/45-30 ma (coccolíthos)	POINAR Jr., 2005	
Ceratopogonidae (Diptera)	<i>Cretacimermis protus</i> n. sp.	Hukawng Valley, Myanmar (Burma).	Âmbar de Burma		Microscopia óptica	Cretáceo inferior (~100-110 ma)	POINAR Jr.; BUCKLEY, 2006
Desconhecido	<i>Cretachordodes burmiti</i> s. n. sp.						
Psychodidae (Diptera) - Larva	<i>Leptomonas</i> spp.	Hukawng Valley, Myanmar (Burma)	Âmbar de Burma			Cretáceo inferior (~100-105 ma)	POINAR Jr., 2007
<i>Triatoma dominicana</i> sp. n.	<i>Trypanosoma antiquus</i> sp. n.	La Toca mine, República Dominicana.	Âmbar dominicano			20-15 ma (foraminífera)/45-30 ma (coccolíthos)	POINAR JR., 2005
Ceratopogonidae (Diptera)	Tripansomatídeos	Hukawng Valley, Myanmar (Burma)	Âmbar de Burma			Cretáceo inferior (~105-100 ma)	POINAR Jr.; POINAR, 2005
Psychodidae (Diptera)	virus putativo da polyhedrose nuclear (NPV)						
Culicídeo (<i>Culex</i> sp.)	Fungos ectoparasitas	Minas na porção norte da República Dominicana	Âmbar dominicano			20-15 ma (foraminífera)/45-30 ma (coccolíthos)	
Lagarta	Não comprovado	Minas em Simojovel estado de Chiapas, México	Âmbar do México	Mioceno inferior ao Oligoceno superior (até 22,5 a 26 ma)			

9.3 QUADRO COM A APRESENTAÇÃO RESUMIDA DOS RESULTADOS DA REVISÃO DE LITERATURA – PARASITOS DE ANIMAIS EXTINTOS (PARASITOS DE INSETOS EM ÂMBAR)

Parasito encontrado	Espécie hospedeira	Sítio	Datação	Técnica	Material	Referência
Ácaro (<i>Myrmozercobrevipes</i> Bertles 1902)	Formiga extinta (<i>Ctenobethylus goepperti</i> Mayr 1868)	Sítio desconhecido, possivelmente Kaliningrad, Rússia.	Eoceno ou cerca de 44–49 Ma ou mais recente	Estereomicroscópio, microscópio axioscópico, com camera lucida	Âmbar báltico	DUNLOP et al., 2014
Planidium de mosca Acroceridae (primeiro estágio larvar; Diptera)	Ácaro (Anystidae)	?	?	Microscopia óptica	Âmbar báltico	KERR; WINTERTON, 2008
Pupário de Strepsiptera	<i>Augochloropsis</i> sp. (Halictidae)	Cordillera Septentrional da República Dominicana	20-15 ma (foraminífera) e 45-30 ma (cocólitos)	Microscopia óptica	Âmbar dominicano	POINAR, 2004
Dois strepsipteras	Hemipteras (Delphacidae e Achilidae adulto)					
<i>Heydenius brownii</i> sp. n.	Gafanhoto (Achilidae)	Kaliningrad, Rússia	40 ma (Eoceno)	Microscopia óptica	Âmbar báltico	POINAR JR., 2001a
<i>Heydenius dominicus</i> n. sp.	Culicídeo adulto				Âmbar dominicano	POINAR JR., 1984
<i>Heydenius arachnius</i> n. sp.	Aranha (Arachnida: Araneae)	Minas na Cordillera Septentrional, República Dominicana	20-15 ma (foraminífera) ou 45-30 ma (cocólitos)		Âmbar dominicano	
<i>Heydenius phasmatophilus</i> n. sp.	"Bicho pau" (Phasmatodea: Phasmatidae)	Kaliningrad, Rússia	ca 40-50 ma AP (Eoceno)	Microscopia óptica	Âmbar báltico	POINAR JR., 2001b
<i>Heydenius podenasae</i> n. sp.	Traça (Lepidoptera)				Âmbar báltico	
<i>Heydenius trichorosus</i> n. sp.	Mariposa (Trichoptera: Leptoceridae)				Âmbar báltico	
<i>Cretacimermis protus</i> n. sp.	Ceratopogonidae (Diptera)	Hukawng Valley, Myanmar (Burma)	Cretáceo inferior (~100–110 ma)	Microscopia óptica	Âmbar de Burma	POINAR Jr.;BUCKLEY, 2006
<i>Cretachordodes burmitis</i> n. sp.	Desconhecido					

10. ANEXOS

10.1 ISENÇÃO DO PROJETO COM AMOSTRAS ANTIGAS PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – ANEXO 1

10.2 CARTA DO ZOOLOGICO DO RIO DE JANEIRO – ANEXO 2

10.3 PARECER TÉCNICO DA EMPRESA 'HELIXXA – GENOMICS SERVICE PROVIDER' – ANEXO 3, p.

10.4 “FINDING THE UNEXPECTED: A CRITICAL VIEW ON MOLECULAR DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASES IN ARCHAEOLOGICAL SAMPLES” – ANEXO 4

10.5 MINI-REVISÃO: “THE HISTORY OF EVOLUTION OF LIFE ON EARTH TOLD BY PALEOPARASITOLOGY” – ANEXO 5

10.6 CAPITULO 6 (E-BOOK): “PRINCIPAIS DIFICULDADES ENCONTRADAS NO TRABALHO COM DNA PARASITÁRIO ANTIGO” – ANEXO 6



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO e INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Niterói-RJ, 6 de Julho de 2016

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Fluminense declara que não é obrigatória a submissão à CEUA de projetos que envolvem análise de parasitos em amostras arqueológicas ou paleontológicas.

Atenciosamente,

A handwritten signature in dark ink that reads 'Fabio Otero Ascoli'. The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Prof. Dr. Fabio Otero Ascoli
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais



Rio de Janeiro, 27 de abril de 2017

Declaro para os devidos fins, que o Riozoo Zoológico do Rio de Janeiro S/A cedeu amostras de fezes e swabs orais de 3 exemplares de lhama (*Lama glama*) para o projeto de pesquisa "Paleoparasitologia Molecular de Animais Extintos da Megafauna do Brasil" da aluna Paula Cascardo, do Curso de Pós-Graduação Stricto Sensu em Microbiologia E Parasitologia Aplicadas (PPGMPA) da Universidade Federal Fluminense (UFF), sob orientação da Prof^a Dr^a Daniela Leles de Souza.

Atenciosamente,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Anna", written over a horizontal line.

Anna Cecília Leite Santos

Gestora - RIOZOO

RELATÓRIO PARCIAL

Solicitante: Daniela Leles – FIOCRUZ

Data do relatório: 03/11/2016

Relatório Parcial de Resultados

PROJETO: BIBLIOTECA METAGENÔMICA DE DNA DE ORIGEM ARQUEOLÓGICA.

1 – Helixxa: Amostras dosadas por fluorimetria.

As amostras foram previamente dosadas pela cliente por Nanodrop, apresentando concentração suficiente para a construção das bibliotecas, entretanto, com as razões A260/280 e A260/230 fora do padrão estabelecido pela Illumina.

A técnica de fluorimetria é capaz de dosar DNA dupla fita com maior sensibilidade, isto é, em bom estado de conservação, por isso, indicado para estimativas com maior confiabilidade, necessária para o sequenciamento de nova geração.

Amostras	ng/ul
1409-1 I	3,62
1409-1 II	0,58
1409-2 I	2,48
1409-2 II	0,81
ML1 I	0,23
ML1 II	0,02
ML2 I	0,12
ML2 II	0,00
MS3 I	0,44
MS3 II	0,12
PG1 I	0,07
PG1 II	0,09
PG2 I	0,06
PG2 II	0,02
PG juntas	0,22
1409 juntas	1,85

Legenda:

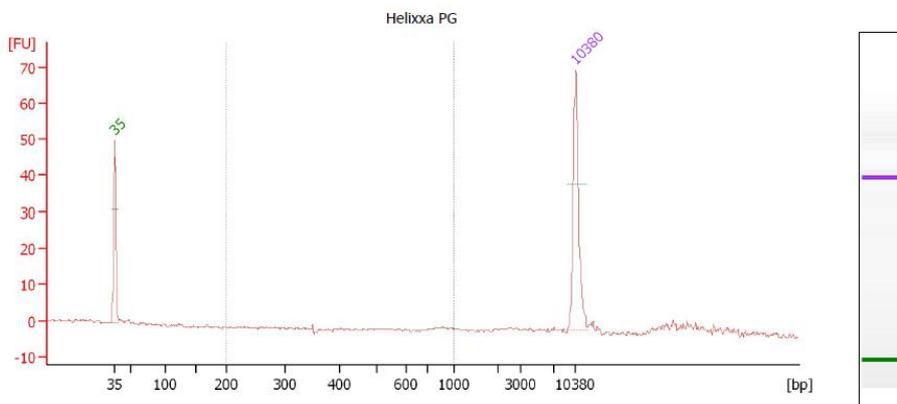
1409 – múmia 1409
ML – múmia líquido
MS – múmia sedimento
PG – preguiça gigante

(os números romanos indicam o número da alíquota).

Como o *input* inicial de DNA para o kit Nextera XT da Illumina é de 1ng de DNA (em 5uL), as amostras foram consideradas aptas a continuar o processo.

2 – Parceiro: Bioanalyser das amostras PG e 1409

Esta técnica é capaz de avaliar tanto tamanho de fragmentos de DNA como a estimativa de concentração destes.



Overall Results for sample 4 : Helixxa PG

Number of peaks found: 0 Corr. Area 1: 1.5
 Noise: 0.2

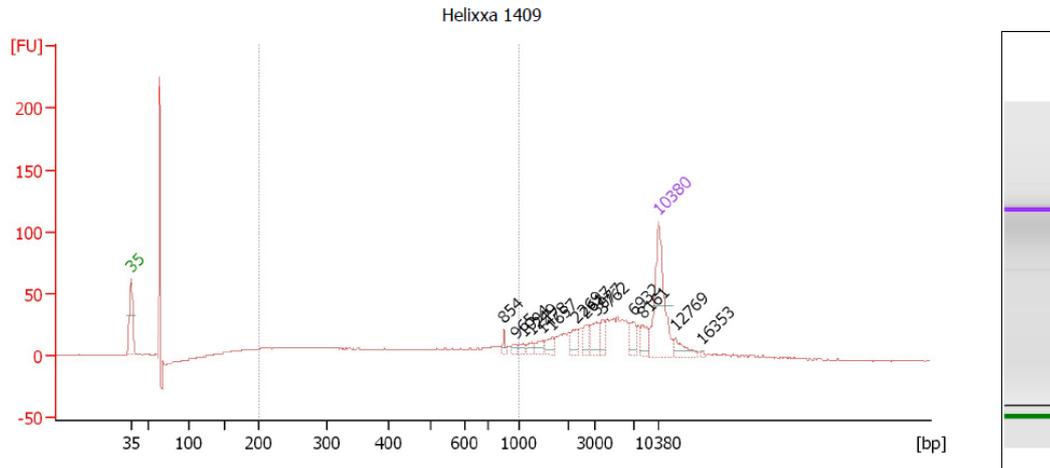
Peak table for sample 4 : Helixxa PG

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	10,380	75.00	10.9	Upper Marker

Region table for sample 4 : Helixxa PG

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/µl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	1.5	4	854	14.2	2.27	4.2	■

Neste caso, a amostra PG se mostrou com pico único, e com estimativa de 0,75ng/uL . Apesar de um pico único poder ser indicativo de pouca degradação, a baixa concentração presente no chip (0,75ng/uL) não seria capaz de mostrar detalhamento de possíveis fragmentos menores, por estarem em ainda menor concentração, em relação ao montante total de DNA presente.



Overall Results for sample 5 : Helixxa 1409

Number of peaks found: 14 Corr. Area 1: 324.9
Noise: 0.3

Peak table for sample 5 : Helixxa 1409

Peak	Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Observations
1	35	125.00	5,411.3	Lower Marker
2	854	5.48	9.7	
3	965	4.27	6.7	
4	1,094	5.36	7.4	
5	1,249	5.64	6.8	
6	1,478	8.10	8.3	
7	1,657	9.24	8.4	
8	2,269	11.69	7.8	
9	2,617	10.81	6.3	
10	3,077	18.43	9.1	
11	3,762	10.62	4.3	
12	6,932	15.38	3.4	
13	8,161	13.32	2.5	
14	10,380	75.00	10.9	Upper Marker
15	12,769	0.00	0.0	
16	16,353	0.00	0.0	

Region table for sample 5 : Helixxa 1409

From [bp]	To [bp]	Corr. Area	% of Total	Average Size [bp]	Size distribution in CV [%]	Conc. [pg/μl]	Molarity [pmol/l]	Color
200	1,000	324.9	35	473	44.7	262.84	1,102.9	■

A amostra 1409 mostra degradação, como esperado deste tipo de amostra de origem arqueológica, evidenciada pela distribuição da curva de tamanho (de 850 -16.000 bp), tanto como pelo perfil eletroforético em “escada” (mostrado à direita do gráfico FU x bp).

3 – Parceiro: Preparação das bibliotecas.

As amostras sofreram tagmentação, inserção de índices e amplificação pelo Nextera XT Library Prep Kit¹ (Illumina Inc.).



Relatório Parcial Proposta no. 056-2016

Rua Joaquim Aricó, 408
Paulínia - SP, CEP 13148-153

Tel. 19 3514 2229
contato@helixxa.com.br
www.helixxa.com.br

Este procedimento é verificado por dosagem de DNA presente por fluorimetria, e não foi detectada a presença de DNA em quantidades suficientes para prosseguir com a corrida.

4 – Helixxa: Dosagem e concentração das amostras

Após a falha na preparação das bibliotecas, foi confirmada, com a cliente, a possibilidade de presença de algum contaminante que pudesse causar incompatibilidade com a reação do kit Nextera XT. Após verificação dos protocolos utilizados, foi constatado que houve um passo, durante a extração de DNA, que foi utilizado o reagente EDTA (incompatível), entretanto, foi realizado um segundo passo de purificação que retirou este reagente.

Desta maneira, possibilitou-se a realização de concentração das amostras por evaporação à vácuo, com a utilização do equipamento Eppendorf Concentrator plus.

Este passo foi realizado a fim de aumentar a concentração de DNA das amostras, o que poderia solucionar o provável problema que levou à falha de construção das bibliotecas, já que a presença de contaminantes foi excluída.

A amostra PG foi reduzida ao máximo em volume, para que ficasse com a quantidade aproximada necessária para aplicação no kit.

Esta amostra foi dosada por fluorimetria novamente, antes de iniciar a nova preparação das bibliotecas, e, curiosamente, o valor de concentração manteve-se a 0,2ng/uL.

Este fato pode indicar que o valor de concentração indicado não era real, justificado por dois motivos, primeiro, que este valor, por ser tão baixo, estava muito próximo ao ruído da leitura e, segundo, provável interferência de algum contaminante oriundo da extração da amostra, que foi concentrado junto com o DNA presente.

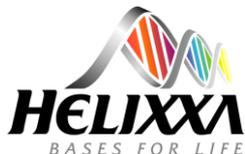
5 – Helixxa: Repetição do preparo das bibliotecas.

As amostras foram novamente submetidas ao processo de tagmentação, inserção de índices e amplificação (Kit Nextera XT), entretanto, não se obteve sucesso.

CONCLUSÕES

As amostras PG e 1409 são amostras delicadas e com alta degradação. A amostra PG provavelmente possui bastantes nucleotídeos livres, que absorvem no espectro UV e interferem na leitura por fluorimetria, quando a leitura estiver próxima de sua linha de base.

Além deste fato, o processo de extração destas (com valores de razão de pureza fora do padrão indicado – A260/280 e A260/230) pode, além de ter diluído o DNA, ter deixado alguns contaminantes impeditivos para o processo de preparo das bibliotecas.



Relatório Parcial
Proposta no. 056-2016

Rua Joaquim Aricó, 408
Paulínia - SP, CEP 13148-153

Tel. 19 3514 2229
contato@helixxa.com.br
www.helixxa.com.br

Referências

1. Nextera XT DNA Library Preparation Kit
http://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_xt_dna_sample_prep.pdf

A handwritten signature in purple ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.

Dra. Luciana de Campos Leite Medeiros
Pesquisadora/Responsável Técnica
CRBio 64320/01-D



Finding the unexpected: A critical view on molecular diagnosis of infectious diseases in archaeological samples



Elisa Pucu^{a,*}, Paula Cascardo^a, Marcia Chame^{b,c}, Gisele Felice^{c,d}, Niéde Guidon^c, Maria Cleonice Vergne^e, Guadalupe Campos^f, Daniela Leles^a

^a Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos e de Paleoparasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Rua Professor Hernani Melo, n.101, São Domingos, CEP: 24210-130 Niterói, RJ, Brazil.

^b Laboratório de Paleoparasitologia, Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Fundação Museu do Homem Americano, São Raimundo Nonato, PI, Brazil

^d Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Serra de Capivara, São Raimundo Nonato, PI, Brazil

^e Universidade do Estado da Bahia, Salvador, BA, Brazil

^f Museu de Astronomia e Ciências Afins, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Paleoparasitology
Paleomicrobiology
Ancient DNA
Taphonomy

ABSTRACT

In the 1980s the polymerase chain reaction (PCR) technique was developed and opened the possibility to analyze ancient DNA (aDNA) in archaeological remains and identify the etiological agent of several infectious diseases. The main concern in analyzing aDNA is to successfully verify its authenticity and the information that it contains. Primers are often designed to target the desired DNA sequences, however they can target unknown sequences amplifying different organisms. With the development of next-generation sequencing platforms, the production of sequence data is increasing. There is a universe of unknown sequences that are to be discovered and deposited in the database. Could we then state in the future that we have species-specific primers? We analyzed bones of human and ground sloth remains for *Trypanosoma cruzi* by PCR. Although the samples analyzed did not amplify this parasite some bacteria were amplified. Normally this would be interpreted as a contamination and would not be reported. Yet, in this article we ask researchers to rethink about these findings, especially due to the age of these samples and consider the archaeological context for the data interpretation.

1. Introduction

In the 1980s the polymerase chain reaction (PCR) technique was developed opening the possibility to analyze ancient DNA in archaeological remains and to identify the etiological agent of several infectious diseases, establishing what is called molecular Paleoparasitology and Paleomicrobiology. While DNA from ancient organic remains has been extracted in a number of cases, there are still complications with analyses. The main concern in analyzing aDNA (ancient DNA) is to successfully verify its authenticity and the information that it contains (Fulton, 2012). However, not only there are issues with contamination and conservation of aDNA, but also with primers design. Primers are often designed to target the desired DNA sequences, still in some situations primers target unknown sequences amplifying different organisms than the one specific to the primers (Rose et al., 1998).

With the development of next-generation sequencing platforms, the production of sequence data is increasing vastly (Kodama et al., 2012).

In 2016, the National Institutes of Health (NIH) Sequence Read Archive (SRA) contains ~3 petabases of sequence information (Solomon and Kingsford, 2016). In April 2016, a total of 193,739,511 sequences, and 211,423,912,047 bases were deposited in the Genbank by direct submission, collaboration/agreement, and/or internal NCBI/NLM curation (National Center for Biotechnology Information et al., n.d.; NCBI Resource Coordinators, 2016).

Herein, we will discuss results obtained by using the primers TC/TC1 and TC2 described by Souto et al. (1996) and explore the possibility of updating primers as new sequences are deposited in the database.

2. Methodology

We analyzed bones of human remains from Brazil: Justino site, Sergipe ($n = 7$), dated from 4380 to 3200 BP (Before Present); and São Jorge Church, Rio de Janeiro ($n = 7$) dated from the end of the 18th century. Some ($n = 5$) bone fragments were also analyzed from an

* Corresponding author.

E-mail address: elisapucu@id.uff.br (E. Pucu).

individual extinct giant ground sloth of the genus *Eremotherium* spp., from Lagoa dos Porcos site, Piauí, Brazil dated from 30.000 BCE (Before Christ). Samples were provided by the Collection of Coprolites and Paleoparasitological Materials Luiz Fernando Ferreira – Fiocruz, and also by the National Historic and Artistic Heritage Institute – IPHAN (01500.002205/2013-84).

In this study, we used primers that amplify a part of the intergenic region of *Trypanosoma cruzi* mini-exon genes: 5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC (TC1 – group 1-specific); 5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG (TC2 – group 2-specific); 5'-CCCCCTCCCAGGCCACACTG (TC, common to both groups). These DNA markers define two phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi* (TC1 and TC2), which show a high phylogenetic divergence and were used as primers for *T. cruzi* identification using archaeological remains subsequently with successful results (Lima et al., 2008; Fernandes et al., 2008). Samples were analyzed and sequenced at the Laboratory of Parasitology at the Fluminense Federal University.

Further information about sample preparation, DNA extraction and products amplification can be accessed at Pucu et al. (submitted).

3. Results

All samples tested with TC2 primer were negative. For the TC1 primer 3 samples had amplifications matching 350 base pairs that corresponds with the TC1 primer amplification base pairs for *T. cruzi*. The one sample from Justino Site had 99% of similarity with the bacteria *Propionibacterium acnes* strain A1–14 (accession number Genbank: CP013693.1), and one from São Jorge Church had 71% of similarity solely with the bacteria *Agrobacterium tumefaciens* strain Ach5 (aCP011247.1), for the ground sloth remains one sample had 89% of similarity with a bacteria *Pseudomonas putida* strain AA7 (CP018846.1). The sequence alignment is at the Data in Brief.

4. Discussion

All DNA sequences amplified were deposited after the TC1 primer was designed, i.e. in 1996, showing a probable congruence among the sequences. Some primers specificity might be put to a test due to the universe of new information and the daily sequencing of new organisms. Everyday new DNA sequences are being deposited in different databases; besides, it is very common for primers' to amplify unknown sequences even in studies with modern samples. However, some of these sequences are unknown and are not reported in the studies, therefore not deposited in the Genbank database.

Even though some primers in the literature are used many times, with positive results, there are some surprises concerning their specificity in new studies. Hänisch et al. (2015) showed evidence that the *pla* gene, thought to be specific to *Yersinia pestis* and widely used in aDNA studies, also occurs in strains of other bacteria species, such as *Escherichia coli*. The authors suggest a combination of at least two different molecular targets for proper identification of *Y. pestis*.

Propionibacterium acnes is an anaerobic Gram-positive bacillus that can be found in the human skin and maintains the inflammatory phase of acne. The complete DNA sequence amplified was deposited in 23 December 2015. It is considered a commensal organism that can occur in the conjunctiva, mouth, and intestine; and it is a common contaminant of cultures (Zylberberg et al., 1996; Levy et al., 2008). *P. acnes* has also been identified in sites with bone infection causing osteomyelitis, and associated with the presence of foreign bodies, immunosuppression, preceding surgery, trauma, diabetes, obstruction of sinuses or ducts, and has been associated with the development of prostate cancer (Funke et al., 1997; Levy et al., 2008; Bae et al., 2014).

Barnes and Thomas (2006) published a study that tested tuberculosis and syphilis on archaeological remains. One of their samples, positive for tuberculosis morphologically, matched portions of the 16SrRNA of *P. acnes* with 99% of identity. Although *P. acnes* is a

human skin commensal there have been cases of infection, indicating that there is a probability of the individual we analyzed to be immunosuppressed. Even though *P. acnes* was identified in this previous study it was considered a contamination, however, perhaps there is a link between bone lesions caused by tuberculosis and other pathogens with the presence of *P. acnes*. Tuberculosis can cause immunosuppression in the host, which can benefit the occurrence of *P. acnes*. Hence, further studies are needed to understand the pathogenicity of this bacterium, and its co-occurrence with other pathogens. Many times, an unexpected result might indicate another previous disease that it was in fact the cause of the dissemination of an etiological agent, which in an individual immunocompetent would not cause any harm.

Agrobacterium tumefaciens (= *Rhizobium radiobacter*) an aerobic gram-negative soil pathogen that can cause crown gall tumors on infected dicotyledonous plants (De Groot et al., 1998). The complete sequence of the strain Ach5 chromosome linear was deposited in 23 June 2015. The presence of this bacterium might indicate that it was in the soil in direct contact with the bones we analyzed. However, in this case it is difficult to establish that this contamination occurred at the time the remains were buried or later, when the bones were excavated.

Pseudomonas putida is an aerobic, gram-negative soil bacterium that occurs in the soil and can bio-catalyze some chemical products, i.e. polystyrene foam (Nicoletti et al. 2015). The genome sequence was deposited in 13 March 2017. The presence of *P. putida* shows that the contamination of archaeological samples with these bacteria might be high, since this species is also found in the soil. In some archaeological context, the soil will be in direct contact with bones until they are excavated, and due to the bone's porosity not only minerals but also the soil might replace and impregnate the bone matrix. Even with the removal of the outer layer of the bone the soil will not be cleaned off, regardless of the piece of bone used (we used the bone marrow). This can be aggravated when scientific collections wrap the samples with polystyrene for transportation. Therefore, we advise archaeologists to seek for a different material to prevent impact to prevent contamination.

Generally, primers are used and designed for “pure cultures” and/or isolated organisms. However, the archaeological material can be considered an environmental sample that translates not only the host's information and its parasites, but also the environment of where it lived, where it was deposited until excavated, and even what happens to the material during its transportation, storage, and laboratory experiments. When we apply these primers primarily designed for modern samples in archaeological ones, they can reflect unique and unpredictable contexts and results.

Although checking primers is a premise in any research, not always this strategy will have the expected efficiency. Several organisms deposited recently did not exist when many primers were designed years ago, and even today the hybridization area of primers might not be in the sequence database. Besides, there is a universe of unknown sequences that are to be discovered and deposited in the database. Could we then state in the future that we have species-specific primers? How many researchers have found in analyses almost “perfect sequences” that when compared to the database they have zero similarity with any organism? However, there is a tendency to “discard” these results because they did not match what was looked for, and we believe that this is a mistake. Unexpected results, especially ones from archaeological materials, should be reported not only because it is a rare material, but also due to the fact that we can be facing new discoveries. With unexpected results, methodologies can be improved and new findings reported and analyzed even though it is a challenge to discover whether results from aDNA are authentic or a contamination.

5. Conclusion

In Brazil, there is a saying: “aimed at what I saw but hit what I did not

foresee,” that agrees with research in the paleoparasitological field that aims at what you might expect to find. Nonetheless, in this letter we call attention to what we did not expect we would find.

Even though the possibility of contamination is very high, since *P. acnes* normally occurs on human skin; *A. tumefaciens* in the soil; and *P. putida* in soil and polystyrene, we advise researchers to report unexpected results as discussed above. These organisms could also be present at the time the individuals were living, since negative controls of extraction and PCR did not amplify these organisms. Due to the importance of the materials we stress that results should not be discarded; owing to the archaeological context that might indicate that it was in fact an endogenous and ancient DNA.

Acknowledgements

IPHAN, FIOCRUZ, FUMDHAM this work was supported by CAPES; and FAPERJ (n.º 202.785/2015).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jasrep.2017.04.019>.

References

- Bae, Y., Ito, T., Iida, T., Uchida, K., Sekine, M., Nakajima, Y., Kumagai, J., Yokoyama, T., Kawachi, H., Akashi, T., Eishi, Y., 2014. Intracellular *Propionibacterium acnes* infection in glandular epithelium and stromal macrophages of the prostate with or without cancer. *PLoS One* 9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0090324>.
- Barnes, I., Thomas, M.G., 2006. Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in museum osteological collections. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 645–653. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2005.3339>.
- Fernandes, A., Iñiguez, A.M., Lima, V.S., Mendonça de Souza, S.M.F., Ferreira, L.F., Vicente, A.C.P., Jansen, A.M., 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), 514–516. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000500021>.
- Fulton, T.L., 2012. Setting up an ancient DNA laboratory. In: Shapiro, B., Hofreiter, M. (Eds.), *Ancient DNA – Methods and Protocols* Publisher Humana Press, New York, pp. 247.
- Funke, G., von Graevenitz, A., Clarridge, J.E., Bernard, K.A., 1997. Clinical microbiology of coryne form bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 125–159.
- National Center for Biotechnology Information U.S. National Library of Medicine GenBank WGS Statistics <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/statistics/> > (accessed 27.04.2016.).
- De Groot, M.J., Bundock, P., Hooykaas, P.J., Beijersbergen, A.G., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nat. Biotechnol.* 16, 839–842. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0998-839>.
- Hänsch, S., Cilli, E., Catalano, G., Gruppioni, G., Bianucci, R., Stenseth, N.C., Bramanti, B., Pallen, M.J., 2015. The *pla* gene, encoding plasminogen activator, is not specific to *Yersinia pestis*. *BMC Res. Notes* 8, 535. <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-015-1525-x>.
- Kodama, Y., Shumway, M., Leinonen, R., 2012. The sequence read archive: explosive growth of sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 40, 2011–2013. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr854>.
- Levy, P.Y., Fenollar, F., Stein, A., Borriero, F., Cohen, E., Lebaill, B., Raoult, D., 2008. *Propionibacterium acnes* postoperative shoulder arthritis: an emerging clinical entity. *Clin. Infect. Dis.* 46, 1884–1886. <http://dx.doi.org/10.1086/588477>.
- Lima, V.S., Iniguez, A.M., Otsuki, K., Ferreira, L.F., Araújo, A., Vicente, A.C.P., Jansen, A.M., 2008. Chagas disease in ancient hunter-gatherer population, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1001–1002. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1406.070707>.
- NCBI Resource Coordinators, 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 44 (Database issue), D7–D19. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1290>.
- Nicoletti, G., Corbella, M., Jaber, O., Marone, P., Scevola, D., Faga, A., 2015. Non-pathogenic microflora of a spring water with regenerative properties. *Biomed. Rep.* 3 (6), 758–762.
- Pucu, E., Cascardo, P., Chame, M., Felice, G., Guidon, N., Vergne, M.C., Campos, G., Leles, D., 2017. Study of Infectious Diseases in Archaeological Material: A Dataset. *Data In Brief*.
- Rose, T.M., Schultz, E.R., Henikoff, J.G., Pietrokovski, S., McCallum, C.M., Henikoff, S., 1998. Consensus-degenerative hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res.* 26 (7), 1628–1635.
- Solomon, B., Kingsford, C., 2016. Fast search of thousands of short-read sequencing experiments. *Nat. Biotechnol.* 1–6. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3442>.
- Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(96\)02755-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(96)02755-7).
- Zylberberg, H., Vargaftig, J., Barbiex, C., Pertuiset, N., Rothschild, C., Viard, J.P., 1996. Invertebraldiskitis caused by *Propionibacterium acnes*: a report of four cases. *Clin. Infect. Dis.* 23 (9), 643–644.



The History of Evolution of Life on Earth Told by Paleoparasitology



Paula Cascardo, Elisa Pucu and Daniela Leles*

Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal Fluminense, Brazil

Submission: February 26, 2017; Published: April 11, 2017

*Corresponding author: Daniela Leles, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal Fluminense, R. Prof. Hernani Melo, 101 - São Domingos, Niterói - RJ, 24210-130, Brazil, Email: dleles@id.uff.br

Abstract

Through the study of parasites and other microorganisms in ancient material Paleoparasitology can presuppose on the way of life of our ancestors, established relations with and between animals and the environment, and their reflexes until the contemporary period dealing with several areas of knowledge. Therefore, it has been possible to recover intestinal parasites from coprolites of *Cinodontes* and *Dicynodontes* dating to 240mya, a group with important evolutionary aspects for the origin of mammals. The finding of primitive forms of *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp., and *Leishmania* spp. in amber dating back thousands of years has shed light on discussions about the origin and evolution of parasite species that affect humans today. The study of lice DNA helped to discover when clothing emerged in mankind, and that was an important point for the conquest of the icy continents. The discovery of "geohemints" in coprolites of the Americas pre-Columbian period reaffirmed that the first Amerindians also arrived by the sea, and not exclusively by the Bering Strait. It showed the influence of diseases on the fall of emperors and wars such as the possible death of "Pharaoh Tutankhamun" from malaria, battles of the "Great Crusades" may have been lost due to chronic diarrhea caused by intestinal protozoa, or death of Napoleon soldiers by the trench fever. Thus Paleoparasitology helps to tell the story of life on earth using parasites as a clue.

Keywords: Paleoparasitology; Parasites; Extinct animals; Human history; Ancient DNA; Coprolite; Evolution

Introduction

Our ancestor's life, their relationships among animals and environment, and their evidences until the contemporary period, are only part of the potential that the Paleoparasitology line of research can unveil. This science studies parasites and other microorganisms such as bacteria, virus and fungi in ancient materials. Through it we are able to assume cultural habits, the interaction between the environment and other animals, the contact with other groups, human and animal migrations routes, landing modifications, and the development, spread and circulation of pathogens, which can influence what we observe in the planet today. Paleoparasitology can therefore contribute and dialogue with several different areas of expertise, such as archaeology, paleontology, anthropology, history, biogeography, microbiology and parasitology, among others. We currently work with evidence that are either indirect, such as historical documentation, iconography, and even bone lesions that leave clues of the parasite etiology; or direct evidence in which there is a proof of existence by microscopy, immune diagnostics or molecular biology of the parasites in a given sample, such as coprolites, latrines, amber, mummified tissues, bones, teeth, clothes, hair, funerary urns, among others. There were several

discoveries done by this science, especially due to the innovations in the diagnostic methodology, related to the comparison with modern material.

In 1993, the first movie of the series "Jurassic Park" was released. It was directed by Steven Spielberg and inspired by the book written by Michael Crichton. In the movie, dinosaurs that live in the park were created by genetic engineering through the recovery of aDNA (ancient DNA) from hematophagous insects preserved in amber. In the scientific point of view in the present time, it is known that it is not possible to recover DNA fragments of dinosaurs, due to the fact that they lived millions of years ago and the recovery of ancient DNA is only possible until 1.5 millions of years. However even this date is contested due to the difficulty to recover DNA. Even with all the obstacles, Paleoparasitology has been making fantastic discoveries when studying extinct animals, even without the aid of molecular biology.

Discussion

In a paleontological site in Rio Grande do Sul, Brazil, species of intestinal parasites were discovered in coprolites of 240 million years from *Cynodontes* and *Dicynodontes*, a group with an

evolutionary aspect important for the appearance of mammals [1,2].

Studies with amber have generated important discussions in the origin of certain diseases, despite the impossibilities of aDNA recover on account of its antiquity. Researchers have found three hematophagous insects in the same amber piece, one of them is an insect of the genus *Culex* in which they found, primitive forms of *Plasmodium* spp., that causes malaria in human and non-human primates in the old and new world [3], and in a fecal drop of another insect, triatomine, primitive forms of *Trypanosoma* spp. Additionally, in this same piece researchers found mammal hair possibly from bats. This shows a probable 45 million year host-parasite interaction between bats and tripanosomas helping understand about the infection that occurs in humans by these parasites [4]. In another amber piece dated from ~100-105 millions of years flagellates were identified in environmental debris and also on the interior of a sand fly larvae prisoned inside the resin. Thus, it is discussed the origin of this parasite and how the cycle vertebrate-vector started, as today humans are also included in the leishmania transmission by mainly sand flies that ingest these flagellates [5].

The last mass extinction occurred during the Quaternary between 50.000 to 3.000 years ago, with the disappearance of two thirds of mammal genera and half of the species that weighted more than 44 kg. The hypotheses brought up by scientists are human competition and predation [6], and drastic climate change that may have been the main cause of this mass extinction [7]. The extinct mammals of that period are, for instance, the mastodon, saber-tooth tiger, mammoths and the famous giant ground sloths that occurred in the late Pleistocene. Even though most studies that search parasites in extinct mammals are performed by the use of optical microscopy, such as the ones already published with coprolites of the extinct ground sloth [8,9], the recovery of ancient DNA is a reality mainly for animals that lived until the end of the Quaternary, during the "Ice Age", condition that provide a good preservation of their organic remains. A molecular study done with coprolites of an extinct six-thousand-year old bird from New Zealand, Moa, identified DNA of Apicomplexa, Nematoda and Trematoda. While by optical microscopy only nematode eggs were identified [10], this study shows how important it is to combine different techniques.

Therefore, the studies of these materials give us plenty of information, such as: which parasites were present at that time; which were extinct with their hosts; which adapted and switched to new hosts; or even hybridized into a new species that could have then infected and parasitized humans or vice versa; or were extinct by the influence of humans. If we approximate the time scale we can find studies of animals that are extinct but occurred in the same period as the humans such as the caprines of Mallorca, *Myotragus balearicus* Bate 1909. In a paleoparasitological study with coprolite samples of these animals', cysts of *Entamoeba* sp. were found by microscopy.

These coprolites were also positive for *Cryptosporidium* spp. by immunodiagnostic. It is believed that the extinction of this caprine species occurred by the domestic species introduction that led to the spread of new pathogens to this isolated and non-immune species [11].

A recent study of extinct rodents of the last century demonstrated with the aid of molecular biology, extinction due to an invasive exotic species [12]. Two species native to Christmas Island, in the East of the Indian Ocean would have gone extinct due to an infection by a trypanosomatid introduced by *Rattus rattus*, an exotic species in the island, according to the parasitologist Durham [13] *R. rattus* would have carried infected fleas infesting consequently the native species of the island: *Rattus macleari* e *Rattus natwitis*. These native species are then susceptible hosts with high sensibility that caused their extinction in only nine years, between 1899 and 1908. In this study, Wyatt et al. [12] found *Trypanosoma lewisi* DNA in specimens of *R. macleari* and *Rattus natwitis* that were collected after the introduction of black rats in the island and did not in *R. natwitis* specimen collected before. This study supported H.E. Durham's hypothesis, even though only few specimens were analyzed.

Thus, the study of ancient diseases can be an aid in understanding more about life conditions at the time. Also, it can tell us the risks of introducing new species in established ecosystems. Parasites also occurred on humans when they first appeared, either by the interaction with other animals and their environment or host switching. Finding these parasites helps us discover: population density due to the spread of some species of parasites and microorganisms; where the host went by; which parasites passed from animals to humans; what kind of food they ingested, if it was raw or cooked; and also the hygiene habits of different populations [14,15].

One of the studies with lice DNA has helped find out when clothes started to be worn by humans, which was an important factor for their spread in cold continents. This study was possible when they separately dated the head louse (*Pediculus humanus capitis*) from the body louse (*Pediculus humanus humanus*). The body louse spends its entire life attached to the host clothes, only going to the host's skin for hematophagy. This louse species could only have occurred on humans after clothes started being worn [16].

A study by Dr. Araujo et al. [17] was able to corroborate and reaffirm that the first inhabitants of the American continent also arrived by the sea, and not exclusively by the Bering Strait. Scientists found geo-helminthes, parasites that spend part of their life cycle in the soil with suitable abiotic conditions, i.e. temperature, humidity and oxygen, to maintain their life cycle in their human hosts and be transmitted to the other potential hosts. Thereby, finding these human specific parasites in the coprolites of the first inhabitants of the American continent shows that they arrived already parasitized. Also, these parasites

could not have survived if they passed through the Bering Strait with freezing temperatures.

Paleoparasitology also helps rewrite events that were part of the history of humankind. One of the biggest mysteries was King's Tutankhamun cause of death. Paleoparasitology, with the aid of molecular biology was able to recover DNA vestiges of *Plasmodium falciparum*. This species is more aggressive, and since the pharaoh's health was debilitated, he could have passed away of malaria [18]. Diseases could also have an impact on wars: historical documentation relates that soldiers and nobles part of the "Great Crusades" suffered from chronic diarrhea. The cause can be found with the study of the latrines that were used by the members of the "Great Crusades", where researchers detected intestinal protozoa antigens [19]. In the case of Napoleon Bonaparte's army, it was not only the cold that was a problem for the soldiers and had an impact on their health, but also a species of bacteria that causes trench fever, *Bartonella quintana*, transmitted by body lice. This species is more abundant in people with immune deficiency, and could have led to the soldiers' death since they showed no evidence of war injuries [20].

Conclusion

As we have seen thus far, Paleoparasitology is a science in expansion. Today there are several research groups in several parts of the world trying to evince the evolutionary history of life on earth and its implications on the modern days.

Acknowledgment

Financial Support: FAPERJ - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro.

Conflict of Interest

We declare that there is no economic interest or conflict of interest

References

- da Silva P, Borba VH, Dutra JMF, Leles D, da-Rosa AAS, et al. (2014) A new ascarid species in cynodont coprolite dated of 240 million years. *An Acad Bras Ciênc* 86(1): 265-269.
- Hugot JP, Gardner SL, Borba V, Araujo P, Leles D, et al. (2014) Discovery of a 240 million year old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates. *Parasit Vectors* 7(1): 486.
- Poinar G (2005) *Plasmodium dominicana* n. sp. (*Plasmodiidae: Haemospororida*) from Tertiary Dominican amber. *Syst Parasitol* 61(1): 47-52.
- Poinar G (2005) *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the first fossil evidence of a triatomine-trypanosomatid vector association. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5(1): 72-81.
- Poinar G (2007) Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(5): 635-637.
- Barnosky AD (2008) Megafauna Biomass Tradeoff as a Driver of Quaternary and Future Extinctions. In: *Awise JC, Hubbell SP, Ayala FJ (Eds.), In the Light of Evolution. Volume II: Biodiversity and Extinction*, The National Academies Press 500 Fifth Street., N.W. Washington, DC, USA, pp. 227-241 & p. 432.
- Lorenzen ED, Nogués-Bravo D, Orlando L, Weinstock J, Binladen J, et al. (2011) Species-specific responses of Late Quaternary megafauna to climate and humans. *Nature* 479(7373): 359-364.
- Ringuelet RA (1957) Restos de probables huevos de nematodes en el estiércol del edentado extinguido *Mylodon listai* (Ameghino). *Ameghiniana* 1(1-2): 15-16.
- Schmidt GC, Duszynski DW, Martini PS (1992) Parasites of the Extinct Shasta Ground Sloth *Nothrotheriops shastensis*, in Rampart Cave, Arizona. *J Parasitol* 78: 811-816.
- Wood JR, Wilmschurst JM, Rawlence NJ, Bonner KI, Worthy TH, et al. (2013) A Megafauna's Microfauna: Gastrointestinal Parasites of New Zealand's Extinct Moa (Aves: Dinornithiformes). *PLoS One* 8(2): e57315.
- Borba Nunes VH, Alcover JA, Silva VL, Cruz PB, Machado-Silva JR, et al. (2017) Paleoparasitological analysis of the extinct *Myotragus balearicus* Bate 1909 (Artiodactyla, Caprinae) from Mallorca (Balearic Islands, Western Mediterranean). *Parasitol Int* 66(22): 7-11.
- Wyatt KB, Campos PF, Gilbert MT, Kolokotronis SO, Hynes WH, et al. (2008) Historical Mammal Extinction on Christmas Island (Indian Ocean) Correlates with Introduced Infectious Disease. *PLoS One* 3(11): e3602.
- Durham HE (1908) Notes on Nagana and on some Haematozoa observed during my travels. *Parasitology* 1(03): 227-235.
- Ujvari SC (2008) A história da humanidade contada pelos vírus. Editora Contexto, São Paulo, Brasil, p. 202.
- Ferreira LF, Reinhard KJ, Araújo A (2011) Fundamentos da Paleoparasitologia. Fundação Oswaldo Cruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil, p. 484.
- Toups MA, Kitchen A, Light JE, Reed DL (2011) Origin of clothing lice indicates early clothing use by anatomically modern humans in Africa. *Mol Biol Evol* 28(1): 29-32.
- Araujo A, Reinhard KJ, Ferreira LF, Gardner SL (2008) Parasites as Probes for Prehistoric Human Migrations? *Trends Parasitol* 24(3): 112-115.
- Hawass Z, Gad YZ, Ismail S, Khairat R, Fathalla D, et al. (2010) Ancestry and pathology in King Tutankhamun's family. *JAMA* 303(7): 638-647.
- Mitchell PD, Stern E, Tepper Y (2008) Dysentery in the crusader kingdom of Jerusalem: an ELISA analysis of two medieval latrines in the City of Acre (Israel). *Journal of Archaeological Science* 35(7): 1849-1853.
- Raoult D, Dutour O, Houhamdi L, Jankauskas R, Fournier PE, et al. (2006) Evidence for Louse-Transmitted Diseases in Soldiers of Napoleon's Grand Army in Vilnius. *J Infect Dis* 193(1): 112-120.



This work is licensed under Creative Commons Attribution 4.0 License

Your next submission with Juniper Publishers will reach you the below assets

- Quality Editorial service
- Swift Peer Review
- Reprints availability
- E-prints Service
- Manuscript Podcast for convenient understanding
- Global attainment for your research
- Manuscript accessibility in different formats
(Pdf, E-pub, Full Text, Audio)
- Unceasing customer service

Track the below URL for one-step submission
<https://juniperpublishers.com/online-submission.php>

Capítulo 6:

Principais dificuldades encontradas no trabalho com DNA parasitário antigo

Autores: Elisa Pucu, Paula Cascardo e Daniela Leles

Universidade Federal Fluminense – RJ

Introdução

A análise de DNA antigo (aDNA) tem avançado ao longo dos anos, com novas técnicas e protocolos estabelecidos, porém o estudo do aDNA parasitário ainda tem sido um desafio. A maior preocupação em analisá-lo é a verificação de sua autenticidade e da informação que este contém (Golenberg et al. 1996). Este capítulo tem como objetivo identificar as principais dificuldades relacionadas à análise de aDNA parasitário, desde a coleta da amostra até a interpretação dos resultados.

Conservação e Degradação

Se estudamos DNA parasitário antigo é porque este se preservou em vestígios orgânicos em condições ambientais, naturais ou intencionais que propiciaram sua conservação. Contudo, sua preservação nunca é completa e sempre vem acompanhada de variados estágios de degradação que em geral dependerão ou estarão associados a sua idade, tipo de amostra, local onde foi encontrada e a que condições esteve submetida ao longo do tempo,



SUMÁRIO



mecanismos de autólise, ação de microorganismos, oxidação, hidrólise e outros fatores (Fulton, 2012). Conseqüentemente, o DNA recuperado encontra-se fragmentado, a maioria das pesquisas pressupõe que fragmentos de no máximo 500 pares de base possam ser recuperados e com datação não superior a 1,5 milhão de anos. (Golenberget al. 1996; Pääbo et al., 2004; Dittmar, K. 2011). Assim as análises moleculares do DNA parasitário antigo exigem que todas as etapas do processo visem o aumento das chances de encontrar o DNA alvo e minimizem a possibilidade de contaminação com DNA moderno: seja durante a coleta da amostra, seu transporte e armazenamento, ou no laboratório durante a execução dos experimentos como extração do DNA e PCR. É importante ressaltar que o armazenamento da amostra após a coleta pode ser um ponto crítico, há estudos que demonstram que o dano causado durante esse processo pode ser maior do que todo o tempo em que esta ficou no sítio arqueológico (Pruvost et al. 2007).

Contaminação

Pré-contaminação

A pré-contaminação é considerada aqui desde o momento de deposição da amostra, escavação, até o início do estudo molecular. Talvez o tipo de contaminação que ocorreu em período anterior a escavação seja o mais difícil de prever ou identificar. Cuidados na manipulação de amostras, seja durante a escavação ou em laboratório, é especialmente crítico para estudos de aDNA humano (Pilli, E. et al. 2013). Porém, na paleoparasitologia a intenção é recuperar o aDNA parasitário e por isso deve-se preocupar principalmente com a contaminação ambiental. É importante o uso de luvas (sem amido) durante a manipulação do material paleoparasitológico evitando contaminação deste com amido que poderia ser considerado como parte da dieta daqueles indivíduos, falseando os resultados, ou particularmente para ensaios de PCR em que pode agir como um inibidor da reação. Para coprólitos recomenda-se o armazenamento em ambientes secos ou congelados para evitar reidratação prematura e não controlada (Dittmar, K.,



2011). Como alguns parasitos podem estar no solo, para coprólitos seria importante a coleta de um controle de campo em local próximo ao achado. Neste caso se o seu controle de campo der positivo nas análises para o mesmo parasito que se está estudando no coprórito, pode se estar diante de um contaminante moderno, ou porventura um parasito presente no ambiente a época de ocupação do sítio (análises complementares deverão ser feitas em laboratório). No caso dos sedimentos encontrados em fossas e latrinas antigas também é importante coletar amostras controle em áreas adjacentes a elas para se estabelecer comparações, o mesmo se aplica a sepultamentos em que se coleta preferencialmente material dos ossos sacro e da pelve (Sianto et al. 2013). Deve-se considerar a contaminação com parasitos modernos principalmente em assentamentos utilizados continuamente ao longo do tempo, podendo ocorrer contaminação entre camadas estratigráficas antigas ou mesmo com material fecal moderno de animais e humanos (Dittmar, K., 2011). O risco é minimizado para pesquisa de parasitos sistêmicos que poderiam ser estudados nos ossos, sendo que os mesmos não tem um ciclo no solo. Por isso, é fundamental o conhecimento parasitológico para melhor condução do experimento.

Descontaminação

Muitos trabalhos com aDNA utilizam artifícios com a intenção de descontaminar a amostra antes de realizar a extração do DNA, ex: lavagem com hipoclorito, luz ultravioleta e raspagem da superfície exterior. Esses métodos, apesar de úteis em muitos casos, não garantem a descontaminação devido a porosidade de muitos materiais estudados, sejam ossos ou coprólitos. Devem portanto ser considerados com cuidado uma vez que podem inclusive danificar ou mesmo destruir o DNA endógeno (aDNA) (Willerslev et al. 2004; Gilbert, et al. 2005; Gilbert et al. 2006).



Pós-contaminação

Chamamos aqui de pós-contaminação aquela que ocorre em laboratório durante os ensaios moleculares, e talvez essa seja a mais fácil de ser evitada ou identificada quando ocorre. Um dos maiores (se não o maior) problemas no estudo de aDNA é a contaminação por DNA moderno devido principalmente a concentrações de produtos de PCR amplificados, o que pode gerar falsos positivos (Willerslev et al. 2005). Por isso, laboratórios de aDNA precisam estar fisicamente e logisticamente isolados, preferencialmente em prédios onde não ocorrem pesquisas com biologia molecular em material moderno. Os usuários do laboratório devem transitar do antigo para moderno, diminuindo ainda mais a probabilidade de contaminação (Willerslev et al. 2005). Análises devem ser replicadas em outros laboratórios a fim de comprovar os resultados obtidos (Willerslev et al. 2005).

A degradação do DNA endógeno reduz a sua quantidade a níveis muito baixos o que aumenta a susceptibilidade à contaminação com DNA exógeno que ficará em maior quantidade, advindos do contato com tecidos vivos que contenham DNA semelhante ou de *amplicons* provenientes de reações em cadeia da polimerase anteriores. Assim, quando a reação começa a maior quantidade de DNA contaminante direciona o anelamento dos *primers* para essas fitas mais abundantes em detrimento das de intenção do estudo. (Sampietro, M. L. et al. 2006). A seguir descreveremos critérios de autenticidade para o trabalho com aDNA propostos inicialmente por Cooper & Poinar (2000) que em parte nós adaptamos e modificamos para o trabalho com aDNA parasitário e incluímos alguns que temos usado ao longo dos anos em nossas pesquisas.



Quadro 1- Critérios para autenticação dos resultados moleculares de aDNA parasitários.

Critérios para autenticação de resultados moleculares

1. Área física isolada – toda pesquisa com aDNA deve ser feita em ambiente isolado e específico para trabalho com DNA antigo.
2. Todas as etapas de ensaio molecular devem ser preferencialmente feitas em ambientes separados: a) uma área para recebimento, pré-tratamento e descontaminação da amostra se necessário. b) uma área para Extração do aDNA e preferencialmente dentro de câmara de segurança biológica/ fluxo laminar. c) área para realização do mix da PCR; d) Área para colocar o DNA no mix da PCR; e) sala para corrida eletroforética dos produtos amplificados e fotodocumentação dos resultados. e) área para purificação dos produtos amplificados.
3. Controles negativos – utilizar controles durante extração e PCR, e quando disponível usar o controle coletado no campo para detectar contaminações esporádicas. Nunca usar controles positivos pois são potenciais fontes de contaminação. Além disso, recomenda-se relatar todas as contaminações ocorridas.
4. Comportamento molecular apropriado – O poder da PCR deve ser inversamente proporcional ao tamanho do fragmento produzido (produtos maiores que 500-1000 pares de bases não são usuais). As sequências devem manter sentido filogenético. Recomenda-se o uso de alvos multi-cópias e o uso de *Taq* polimerase de alta fidelidade. Um critério adicional a ser adotado é tentar se amplificar o DNA alvo usando-se *primers* que amplificam produtos maiores que 500pb, o mesmo não deve amplificar se de fato o DNA parasitário for endógeno/antigo.
5. Reprodutibilidade – Os resultados devem ser passíveis de reprodução a partir do mesmo ou de extrato diferente do espécime.



6. Clonagem – Sequências diretas de DNA devem ser verificadas por clonagem para determinar a relação de sequências endógenas e exógenas, e erros induzidos por danos. Fragmentos sobrepostos são desejáveis para confirmar se tais variações na sequência são autênticas e não produtos de erros ocorridos quando a amplificação começa de um pequeno número de modelos danificados. A clonagem também é uma estratégia utilizada para aumentar a quantidade de alvos disponíveis e obtenção de sequências de melhor qualidade. Contudo, alguns pesquisadores consideram que não há necessidade da clonagem, sendo o sequenciamento direto suficiente para análise.

7. Replicação independente – Contaminação intra-laboratorial só pode ser descartada quando amostras separadas do espécime são extraídas e sequenciadas em laboratórios independentes. Isso é particularmente importante para vestígios humanos e quando ocorrem resultados não esperados.

8. Preservação bioquímica – Evidências indiretas da preservação do DNA antigo em um espécime podem ser conseguidas pela avaliação da quantidade total, composição e extensão relativa de mudanças diagenéticas em aminoácidos e outros resíduos.

Quadro: Modificado de Cooper & Poinar (2000)

Problemas na reação de PCR

As técnicas utilizadas para a pesquisa de DNA antigo são, a princípio, as mesmas utilizadas em estudos de DNA moderno, como: extração de DNA, amplificação por PCR, sequenciamento de DNA, dentre outras (Hofreiter et al. 2003). Porém, apesar das sequências de aDNA poderem ser amplificadas por PCR o tamanho da sequência é menor do que do DNA moderno e podem ocorrer “danos” induzidos por radicais livres, bloqueando o alongamento das fitas de DNA pela *Taq* polimerase (Pääbo et al. 2004). Ácidos nucleicos extraídos de material antigo frequentemente contém estes inibidores da ação da *Taq* polimerase o que compromete a reação. Pode-se resolver em parte este problema através da purificação do DNA depois da extração (Handt et al. 1994).



Alvos moleculares e seus problemas

Amostras de aDNA têm uma grande possibilidade de estarem contaminadas por DNA humano moderno e outros DNAs que são co-extraídos durante o processo, porém protocolos têm sido desenvolvidos para reconhecer o DNA contaminante (Pilli et al. 2013). Para se poder amplificar o DNA muito degradado, *amplicons* são mais curtos, aumentando a probabilidade de que a amostra antiga terá a região alvo e será amplificada. Em algumas pesquisas se utiliza a estratégia de uma PCR reconstrutiva previamente a realização da PCR convencional (Golenberg et al. 1996). Muitos estudos utilizam *primers* universais que podem amplificar uma variedade de espécies, aumentando a chance de que o PCR irá amplificar os traços do *template* fragmentado que inclui tanto aDNA quanto moderno gerando resultados falsos-positivos (Leonard et al. 2007).

Os alvos moleculares utilizados para identificar aDNA parasitário nas amostras antigas são muitas vezes desenhados a partir de sequências depositadas, mas também são utilizados alvos já testados e descritos na literatura. Em alguns casos, estes alvos já descritos têm tido a capacidade de amplificar DNA de outros organismos que não o que se propunha. A cada momento novas sequências estão sendo depositadas em bancos *online*, podendo explicar esta ocorrência já que alvos que anteriormente alinhavam somente com determinado organismo futuramente mostram-se menos específicos levando a essas ampliações inesperadas. Este fato pode tanto ter um caráter positivo quanto negativo, pois ainda que se amplifique algo que você não esperava encontrar na amostra, é possível que se trate de um DNA parasitário endógeno e de fato antigo, assim desde que se verifique a autenticidade do achado este pode ser bem vindo. Porém, são poucos os trabalhos que tratam deste problema e relatam os achados inesperados (ver Barnes et al. 2006; Hänsch et al. 2015).



Conclusões finais

Os humanos e outros organismos biológicos podem contaminar uma amostra em qualquer estágio: desde a descoberta, escavação, e até no laboratório. Qualquer extração de aDNA pode ser uma mistura de DNA endógeno e ambiental (Linderholm, 2016). Por isso sem sombra de dúvida o principal desafio de quem trabalha com paleoparasitologia molecular continua a ser a contaminação com DNA moderno. Assim, muitas vezes mesmo adotando os critérios de autenticidade aqui apontados, falhas poderão não ser detectadas. Mas de fato esses critérios minimizam consideravelmente as chances de falso positivos.

Perspectivas

Hoje uma das abordagens mais utilizadas para recuperação do aDNA parasitário continua a ser a PCR, nos seus mais variados tipos. Porém, ainda que haja protocolos otimizados e várias infecções tenham sido estudadas por esse método como os propostos neste guia prático de protocolos, não podemos deixar de mencionar que para materiais muito raros e em pouca quantidade tal abordagem pode esgotar o material sem que este tenha fornecido todas as informações nele contidas. Nesse sentido, para essas amostras “especiais” uma varredura de todo o DNA seria preferível, nos parecendo que a abordagem mais adequada na atualidade para este tipo de amostra seria o ensaio metagenômico.

Referências:

1. COOPER, A.; POINAR, H. N. Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, vol. 289 n.5482, p.1139, 2000.
2. DITTMAR, K. Paleoparasitologia e DNA antigo. In: Ferreira, L.F., Reinhard, J.J., e Araújo, A. *Fundamentos da Paleoparasitologia*. 2011. Editora FIOCRUZ. pp.287-299.



3. GILBERT, M. T. P. et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science*, v.32, p. 785-793, 2005.
4. GILBERT, M. T. P. et al. Insights into the Processes behind the Contamination of Degraded Human Teeth and Bone Samples with Exogenous Sources of DNA. *Int.J.Osteoarchaeol.*, v.16, p.156-164, 2006.
5. GOLENBERG, E.M. et al. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*. v. 24, n. 24, p.5026-5033, 1996.
6. HANDT, O. et al. Ancient DNA: methodological challenges. *Birkhäuser Verlag Basel, Experientia* 50, p. 524-529, 1994.
7. KRINGS, M. et al. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, v.90, p. 19-30, 1997.
8. LEONARD, J.A. et al. Animal DNA in PCR reagentes plagues ancient DNA research. *Journal of Archaeological Science*, v.34, pp. 1361-1366, 2007.
9. LINDERHOLM, A. Ancient DNA: the next generation – chapter and verse. *Biological Journal of the Linnean Society*, v.117, p. 150-160, 2016.
10. PÄABO, S. et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, v.38, p. 645-679, 2004.
11. PILLI, E. et al. Monitoring DNA Contamination in Handled vs Directly Excavated Ancient Human Skeletal Remains. *PLOS ONE*, v.8, n.1, p. 1-6, 2013.
12. PRUVOST M, SCHWARZ R, CORREIA VB, CHAMPLOT S, BRAGUIER S, MOREL N, FERNANDEZ-JALVO Y, GRANGE T, GEIGL EM. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci US A*. v.104, n.3:739-44, 2007.



13. RÖMPLER, H. et al. Multiplex amplification of ancient DNA. *Nature Protocols*, v.1 n.2, p. 720-728, 2006.
14. SAMPIETRO, M. L. et al. Tracking down Human Contamination in Ancient Human Teeth. *Mol. Biol. Evol.*, v.23, n.9, p.1801–1807, 2006.
15. SIANTO, L. ;LELES, D.; TEIXEIRA-SANTOS, I. ; Camacho M ;IÑIGUEZ, A.L.; ARAUJO, A.. Coleta de amostras para exames paleoparasitológicos. In: Madu Gaspar, Sheila Mendonça de Souza. (Org.). *Abordagens Estratégicas em Sambaquis*. 1ed. Erechim, RS: Habilis, 2013, v. 1, p. 251-260.
16. WILLERSLEV, E.; COOPER, A. Ancient DNA. *Proceedings of The Royal Society*, v.272, p. 3-16, 2005.
17. FULTON, T.L. Setting Up an Ancient DNA Laboratory. In: *Ancient DNA – Methods and Protocols*. Beth Shapiro, Michael Hofreiter, editors. New York: Publisher Humana Press, 840:1-11, p. 247, 2012.
18. BARNES, I. et al. Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in Museum osteological collections. *Proceedings of the Royal Society*, v.273, p.645-653, 2006.
19. HOFREITER, M. et al. Ancient human DNA: phylogenetic applications. *Encyclopedia of the Human Genome*, p.1-4, 2003
20. HÄNSCH, S. et al. The *pla* gene, encoding plasminogen activator, is not specific to *Yersinia pestis*. *BMC Research Notes*, vol. 8, p. 535, 2015

