

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

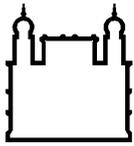
Doutorado em Biologia Parasitária

Análise paleogenética da tuberculose e perfil paleoparasitológico de  
populações do período histórico do Rio de Janeiro

Lauren Hubert Jaeger

Rio de Janeiro

26 de Fevereiro de 2014



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

Lauren Hubert Jaeger

Análise paleogenética da tuberculose e perfil paleoparasitológico de populações do período histórico do Rio de Janeiro

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador (a): Dra Alena Mayo Iñiguez

Rio de Janeiro

26 de Fevereiro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

J22 Jaeger, Lauren Hubert

Análise paleogenética da tuberculose e perfil paleoparasitológico de populações do período histórico do Rio de Janeiro / Lauren Hubert Jaeger. – Rio de Janeiro, 2014.

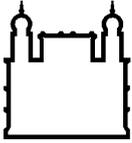
xii, 100 f.: il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2014.

Bibliografia: f. 83-100

1. Paleoparasitologia. 2. Paleogenética. 3. Tuberculose. 4. Parasitos intestinais. I. Título.

CDD 614.542



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise paleogenética da tuberculose e perfil paleoparasitológico de populações do período histórico do Rio de Janeiro

Lauren Hubert Jaeger

---

Orientador (a): Dra Alena Mayo Iñiguez

Banca examinadora:

---

Dra Constança Britto (Presidente)

---

Dr Luis Fernando Ferreira

---

Dr Harrison Magdinier Gomes

---

Dr Luciana Sianto (Suplente 1)

---

Dr Otacílio Moreira (Suplente 2)

Rio de Janeiro, 26 de Fevereiro de 2014

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra Alena Mayo Iñiguez.

Ao Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos do IOC.

Ao Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos do IOC.

Ao Dr. Ondemar Dias e ao Instituto de Arqueologia Brasileira.

Ao Laboratório de Paleoparasitologia da Universidad Nacional de Mar del Plata.

Ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias do IOC.

Ao Laboratório de Micobactérias da UFRJ.

Ao Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios do IOC.

Ao Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas do IOC.

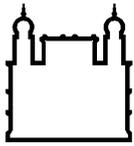
Ao Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do IOC.

À professora Sheila Mendonça de Souza.

À minha família.

À meu namorado Kenji Ramos Osanai.

Às amigas Maria Isabel Nogueira Di Azevedo, Lucélia Guedes Barreto e Yasmine Rangel Vieira.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análise paleogenética da tuberculose e perfil paleoparasitológico de populações do período histórico do Rio de Janeiro

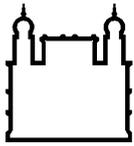
### RESUMO

Tese de Doutorado em Biologia Parasitária

Lauren Hubert Jaeger

A cidade do Rio de Janeiro foi o principal centro comercial e capital do país durante o período colonial brasileiro. A chegada de centenas de milhares de colonizadores europeus e escravos africanos à cidade desencadeou um crescimento urbano e populacional desenfreado. O objetivo do trabalho é avaliar o cenário paleoepidemiológico da tuberculose na população do Rio de Janeiro entre os séculos XVII e XIX através da análise paleogenética do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), bem como da análise do perfil paleoparasitológico e da ancestralidade humana. A infecção por bactérias do MTC foi identificada na população enterrada nos sítios arqueológicos analisados. A frequência de infecção observada foi de 53% e 25% em cemitérios europeu e africano, respectivamente. Os parasitos *Trichuris trichiura*, *Ascaris* sp., *Taenia* sp. e *Enterobius vermicularis* foram detectados através de técnicas paleoparasitológicas e paleoparasitológicas moleculares. O nematoide *T. trichiura* foi o mais comumente encontrado nos sítios arqueológicos estudados, demonstrando uma frequência de infecção de até 70%. Estes dois últimos representam o registro mais antigo dessas infecções no país. A ancestralidade humana revelou uma proeminente contribuição da população europeia na dispersão da tuberculose na cidade, e confirmou a presença da infecção em escravos africanos recém – chegados ao país. O cenário de infecção por tuberculose na cidade, assim como por parasitos intestinais, é discutido.

Palavras – chave: paleoparasitologia, paleogenética, tuberculose, parasitos intestinais.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Paleogenetic analysis of tuberculosis and paleoparasitological profile of populations of the historical period of Rio de Janeiro

### ABSTRACT

PHD Thesis in Biologia Parasitária

Lauren Hubert Jaeger

The city of Rio de Janeiro was the main commercial center and capital of the country during the Brazilian colonial period. The arrival of hundreds of thousands of European settlers and African slaves to the city triggered unbridled population and urban growth. This study aims to evaluate the paleoepidemiologic scenario of tuberculosis in Rio de Janeiro population between the seventeenth and nineteenth centuries through paleogenetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), as well as examining the paleoparasitologic profile and human ancestry. The TB infection was identified in the individuals buried in archaeological sites. The frequency of infection was observed in 53% and 25% in European and African cemeteries, respectively. The parasite *Trichuris trichiura*, *Ascaris* sp., *Taenia* sp. and *Enterobius vermicularis* were detected by paleoparasitological and molecular techniques. The latter two represent the earliest record of these infections in the country. The nematode *T. trichiura* was the most commonly found in archaeological sites studied, showing an infection rate of up to 70%. The human ancestry revealed a prominent contribution of the European population in the dispersion of tuberculosis in the city, and confirmed the presence of infection in African slaves. The scenario of TB infection in the city, as well as intestinal parasites, is discussed.

Key words: paleoparasitology, paleogenetic, tuberculosis, intestinal parasites.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Coleta paleogenética e processamento do material arqueológico na unidade de paleogenética, sítio Igreja Nossa senhora do Carmo, Rio de Janeiro, Brasil.	18
Figura 3.2: Artefatos arqueológicos e amostra óssea encontrados no sítio arqueológico Cemitério dos Pretos Novos, Rio de Janeiro, Brasil	28
Figura 3.3: Artefatos arqueológicos e amostras ósseas encontrados no sítio arqueológico Cemitério da Praça XV, Rio de Janeiro, Brasil	33
Figura 3.4: Coleta paleogenética e artefatos arqueológicos encontrados no sítio arqueológico Igreja Nossa Senhora do Carmo, Rio de Janeiro, Brasil.	40
Figura 3.5: Artefatos arqueológicos e amostras ósseas encontrados no sítio arqueológico Cemitério da Praça XV, Rio de Janeiro, Brasil.	46

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C.: antes de Cristo

aDNA: ácido desoxirribonucleico antigo

BCG: bacilo de Calmette – Guerin

DNA: ácido desoxirribonucleico

CPN: Cemitério dos Pretos Novos

CPXV: Cemitério da Praça XV

CRS: *Cambridge Reference Sequence*

d.C.: depois de Cristo

DR: repetição direta

EPI: Equipamento de Proteção Individual

G+C: guanina+citosina

HIV: vírus da Imunodeficiência Humana

HVS-I: *hypervariable segment I* ou região hipervariável I

IAB: Instituto de Arqueologia Brasileira

INSC: Igreja Nossa Senhora do Carmo

IS: *insertion elemento* ou elemento de inserção

LJ: meio de cultura sólido Lowestein-Jensen

Mb: mega bases

µm: micrometros

mm: milímetros

mDNA: DNA moderno

mtDNA: DNA mitocondrial

MTC: complexo *Mycobacterium tuberculosis*

*M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*

pb: pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase

pH: potencial de Hidrogênio

rRNA: ácido ribonucleico ribossomal

SNP: *single-nucleotide polymorphism*

TB: tuberculose

## ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Paleoparasitologia e paleoparasitologia molecular	1
1.1.1 DNA antigo	2
1.1.2 Fatores Tafonômicos	3
1.2 Tuberculose	4
1.2.1 O gênero <i>Mycobacterium</i>	4
1.2.2 Tuberculose: A doença	5
1.2.3 Epidemiologia	7
1.2.4 Origem MTC e linhagens atualmente existentes no mundo	8
1.2.5 A Tuberculose no passado	10
1.3 Parasitos intestinais	12
1.4 Ancestralidade humana	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 ARTIGOS CIENTÍFICOS	18
3.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil	18
3.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Complex in Remains of 18th–19th Century Slaves, Brazil	28
3.3 Paleoparasitological results from XVIII century human remains from	

Rio de Janeiro, Brazil	33
3.4 Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th century in Rio de Janeiro, Brazil	40
3.5 The <i>Praça XV</i> cemetery: an opportunity for the study of infectious and parasitic diseases in colonial Rio de Janeiro	46
4 DISCUSSÃO	67
4.1 Tuberculose	67
4.2 Parasitos intestinais	74
4.3 Ancestralidade Humana	78
5 CONCLUSÕES	82
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Paleoparasitologia e paleoparasitologia molecular

A paleoparasitologia é o estudo dos parasitos encontrados em remanescentes humanos e de outros animais recuperados de sítios arqueológicos, paleontológicos, ou de qualquer outra fonte em que se mantiveram preservados (Ferreira, 2011). A paleoparasitologia emerge como um braço da paleopatologia no momento em que foram buscadas formas parasitárias em material arqueológico (Araújo et al., 1981). Parasitos e seus restos podem ser detectados em coprólitos (do grego *kopros* – fezes e *lithos* – pedra) (Chame e Sianto, 2011), provenientes de sítios arqueológicos ou paleontológicos, ou dentro de corpos mumificados (Araújo et al., 2003). O estudo dos coprólitos nos permite avaliar os hábitos e dados ecológicos das populações antigas (Chame e Sianto, 2011) e suas doenças parasitárias (Araújo et al., 1981). Segundo Ferreira (2011) os primeiros trabalhos publicados na área foram o de Ruffer, em 1910, na qual descreve o achado de *Schistosoma haematobium* no tecido renal de múmias egípcias datadas de 1.250 a 1.100 a.C., e o de Szidat, em 1944, que descreve o encontro de *Trichuris trichiura* e *Ascaris lumbricoides* em corpos bem preservados da Prússia. Com o desenvolvimento da técnica de reidratação de coprólitos com fosfato trissódico, por Callen e Cameron (1960) e aperfeiçoamentos de técnicas comuns de diagnóstico parasitológico (Reinhard et al., 1988) a área da paleoparasitologia tem avançado consideravelmente. A partir daí, a análise microscópica de coprólitos tem permitido o encontro de um aumentado número de formas parasitárias.

A paleoparasitologia molecular é um campo de pesquisa dedicado à detecção, identificação e caracterização de DNA de microorganismos (bactérias, vírus, helmintos e protozoários) em espécimes arqueológicos (Iñiguez, 2011). A paleogenética é um campo de estudo mais amplo, onde são estudados não só o aDNA de microorganismos, como também aDNA de espécimes humanos, de animais e plantas (Marota e Rollo, 2002). É um campo especializado da biologia molecular aplicado ao estudo genético de materiais provenientes de sítios arqueológicos e paleontológicos (Mendonça de Souza, 1997). Um novo campo na área da paleoparasitologia molecular é a paleogenômica (Poinar et al., 2006), na

qual envolve a determinação e análise de grandes segmentos de aDNA na ordem de milhões de pares de base (pb) (Iñiguez, 2011; Keller et al., 2012).

O primeiro relato da recuperação de sequências de aDNA (DNA antigo) foi de um equídeo extinto, *Equus quagga*, por Higuchi e colaboradores (1984), através da clonagem de um fragmento do DNA mitocondrial (mtDNA) de um espécime de museu. Em 1985, a primeira sequência humana foi demonstrada por Pääbo (1985) na qual clonou e sequenciou um fragmento de DNA nuclear de uma múmia egípcia datada de 2.600 anos a.C. (antes de Cristo). A demonstração das grandes possibilidades de estudo com aDNA ficou evidenciada por um estudo de Golenberg e colaboradores (1990), através da recuperação de aDNA de um espécime do gênero *Magnolia*, datado de 17 a 20 milhões de anos atrás (Golenberg et al., 1990).

Após o desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR), por Mullis e colaboradores (1986), a área da paleoparasitologia molecular despertou interesse de diversos grupos de pesquisa. Estudos aperfeiçoando a nova técnica às características do material arqueológico foram publicados (Pääbo, 1989; Rohland et al., 2010).

Sequências de DNA de microorganismos contemporâneos fornecem evidências indiretas dos processos históricos a que foram submetidos ao longo do tempo (Hofreiter et al., 2001). Por isso, os objetivos dos estudos paleomicrobiológicos incluem: (i) a confirmação do diagnóstico paleopatológico; (ii) responder questões históricas como a origem e dispersão de diversas doenças pelo planeta; (iii) o diagnóstico das doenças infecciosas do passado através da detecção do microorganismo específico; (iv) a elucidação da epidemiologia das doenças infecciosas do passado pela reconstrução temporal e distribuição geográfica dos indivíduos infectados, reservatórios e vetores; e (v) estimar a evolução molecular dos microorganismos e a comparar os patógenos do passado com os atuais (Drancourt e Raoult, 2005; Donoghue, 2009).

### 1.1.1 DNA antigo

DNA antigo é o termo usado para designar fragmentos de DNA encontrados em material biológico preservado ou fossilizado (Brown e Brown, 1994; Iñiguez, 2011), que incluem material de origem humana ou animal, como ossos, dentes,

tecidos, cabelos e coprólitos; de origem vegetal, como sementes e material de herbários; assim como insetos em âmbar e *permafrost* (Iñiguez, 2011).

A instabilidade *post-mortem* do DNA é o problema metodológico inerente à pesquisa com aDNA (Willerslev e Cooper, 2005). O dano mais comum ao DNA em remanescentes fósseis é a degradação em pequenos fragmentos, geralmente entre 100 e 500 pb (Pääbo et al., 2004). Esta degradação *post-mortem* ocorre principalmente devido à ação de enzimas endógenas (Pääbo et al., 2004; Hofreiter et al., 2001). A rápida dessecação, baixas temperaturas e altas concentrações de sal podem inativar ou destruir essas enzimas, impedindo a quebra dos ácidos nucleicos (Hofreiter et al., 2001; Willerslev e Cooper, 2005). A degradação química pode ser causada por processos hidrolíticos e oxidativos, onde as desaminação e depurinação ocorrem (Hofreiter et al., 2001), assim como dos efeitos da radiação sobre o material (Hofreiter et al., 2001; Sawyer et al., 2012). Adicionalmente, a agressão ao aDNA pode ser causada por bactérias, fungos e insetos (Poinar et al., 2003). Diversos estudos descrevem que os danos podem causar: (i) a quebra da dupla fita de DNA, (ii) a presença de sítios sem nucleotídeos, (iii) a ligação do aDNA à proteínas, e (iv) a incorporação de bases erradas, que conseqüentemente causam ambos artefatos no sequenciamento de DNA e amplificação de DNA contaminante (Willerslev e Cooper, 2005; Paabo et al., 2004; Poinar et al., 2003; Hofreiter et al., 2001). Entretanto a taxa de degradação é dependente das condições ambientais na qual o espécime está submetido (Fletcher et al., 2003). Uma estimativa sobre a sobrevivência do aDNA evidenciou que o DNA amplificável não sobrevive mais do que 1 milhão de anos em condições ideais (Willerslev e Cooper, 2005). A potencial preservação dos componentes biomoleculares varia consideravelmente com a estrutura molecular, o ambiente deposicional e a história diagenética de cada material (Eglinton e Logan, 1991).

### 1.1.2 Fatores Tafonômicos

A conservação do material orgânico é um assunto muito discutido na área da paleoparasitologia e paleogenética. Os chamados “fatores tafonômicos” compreendem nas influências externas que o material sofre após ter sido depositado em um determinado local. A temperatura, a umidade, o pH ácido do solo, a presença de insetos são alguns fatores que influenciam na preservação do material orgânico

(Bouchet et al., 2003). A rápida interrupção da degradação é crucial para a preservação do material, por isso, é conhecido que regiões com baixas temperaturas, como regiões congeladas, preservam melhor o material orgânico (Bouchet et al., 2003), um exemplo é extrema conservação do Otzi, o “homem do gelo” descoberto nos Alpes italianos na década de 1990 (Rollo et al., 2002). O clima desértico, com baixa umidade e calor, também proporcionam uma boa conservação do material orgânico (Cockburn et al., 1998; Reinhard et al., 1992). Um exemplo é a excelente preservação de múmias Chinchorro encontradas no deserto do Atacama, no Chile (Arriaza et al., 1995). Em países com clima tropical, onde há altas temperaturas e umidade, a preservação do material orgânico muitas vezes não permite o encontro de formas parasitárias e de DNA em amostras arqueológicas.

## 1.2 Tuberculose

### 1.2.1 O gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* consiste em bacilos aeróbios não formadores de esporos, imóveis, medindo 0,2-0,6 x 1-10  $\mu\text{m}$  (Murray et al., 2006; Adèkambi e Drancourt, 2004). Apresenta uma parede celular complexa, formada principalmente por um esqueleto peptidoglicano e ácidos graxos de cadeia longa, denominados ácidos micólicos (Murray et al., 2006; Verschoor et al., 2012). A alta concentração de ácidos micólicos e a capacidade de reter o corante carbolfucsina, independente do tratamento subsequente com uma mistura de etanol e ácido clorídrico, as torna bactérias álcool-ácido resistentes (Levinson e Jawetz, 2001; Tortora et al., 2005).

As micobactérias pertencem à ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (Dorronsoro e Torroba, 2007). Atualmente, o gênero *Mycobacterium* apresenta mais de 125 espécies, que incluem organismos causadores de doenças em humanos e animais (Gomila et al., 2007; Gagneux, 2012), e são classificadas em bactérias de crescimento lento ou rápido (Adèkambi e Drancourt, 2004).

Existem dois grupos de micobactérias de importância médica: o *Mycobacterium leprae* e o chamado complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium tuberculosis complex* - MTC), que é composto pelas espécies *M. tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum* e *M. canettii*, que afetam primariamente humanos; e as espécies que afetam outros animais, como *Mycobacterium bovis* (um patógeno do gado),

*Mycobacterium caprae* (cabras e ovelhas), *Mycobacterium microti* (roedores), *Mycobacterium pinnipedii* (focas e leões-marinhos) (Gagneux, 2012, Comas e Gagneux, 2011) e *Mycobacterium mungi* (mangustos) (Alexander et al. 2010). Embora os membros do MTC exibam diferentes características fenotípicas e uma gama de hospedeiros mamíferos, eles representam um dos exemplos mais extremos de homogeneidade genética, com uma sequência idêntica do gene ribossomal RNA 16S (rRNA) (Brosch et al., 2002). As espécies do MTC apresentam entre 0,01% a 0,03% de variação nucleotídica sinônima (Gutierrez et al., 2005; Hughes et al., 2002). Além disso, os elementos de DNA repetitivos tais como a sequência de inserção IS6110 e de repetição direta (DR) são idênticos e descritos como restritos ao complexo *M. tuberculosis* (van Soolinger et al., 1997).

As micobactérias não pertencentes ao MTC são um grupo heterogêneo de bactérias denominadas de micobactérias atípicas, ambientais ou oportunistas (Dorronsoro e Torroba, 2007). São encontradas em muitos ecossistemas, como a água, a poeira e o solo, e ao causarem doença em humanos apresentam amplo espectro de sintomas clínicos e diferente suscetibilidade a drogas (Gomila et al., 2007, 2008). São considerados atualmente patógenos emergentes, pois cerca de 10% das micobactérias isoladas em laboratórios clínicos fazem parte deste grupo (Dorronsoro e Torroba, 2007).

### 1.2.2 Tuberculose: A doença

A tuberculose (TB) é um exemplo do equilíbrio ecológico entre o hospedeiro e o parasito (Tortora et al., 2005). Embora a maioria dos seres humanos desenvolvam respostas imunológicas apropriadas após a infecção, essas respostas podem não ser eficientes para erradicar a micobactéria. Em vez disso, tais respostas levam ao estado clinicamente silencioso da infecção na qual o indivíduo permanece no estado latente por décadas antes de desenvolver a doença ativa (Ernst, 2012).

Do ponto de vista de saúde pública, a tuberculose pulmonar clássica é a forma clínica mais importante devido a sua natureza infecciosa (OMS, 2013; Gagneux, 2012). Entretanto, a micobactéria pode acometer qualquer órgão do corpo, e os sinais e sintomas clínicos refletem o local da infecção (Murray et al., 2006; Zumla et al., 2008). *M. tuberculosis* é transmitido através de aerossóis contaminados eliminados por um indivíduo infectado; e em grande parte, se não exclusivamente, habita células fagocíticas profissionais dos pulmões, incluindo macrófagos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas (Ernst, 2012). Os sintomas clínicos

clássicos da TB pulmonar incluem tosse crônica, produção de catarro, perda de apetite e de peso, febre, suores noturnos e hemoptise (Zumla et al., 2013).

A TB extrapulmonar ocorre em 10 a 42% dos pacientes, dependendo da raça ou origem étnica, idade, presença ou ausência de doença subjacente, da linhagem de *M. tuberculosis*, e do estado imunológico do paciente (Caws et al., 2008; Zumla et al., 2013). A TB miliar é uma forma potencialmente fatal de TB que resulta da disseminação do bacilo através do sistema linfático e sanguíneo (Ray et al., 2013). Entretanto, estima-se que a TB miliar corresponda a menos de 2% dos casos de TB em imunocomprometidos (Caws et al., 2008). A TB osteoarticular é responsável por cerca de 1 a 3% de todos os casos de TB e é a principal causa da osteomielite. Qualquer osso ou articulação pode ser infectado pela micobactéria, mas a coluna vertebral, quadril e joelhos (Mehta et al., 2012), assim como o osso esterno e as costelas, são especialmente suscetíveis à infecção devido à alta concentração de células hematopoiéticas e vascularidade (Ortner e Putschar, 1981). O envolvimento da coluna vertebral é característica da TB óssea, onde vértebras lombares e torácicas são as mais comumente observadas acometidas pela infecção (Wilbur et al., 2009). Os corpos vertebrais são o principal foco da infecção, e sua destruição frequentemente leva ao seu colapso, e as deformidades subsequentes, muitas vezes dão origem ao aparecimento da corcunda característica (Braun et al., 1998), conhecida como doença de Pott (Crubezi et al., 1998). Em paleopatologia as lesões ósseas vertebrais sugerem a presença da doença em remanescentes humanos esqueléticos. Entretanto, essas modificações ósseas não são patognomônicas da TB (Braun et al., 1998; Wilbur et al., 2009) e o diagnóstico diferencial da TB óssea nem sempre é possível devido à similaridade com outros agravos (Baron et al., 1996). As formações anormais na superfície visceral das costelas podem ser indicativas de TB pulmonar, contudo, essas lesões ocorrem devido a um processo inflamatório secundário a uma infecção pulmonar, e também não pode ser considerado patognomônico de TB (Wilbur et al., 2009).

O método mais comumente utilizado para o diagnóstico da TB é a baciloscopia, desenvolvido há mais de 100 anos, onde as bactérias são observadas em amostras de escarro examinadas sob um microscópio (OMS, 2013; Small e Pai, 2010). Entretanto, necessita de microscopistas experientes e altas concentrações de bacilos na amostra de escarro para ter um resultado positivo, o que é incomum em amostras pediátricas (Tran et al., 2013). O método de cultura mais utilizado é o meio sólido Lowenstein-Jensen (LJ), o qual é mais sensível que a baciloscopia mas requer

longos tempos de incubação (de até 6 semanas) (Tran et al., 2013). Alguns métodos de cultura comerciais reduzem o tempo de incubação e tem sensibilidade superior ao método de cultura com meio LJ, entretanto, possuem custos elevados (Tran et al., 2013).

Na década de 1920, foi desenvolvida a única vacina para a TB. O bacilo de Calmette Guerin (BCG) é uma forma atenuada do *M. bovis*, espécie que afeta principalmente bovinos (Gagneux, 2012; Daniel, 2005). No entanto, a BCG só protege crianças contra meningite tuberculosa, a forma mais grave da doença, e não protege contra a clássica TB pulmonar em adultos (Gagneux, 2012). Novas vacinas estão sendo desenvolvidas, já em fase de triagem I e II (OMS, 2013).

A doença é mais comum entre homens do que em mulheres, e afeta principalmente adultos na faixa etária economicamente produtiva (OMS, 2013). Atualmente, vários fatores têm sido associados ao aumento da suscetibilidade dos indivíduos à TB, e a coinfeção com o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é de longe o mais importante e está fortemente associado com a doença disseminada (Caws et al., 2008).

### 1.2.3 Epidemiologia

A TB é uma doença com caráter crônico. Seu diagnóstico continua sendo a baciloscopia do escarro, método desenvolvido há mais de 100 anos (OMS, 2012a) que apresenta baixa sensibilidade; e a vacina disponível para prevenção da doença não é eficaz na prevenção da TB pulmonar (Comas e Gagneux, 2009). Esses fatores associados a negligência em relação à pesquisa básica em TB e a falta de incentivo para desenvolvimento de insumos voltados para diagnóstico e tratamento, ao longo dos anos, permitiu a reemergência da doença (Comas e Gagneux, 2009). Em 1993, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou a TB como emergência global de saúde pública (OMS, 2011a) e traçou estratégias para controlar a epidemia. Foi criada a estratégia *Stop TB*, lançada em 2006, que tem como principais objetivos diminuir consideravelmente a incidência da doença e reduzir a taxa de mortalidade e prevalência em 50% até 2015 (OMS, 2012a).

Mesmo que durante os últimos séculos a TB tenha sido a causa da metade de todas as mortes na Europa e América do Norte, hoje a doença afeta principalmente os países em desenvolvimento (Gagneux, 2012). Estimativas suportam que em 2011 a maioria dos novos casos de TB ocorreu na Ásia (59%) e África (26%), e em menor proporção na região do Mediterrâneo (7,7%), Europa (4,3%) e nas Américas (3%)

(OMS, 2012a). Apesar da introdução da quimioterapia contra a tuberculose, que começou na década de 1940, atualmente tem se observado a emergência de novos eventos da pandemia global TB/HIV/AIDS e o surgimento de resistência aos antimicrobianos (Gagneux, 2012). Estima-se que 2 bilhões de pessoas no mundo tenham a infecção latente e corram o risco de reativação (Zumla et al., 2013), proporcionando um grande reservatório para a TB, que vai durar por décadas (Barry et al., 2009).

Em 2012, existiram cerca de 8,6 milhões de novos casos de TB e 1,3 milhões de pessoas morreram da doença (incluindo 320.000 mortes entre as pessoas HIV positivas) (OMS, 2013). Apesar disso, segundo a OMS, os objetivos das estratégias de controle já foram alcançados: a incidência diminuiu ao longo dos anos, a taxa de mortalidade da doença caiu 41% desde 1990 e o mundo está a caminho de atingir a meta global de reduzir esta taxa em 50% (OMS, 2012a).

#### 1.2.4 Origem MTC e linhagens atualmente existentes no mundo

Existem algumas hipóteses para explicar o surgimento do *M. tuberculosis* como patógeno humano. Inicialmente acreditava-se que a população humana ficou livre da infecção pelas micobactérias do MTC até a domesticação do gado, que ocorreu há aproximadamente 10.000 anos atrás, e que eventos de adaptação da bactéria permitiram a especiação de *M. bovis* para *M. tuberculosis* (Barnes, 2005; Stead et al., 1995). Entretanto, esta hipótese não é mais aceita. Estudos acerca da evolução molecular demonstraram que existiu um ancestral comum a todos os membros do MTC no leste Africano, há aproximadamente três milhões de anos atrás, chamado de prototuberculosis (Gutierrez et al., 2005). Evidências paleopatológicas sugestivas de meningite tuberculosa foram descritas em um fóssil homínido, compatível com a espécie *Homo erectus*, datado de 500.000 anos atrás proveniente da região da atual Turquia (Kappelman et al., 2008). Este trabalho sugere que a infecção humana por micobactérias pré-data a existência do homem anatomicamente moderno.

O ancestral comum a todos os membros do MTC sofreu um gargalo evolutivo há aproximadamente 20.000 a 40.000 anos atrás, período que coincide com a expansão das populações humanas para fora da África (Namouchi et al., 2013; Wirth et al., 2008; Gutierrez et al., 2005; Brosch et al., 2002; Sreevatsan et al., 1997). Além disso, foi descrito um padrão de coevolução da espécie *M. tuberculosis* com o hospedeiro humano, e estudos têm demonstrado que essa interação provavelmente esteve presente nas populações de caçadores e coletores antes mesmo deles

migrarem para fora da África (Comas et al., 2013; Gagneux, 2012). Durante este período, as populações humanas viviam na forma de pequenos grupos populacionais e dispersas geograficamente, o que favoreceu a transmissão intrafamiliar e resultou na associação estável entre patógeno e hospedeiro. Acredita-se que o período de latência característico da tuberculose humana pode ser uma adaptação do *M. tuberculosis* às baixas densidades populacionais (Hersberg et al., 2008). Atualmente, o sucesso do *M. tuberculosis* como patógeno humano está associado ao aumento da densidade populacional recente, que é típico das doenças de multidão (Comas et al., 2013; Namouchi et al., 2012). Com o crescimento populacional humano desenfreado e a revolução industrial, as linhagens do patógeno associadas ao hospedeiro humano fortemente se expandiram (Wirth et al., 2008).

Este gargalo genético inicial foi seguido de 10.000 a 20.000 anos mais tarde, pela radiação de duas linhagens principais, uma das quais se espalham de humanos para animais (Wirth et al., 2008). Adicionalmente, estudos têm demonstrado que *M. bovis* e outras espécies do MTC adaptadas a animais, sofreram numerosas deleções e apresentam um genoma 60.000 pb menor que *M. tuberculosis* (Garnier et al., 2003; Brosch et al., 2002), e que embora *M. tuberculosis* e *M. bovis* dividam um ancestral comum, o cenário mais aceito atualmente sugere que o hospedeiro humano transmitiu a micobactéria aos animais, e não o contrário (Smith et al., 2009).

Um recente novo membro do MTC, o *Mycobacterium canetti*, é um bacilo raro, com um fenótipo de colônia distinta que é diferente dos outros membros descritos até o momento (van Soolinger et al., 1997). Apresenta alto grau de similaridade genética de genes constitutivos e 16S rDNA com membros do MTC (van Soolinger et al., 1997), entretanto demonstra alto grau de diversidade genética intraespecífica (Namouchi et al., 2013) e um genoma maior que os outros membros (4,5 Mb) (Namouchi et al., 2012). Estudos genéticos têm demonstrado que esta nova espécie poderia representar a linhagem mais próxima do ancestral comum aos membros do MTC, e que corresponderia à linhagem pré-gargalo evolutivo que separou as outras espécies (Brosh et al., 2002; Gutierrez et al., 2005).

Inicialmente, as linhagens do MTC foram classificadas em três grupos de linhagens (grupos 1 a 3), definidos através da análise de polimorfismos de base única (*single-nucleotide polymorphism* - SNP) nos genes catalase - peroxidase (*katG*) e DNA girase (*gyrA*) (Sreevatsan et al., 1997). A distribuição destes polimorfismos forneceu evidências que suportam a hipótese de que o grupo 1 é

ancestral ao 2, que conseqüentemente, é ancestral ao grupo 3 (Sreevatsan et al., 1997; Brosh et al., 2002). Entretanto, atualmente sabe-se que os membros do MTC evoluíram em seis principais linhagens que estão fortemente associadas com regiões geográficas particulares (linhagens filogeográficas) (Namouchi et al., 2012; Gagneux et al., 2006). A primeira migração humana para fora da África ocorreu em direção ao oceano Índico, dando origem à linhagem Indo-Oceânica (Hershberg et al., 2008). Esta linhagem inclui um grupo de cepas que têm sido consideradas “ancestrais”, já que conservam a região genômica TbD1, a qual é ausente nas cepas consideradas “modernas” de *M. tuberculosis* (Gagneux et al., 2006). Outros grupos populacionais foram em direção à Europa, norte da Índia e leste Asiático, dando origem a outras três linhagens, assim nomeadas, de acordo com a localização. A linhagem do leste Asiático inclui, entre outras cepas, a família Beijing. As linhagens África Ocidental 1 e África Ocidental 2 correspondem às cepas de *M. africanum*; e a linhagem Euro-Americana agrupa as cepas que foram inicialmente descritas como grupo 2 e 3 (Gagneux et al., 2006).

#### 1.2.5 A Tuberculose no passado

O primeiro trabalho publicado na área da paleomicrobiologia foi a detecção de aDNA de micobactérias do MTC em remanescentes esqueléticos por Spigelman e Lemma no ano de 1993. A partir deste trabalho, muitos outros têm demonstrado a infecção pelos membros do MTC em diferentes populações humanas e períodos. Uma grande questão estudada pela comunidade científica acerca da TB no passado é a presença da doença no continente americano antes da chegada dos colonizadores europeus.

É conhecido que a TB existiu no continente americano antes da chegada dos exploradores europeus. Evidências paleopatológicas sugestivas de TB foram descritas em populações pré – Colombianas do Peru, do Chile (Allison et al., 1973; 1981) e da Venezuela (Requena, 1945). Entretanto a confirmação da presença da bactéria ocorreu em 1994, com um trabalho realizado por Salo e colaboradores (1994) em que recuperam aDNA de MTC em múmias naturalmente mumificadas provenientes do sítio Chiribaia Alta, Peru, datadas de 1.000 a 1.300 d.C.. Este trabalho, juntamente com o de Spigelman e Lemma, tem particular importância, porque demonstra que os colonizadores europeus não foram os responsáveis por introduzir o MTC no continente americano. Diversos outros trabalhos têm

demonstrado a presença de aDNA de MTC em remanescentes humanos pré – Colombianos: da região andina (Konomi et al., 2002), do Chile (Arriaza et al., 1995), da Colômbia (Sotomayor et al., 2004), e do Peru (Klaus et al., 2010). Além disso, foi possível detectar a presença de lesão indicativa de TB, assim como de aDNA de MTC, em material ósseo de um bisão extinto, datado de  $17.870 \pm 230$  anos atrás, nos Estados Unidos (Rothschild et al., 2001). Este trabalho demonstrou através da técnica de *Spoligotyping* que as espécies do MTC mais prováveis por estar infectando este animal seriam *M. tuberculosis* e *M. africanum*, e não *M. bovis*.

A hipótese para explicar a presença da TB no continente americano, durante o período pré – Colombiano, é a existência de infecção por micobactérias nas populações humanas que migraram e conquistaram novos territórios pelo planeta. Acredita – se que as primeiras populações humanas modernas saíram da África em duas principais ondas de migração: uma dispersão inicial para o leste, em direção ao oceano Índico, começando entre 62.000 – 75.000 anos atrás; e uma dispersão mais tardia, em direção à Eurásia, entre 25.000 – 38.000 anos atrás (Comas et al., 2013). As populações provenientes da Ásia alcançaram o continente americano através do Estreito de Bering, e por rotas alternativas, e trouxeram consigo o *M. tuberculosis*. Entretanto, acredita – se que a doença permaneceu em baixos níveis de endemicidade e dispersa nos grupos populacionais (Daniel, 2000; 2004; Gomes i Pratt e Souza, 2003).

Outra hipótese que explicaria como e quando a TB alcançou o continente Americano propõe a introdução dessas bactérias com a vinda dos colonizadores europeus às Américas (Barnes, 2005). Evidências históricas relatam a existência de uma doença similar à TB no Velho Mundo desde a Idade Média até o início do século XX (Daniel, 2000; 2004). Estudos paleogenéticos têm demonstrado a presença de aDNA da espécie *M. tuberculosis* em remanescentes humanos muito mais antigos no Velho Mundo: datados de 9.000 anos atrás, na região do Mediterrâneo Oriental (HersHKovitz et al., 2008); assim como no Egito antigo em múmias datadas desde 3.000 até 500 a.C. (Nerlich et al., 1997; Crubezi et al., 1998; Zink et al., 2001; 2003; 2005; Lalremruata et al., 2013), e na Europa durante o período Medieval (Taylor et al., 1996; Haas et al., 2000) e durante os séculos XVIII e XIX (Fletcher et al., 2003; Bouwman et al., 2012).

Acredita – se que as duas hipóteses podem ser verdadeiras. Possivelmente: (i) a TB permaneceu em baixos níveis de endemicidade e dispersa entre os grupos

populacionais nativos americanos (Daniel, 2000); (ii) a relação parasito/hospedeiro tende ao comensalismo e a infecção benigna (Daniel, 2000; 2004); (iii) muitos grupos nativos americanos não haviam sido expostos ao *M. tuberculosis* (Daniel, 2000; 2004); (iv) a ruptura cultural e social sofrida pelos nativos americanos os tornou mais suscetíveis às diversas doenças infecciosas e parasitárias (Wilbur e Buikstra, 2006); e (v) possivelmente os colonizadores europeus trouxeram linhagens de *M. tuberculosis* diferentes e mais virulentas do que aquelas existentes no continente americano antes da sua chegada (Daniel, 2004).

### 1.3 Parasitos intestinais

As parasitoses intestinais causadas por helmintos são as infecções mais frequentes em países em desenvolvimento. Estimativas da Organização Mundial da Saúde indicam que mais de 2 bilhões de pessoas estão infectadas pelos helmintos transmitidos pelo solo, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Necator americanus* e *Ancylostoma duodenale*, em todo o mundo (OMS, 2012b). No ano de 2011 aproximadamente 800 milhões de pessoas estavam infectadas pelo nematoide *Ascaris lumbricoides*, e 600 milhões estavam infectadas por *Trichuris trichiura* e pelas espécies de ancilostomídeo, *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* (OMS, 2011b).

No Brasil os estudos com material arqueológico surgiram no final da década de 70, com o trabalho de Ferreira e colaboradores (1979), na qual descrevem ovos de ancilostomídeo e *T. trichiura* em coprólitos humanos provenientes do sítio Gruta do Gentio II, em Minas Gerais, datados do período pré – Colombiano; e o termo paleoparasitologia foi criado por esse grupo de pesquisa. Muitos grupos de pesquisa pelo mundo têm se dedicado ao estudo de parasitos no passado. Diversas publicações têm demonstrado a presença de doenças parasitárias em populações antigas e ajudam a elucidar a origem de algumas doenças parasitárias humanas.

Quase todos os parasitos humanos conhecidos têm sido encontrados em coprólitos (Gonçalves et al., 2003). Os nematóides *Enterobius vermicularis* e *Trichuris trichiura* são considerados “parasitos herdados”, pois evoluíram juntamente com o hospedeiro humano (Araújo et al., 2008; 2013). É sugerido que *E. vermicularis* acompanhou as migrações humanas e sua entrada no continente americano através de sua passagem pelo Estreito de Bering durante a última glaciação (Araújo et al., 2008). Outras rotas migratórias humanas foram propostas

analisando a infecção por parasitos intestinais em populações antigas do Novo Mundo. A presença de ancilostomídeos, *T. trichiura* e *Strongyloides stercoralis*, em coprólitos humanos de sítios americanos pré – Colombianos não pôde ser facilmente justificada pelas migrações humanas pelo Estreito de Bering, já que esses parasitos só evoluem para o estagio infetante em condições de umidade e temperatura ideais, sendo assim o ciclo biológico não se sustentaria nas extremas temperaturas da Beringia (Araújo et al., 1988; Araújo et al., 2008). Com base em modelagens paleoclimáticas e dados paleoparasitológicos usando como modelo os ancilostomídeos, apenas em circunstâncias extraordinárias e com uma velocidade significativa de deslocamento seria possível introduzir estes parasitos nas Américas (Montenegro et al., 2006).

A infecção pelo *Ascaris* sp. é conhecida no Velho Mundo desde  $30.000 \pm 140$  anos atrás (Bouchet et al., 1997) até o período histórico (Gonçalves et al., 2003); já o parasito *T. trichiura* possui uma ampla distribuição em todos os continentes, tanto no Velho quanto no Novo Mundo (Gonçalves et al., 2003). Iñiguez e colaboradores (2003) recuperaram aDNA de *E. vermicularis* a partir de coprólitos humanos em populações pré – Colombianas das Américas. Uma linhagem detectada na costa do Chile, diferente à encontrada em todos os sítios analisados e nas populações atuais, reascende a hipótese de introdução trans – pacífica do parasito (Iñiguez et al., 2006). Leles e colaboradores (2008) também aplicaram o diagnóstico paleoparasitológico molecular para *Ascaris* sp. em coprólitos humanos da América do Sul, o que possibilitou desenhar um novo panorama sobre a paleodistribuição do parasito no continente.

No Brasil, poucos estudos têm demonstrado a presença de parasitos intestinais em populações do período colonial. Estudos anteriores demonstraram a presença de infecção por *Trichuris trichiura* e Trichostrongylidae em um sítio arqueológico de Minas Gerais através da microscopia de luz (Confalonieri et al., 1981; Araujo et al., 1984), e a presença de aDNA de *Ascaris* sp. e *Trichuris trichiura* em um sítio arqueológico do Rio de Janeiro (Leles, 2010a).

#### **1.4 Ancestralidade humana**

Estudos antropológicos aplicam o conceito “raça” ou “etnia” para determinar a que grupo certo indivíduo pertence. Entretanto, nas últimas décadas, biólogos e geneticistas têm afirmado que o conceito de “raça” não é aplicável à espécie humana (Santos et al., 2009) e que “raças” humanas não são e nunca foram “puras”

(Templeton, 1998). Uma alternativa para o uso de categorias raciais ou étnicas em pesquisa genética é categorizar os indivíduos em ancestralidade. A ancestralidade pode ser definida geograficamente (por exemplo, vietnamita, norueguês) ou culturalmente (por exemplo, Apache, Yanomami) (REGWG, 2005). Entretanto, os termos raça, etnia e ancestralidade descrevem apenas uma parte da complexa rede de conexões biológicas e sociais que ligam indivíduos e grupos humanos entre si (REGWG, 2005).

A dispersão de grupos humanos anatomicamente modernos ao longo dos últimos 100 mil anos tem produzido padrões de variação fenotípica nos indivíduos (REGWG, 2005) e o mtDNA humano apresenta polimorfismos nas sequências nucleotídicas correspondentes a diferentes grupos populacionais (Salas e Amigo, 2010). O mtDNA está presente na organela mitocôndria e é de herança matrilinear (Richards et al., 2000; Salas e Amigo, 2010). Existem entre 100 e 10.000 cópias de mtDNA por célula, e são moléculas circulares que apresentam aproximadamente 16.500 pb de tamanho (Salas e Amigo, 2010). O genoma mitocondrial pode ser dividido em duas partes: a região reguladora e a região codificadora. A região reguladora ou controle é subdividida em outras duas partes, região hipervariável I e II (HVS-I e HVS-II – *hypervariable segment I e II*, respectivamente) (Salas e Amigo, 2010). Os altos níveis de variações observados na molécula de mtDNA são devido a altas taxas de mutações (Starikovskaya et al., 1998), e esta estruturado em diferentes populações ou grupos étnicos (Salas e Amigo, 2010). Atualmente, existem mais de 130.000 diferentes grupos de HVS-I mtDNA relatados na literatura (Salas e Amigo, 2010).

Diversos estudos têm utilizado o mtDNA para estudos populacionais. O estudo do perfil haplotípico mitocondrial, nas abordagens de genética forense e de aDNA, pode contribuir para o entendimento da provável origem/ancestralidade de um indivíduo, investigar as rotas de dispersão e migração de populações humanas pelo planeta (Maca-Meyer et al., 2001), estabelecer relações de parentesco entre grupos e pessoas (Chilvers et al., 2008) e determinar a distância genética entre populações que habitavam a mesma região geográfica em períodos diferentes (Kemp et al., 2009).

A divergência dos macrohaplogrupos de mtDNA inicia – se no leste africano, de onde saíram os primeiros homens anatomicamente modernos (Boattini et al., 2013).

Dados de mtDNA sugerem que indivíduos carregando o macrohaplogrupo L3 foram em direção ao norte há aproximadamente 60.000 e 70.000 anos atrás (Fernandes et al., 2012; Comas et al., 2013). Após um período de mutações, os macrohaplogrupos M e N foram formados e o ancestral L3 foi perdido (Macaulay et al., 2005). Juntos, os macrohaplogrupos M e N abrangem toda a variação haplotípica observada no resto do mundo (Fernandes et al., 2012). Períodos de isolamento geográfico e endogamia, entre outros fatores, como o clima e fatores históricos, têm contribuído para os padrões de variação genética humana vista no mundo hoje (REGWG, 2005). É conhecido que o desenvolvimento da agricultura e a adoção de distintas línguas por alguns grupos tiveram grande importância na diferenciação/separação dos macrohaplogrupos (Kemp et al., 2010).

África apresenta o quadro genético mais complexo de todos os continentes, pois apresenta uma distância genética de mais de 100.000 anos entre os macrohaplogrupos (Salas et al., 2002). Os macrohaplogrupos característicos de populações africanas foram designados L0 a L6 (Harich et al., 2010).

Os macrohaplogrupos conhecidos como originários na Europa foram resultados de várias ondas de migração humana durante o Paleolítico e sofreram grande influência da última glaciação, há aproximadamente 20.000 anos atrás, que proporcionou áreas de isolamento geográfico e refúgio (Richards et al., 2000; Achilli et al., 2004). É sugerido também que o advento da agricultura no continente europeu foi acompanhado por uma extensa onda de migração proveniente do Oriente Próximo, de modo que os macrohaplogrupos europeus modernos sofrem influência desses macrohaplogrupos orientais (Richards et al., 2000). Os macrohaplogrupos europeus são os que apresentam maior variabilidade e número, sendo os principais: H-K, T, U3-U5 e V-X (Richards et al., 1996; 2000).

Os nativos americanos têm sido classificados em cinco macrohaplogrupos de mtDNA, A, B, C, D e o mais raro X, todos de origem asiática (Tamm et al., 2007; Fagundes et al., 2008). Diversos grupos de pesquisa têm se dedicado ao estudo das migrações humanas e proposto modelos para povoamento das Américas. Inicialmente, foi sugerido que três ondas migratórias humanas povoaram o continente americano (Greenberg et al., 1986). Entretanto, outros estudos têm indicado uma única onda de migração (Bonatto e Salzano, 1997), ou múltiplas entradas de grupos populacionais (Peredo et al., 2009).

A sequência referência de Cambridge (CRS – *Cambridge Reference Sequence*) foi publicada inicialmente durante o projeto de sequenciamento do genoma humano em 1981 (Anderson et al., 1981) e é a sequência do mtDNA humano universal utilizada como referência para classificar os haplótipos e estabelecer as comparações entre indivíduos. Esta sequência foi revisada e corrigida por Andrews e colaboradores em 1999 (Andrews et al., 1999).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o cenário epidemiológico da tuberculose na população do Rio de Janeiro entre os séculos XVII e XIX através da análise paleogenética do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, bem como da análise do perfil paleoparasitológico e da ancestralidade humana das populações.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Recuperar e amplificar pela PCR aDNA humano para caracterizar o perfil haplotípico mitocondrial das populações em estudo do Rio de Janeiro no período histórico.
- Detectar através de técnicas moleculares a presença de bactérias do MTC em amostras provenientes de sítios históricos do Rio de Janeiro.
- Determinar o perfil paleoparasitológico e paleoparasitológico molecular das populações em estudo do Rio de Janeiro no período histórico.

### 3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

#### 3.1 *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil



Figura 3.1: Coleta paleogenética e processamento do material arqueológico na unidade de paleogenética, sítio Igreja Nossa senhora do Carmo, Rio de Janeiro, Brasil. Coleta paleogenética (A, B) realizada diretamente no sítio arqueológico, demonstrando o uso de EPIs e materiais descartáveis. Processamento do material ósseo realizado na unidade de paleogenética: raspagem da superfície do material ósseo (C) e extração de aDNA (D).

A Igreja Nossa Senhora do Carmo (INSC) está localizada no centro da cidade do Rio de Janeiro, na antiga Rua Direita (atual Rua Primeiro de Março). Sua história começa antes de 1600, com a construção de uma capela para a instalação da Ordem dos Carmelitas. Em 1808, com a chegada da família Real Portuguesa ao Brasil, a INSC foi nomeada capela Real. Posteriormente, foi nomeada catedral da cidade, título que permaneceu até 1976. Durante as obras de para comemoração dos 200 anos da chegada da família Real Portuguesa ao Brasil, enterramentos humanos foram descobertos datados dos séculos XVII a XIX. Desta maneira um salvamento arqueológico foi realizado pelo Instituto de Arqueologia Brasileira (IAB). Artefatos característicos da religião católica e da cultura africana foram descobertos associados ou não aos enterramentos. Para este estudo foi realizada a coleta paleogenética, na qual são utilizados Equipamentos de Proteção Individual (EPI) por todos os manipuladores, tanto arqueólogos quanto paleogeneticistas, e materiais estéreis e descartáveis. Ainda o material recém coletado é protegido da luz e mantido a baixas temperatura até a chegada ao laboratório. Essas medidas são aplicadas com o objetivo de evitar a contaminação com DNA moderno (mDNA) e a degradação do aDNA. Para este estudo foram analisados 28 enterramentos (22 enterramentos primários e 6 secundários). Foram coletadas amostras representativas de 32 indivíduos: ossos (29) e sedimentos (11), relacionadas ou não ao sítio da infecção. Além disso, foram coletadas amostras de sedimentos entre enterramentos (11) como controles negativos do ambiente. A análise de detecção de indivíduos positivos para tuberculose foi realizada através da técnica de Hibridação de aDNA total por quimioluminescência, com os alvos específicos para bactérias do MTC: IS6110 e IS1081. A análise da ancestralidade humana foi realizada através da PCR, utilizando a região hipervariável I do DNA mitocondrial humano. Os resultados revelaram que 23 amostras foram positivas para os alvos IS6110, representando 17 dos 32 indivíduos analisados. Esses resultados foram confirmados em 14 amostras, com o alvo IS1081. Dentre as amostras sítio específicas, observou-se um sucesso na detecção de MTC nas amostras de sedimento de pulmão. Os resultados de ancestralidade humana demonstraram que foi possível recuperar e identificar o haplogrupo de mtDNA em 23 dos 32 indivíduos analisados com 91,3% de haplogrupos europeus. Se considerarmos apenas enterramentos primários, 100% dos haplogrupos foram europeus, e em enterramentos secundários foram observados haplogrupos europeus, um indivíduo ameríndio e um africano. No estudo, foi demonstrada a infecção por bactérias do MTC em 53,1% dos indivíduos

analisados. Considerando os resultados da ancestralidade europeia dos indivíduos enterrados no sítio INSC, este trabalho está de acordo com evidências que demonstram uma epidemia de TB na Europa durante este período. Nosso trabalho demonstra a importante contribuição dos europeus na distribuição e manutenção da doença na cidade. E apesar de sabermos que existiu a TB na América pré – Colombiana, provavelmente causada por cepas endêmicas, pouco virulentas e dispersas entre os grupos populacionais, as cepas epidêmicas europeias foram devastadoras no que diz respeito à distribuição da TB no país. O Rio de Janeiro, assim como algumas cidades europeias, foi um grande centro comercial do país. O crescimento da cidade, assim como o crescimento populacional e da pobreza, não foi acompanhado por uma política de saúde pública, o que permitiu a maior transmissão da bactéria causadora da TB.



## *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil

Lauren Hubert Jaeger<sup>a</sup>, Daniela Leles<sup>a,b</sup>, Valdirene dos Santos Lima<sup>a,c</sup>, Laura da Piedade da Silva<sup>d</sup>, Ondemar Dias<sup>d</sup>, Alena Mayo Iñiguez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

<sup>b</sup> Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia dos Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

<sup>d</sup> Instituto de Arqueologia Brasileira, Belford Roxo 26193-415, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Available online 27 August 2011

#### Keywords:

Tuberculosis  
Ancient DNA  
Human mtDNA  
*Mycobacterium tuberculosis* complex  
Brazil

### ABSTRACT

Paleogenetic analysis for tuberculosis (TB) was conducted on bone and sediment samples dating from the 17th to 19th centuries from the archeological site of Nossa Senhora do Carmo Church in Rio de Janeiro, Brazil. Forty samples were analyzed, corresponding to 32 individuals from 28 burials, 22 of primary type and 6 of secondary type. The samples were collected following strict paleogenetic investigation guidelines and submitted to ancient DNA (aDNA) extraction. In order to detect TB infection, aDNA hybridizations with the molecular targets of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) IS6110 and IS1081 were applied. Additionally, the ancestry of individuals was assessed by human mitochondrial DNA (mtDNA) analysis of hypervariable segment I (HVS-I) sequence polymorphisms. The results of aDNA hybridizations demonstrated varying levels of MTC intensity in 17/32 individuals (53.1%), using the IS6110 target. The IS1081 MTC target showed lower sensitivity, confirming TB positivity in 10/32 (31.2%) individuals. The mtDNA analysis allowed the recovery of HVS-I sequences in 23/32 individuals (71.8%). The majority of these individuals (21/23, 91.3%) were of European ancestry, especially in primary burials. Haplogroups U, J, V, T, K, N, H and R, were identified with haplogroup U being the most frequent at 6/23 (26.1%). African and Amerindian mtDNA haplogroups were observed in two individuals in secondary burials. In spite of the ecclesiastic and aristocratic bias of the population of the study, human ancestry analysis revealed the prominent contribution of Europeans in the introduction or spread of TB in the New World.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

The mycobacterial disease tuberculosis (TB) has plagued humans, and probably our hominid ancestors, for millennia (Wilbur et al., 2008). The epidemiological history of mycobacterial infection has been supported by reports of ancient *Mycobacterium tuberculosis* (Donoghue et al., 2004). In spite of this, some issues remain obscure or have generated debate. Investigations of ancient DNA (aDNA) have been helpful in answering important questions regarding the origin, evolution, and spread of tuberculosis. For many years, it was thought that human tuberculosis evolved from the bovine disease by adaptation of *Mycobacterium bovis* to the human host during domestication, 10,000–15,000 years ago. It is now known that members of the *M. tuberculosis* complex (MTC) evolved from a common ancestor that existed about 3 million years ago (Brosch et al., 2002), and that the bacillus suffered a major bottleneck approximately 15,000–20,000 years ago (Sreevatsan et al.,

1997). The recovery of *M. tuberculosis* aDNA from North American bison from the Pleistocene (17,500 years ago) and from Egyptian and South American human mummies have provided strong validation.

Historical evidence supports the epidemic character of TB in Europe from the 16th to the early 20th centuries (Daniel, 2000; Fletcher et al., 2003). Pulmonary tuberculosis is indicated as a major cause of death in Europe during the 18–19th centuries (Cole, 2002). Paleogenetic studies have shown the presence of MTC and *M. tuberculosis* aDNA in European populations. It is recognized that TB existed in America before the arrival of European settlers. Several studies have verified paleopathological evidence on human bones indicative of TB as well as the detection of MTC aDNA, in human remains (Buikstra and Cook, 1981; Gomez i Prat and de Souza, 2003; Salo et al., 1994). In South America, pulmonary and osteological TB have been assessed by MTC aDNA, paleopathology, and multidetector computed tomography (MDCT) analysis, mainly in pre-Columbian populations of Peru and Chile, with single records in Venezuela and Colombia (Allison et al., 1973; Arriaza et al., 1995; Klaus et al., 2010; Requena, 1945; Sotomayor et al., 2004;

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 38658168; fax: +55 21 22604282.

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

Spigelman and Lemma, 1993). These studies suggest that MTC was introduced by the first human migrations during the peopling of America, remaining at low endemic levels. An epidemic pattern was only reached in urban centers or when biocultural or/and social disruption took place (Gomez i Prat and de Souza, 2003). It has also been suggested that non-tuberculosis *Mycobacterium* species caused infection during this period, and that Europeans introduced new strains of MTC into the Americas. Whether TB emerged or was introduced into New World, the reality is that, clearly, TB became more widespread and potent after the arrival of Europeans, and a large number of cases and death among native Americans was related to intensification of contact with Europeans. There is currently no aDNA record of TB existence in prehistoric or even in historic times in Brazil. More likely than reflecting a lack of infection, this can be attributed to the climatic conditions of the country, which are not favorable to preservation, and therefore, there is a scarcity of mummies or well preserved skeletal remains.

Nossa Senhora do Carmo Church (1761) in Rio de Janeiro was the chapel of the Portuguese royal family during the Empire Colonial period and the Cathedral of the city until 1976. In 2007, during an architectural restoration, archeological excavation of the church identified numerous burials dating from the 17th to 19th centuries. Human remains were collected following paleogenetic investigation guidelines on the archeological site to avoid aDNA degradation and contamination by modern DNA of the skeletal series. The material provided an excellent opportunity to research the ancestral patterns of the human population and the presence of pathogens of parasitic and infectious diseases during the Brazilian historical period since the beginning of Portuguese colonization at the end of the Brazilian Empire. In the present study, we conducted genetic analysis of human remains from Nossa Senhora do Carmo Church in order to (i) detect the presence of TB infection by MTC aDNA analysis; (ii) examine human ancestry of the population buried at the archeological site through mitochondrial DNA (mtDNA) analysis; and (iii) generate new data on the epidemiology of tuberculosis in South America during early European contact.

## 2. Materials and methods

### 2.1. The archeological site Nossa Senhora do Carmo Church

The history of the Nossa Senhora do Carmo Church or Antiga Sé (1761) began with the construction of a chapel for the installation of the Carmelite order during the first years following the founding of the city of Rio de Janeiro, before the year 1600. After the collapse of the chapel during a celebration day, the church was rebuilt and officially inaugurated in 1761. In 1808, after the arrival of the Portuguese Royal Family in Brazil, the church was designated as the Royal Chapel. In the same year, the church was named the Cathedral of Rio de Janeiro and remained so until 1976. In 2007, as part of the commemoration of 200th anniversary of the arrival of the Portuguese Royal Family to Brazil, an architectural and artistic restoration was undertaken, and numerous burial sites were discovered under the floor of the church.

The archeological excavation of the Church Nossa Senhora do Carmo was conducted by the Institute of Brazilian Archaeology (Instituto de Arqueologia Brasileira – IAB) from January, 2007 through March, 2008. Twelve areas were excavated and three types of archeological structures were restored: combustion structures, occupied structures, and ceremonial structures (Dias, 2008). Combustion structures were identified as a fire, together with bones, tools, and Neo-Brazilian pottery, located in the more ancient level of the site, suggestive of a prehistoric period pre-dating to the chapel construction (Dias, 2008). Ceremonial structures were identified when artifacts of Catholic rituals were found in the ex-

humed burials, near or related to the body. Three structures of occupation, the Vermelha Chapel, the Nossa Senhora do Carmo Church complex, and the Senhor dos Passos Chapel were identified. Afro-Brazilian artifacts were found associated with Vermelha Chapel. Forty-three human burials and ossuaries were identified dating from 17th to 19th centuries. The bio-anthropological analysis was conducted according to Buikstra and Ubelaker (1994). Data on gender and age at time of the death were estimated by morphological and morphometric characteristics of the skeletal remains. Samples from 28 burials were analyzed in this study, 22 were classified as primary type and 6 as secondary type. A primary type was defined as the first placement of a totally or almost totally articulated body. Secondary burial is when the remains of a primary burial are exhumed, altered, or moved to an ossuary or other place, and therefore the burial is presented in two or more stages (Souza, 1997). Most primary burials were simple, with only one individual, with 4 being collective, containing more than one individual. Most subjects were young adults, under 30 years old (78%), and there were an equal number of men and women ( $n = 8$ ) (Table 1). The archeological remains selected for TB research comprised a series of bones, teeth, and sediment-samples related to organs usually affected by pulmonary and osseous TB (Table 1). Sediment-samples were fragmented tissue contained in the surrounding matrix, collected *in situ* in the area where the organ would have been located. Pathological evidence of TB, as osseous lesions, was not observed on the rib or vertebrae samples.

### 2.2. Precautions to avoid contamination

Measures were taken to avoid aDNA degradation, contamination from modern DNA, and cross-contamination during the collection procedures in the archeological excavation and the aDNA analysis, including use of protective clothing, gloves, head covering, masks, and sterile instruments and equipment (Cooper and Poinar, 2000; Drancourt and Raoult, 2005). The excavated samples were immediately placed in sterile containers at 4 °C, protected from light and humidity, and transported to the laboratory. The samples were maintained at –20 °C until the aDNA analysis in the Unit of Paleogenetics, an isolated environment, exclusively dedicated to aDNA research, physically distant from the major laboratory [Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms (LGMM), Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation (IOC/FIOCRUZ)]. The preparation of samples, aDNA extraction, and PCR were performed at the Unit of Paleogenetics. Electrophoresis, sequencing, and sequence analysis were conducted at the LGMM. *Mycobacteria* had not previously been introduced into either laboratory. All work surfaces and equipment were treated with sodium hypochlorite and exposed to UV irradiation. All reagents were separated in aliquots for single use. Cotton-filtered tips were always used in pre-PCR and PCR steps. To avoid cross-contamination, each sample was mechanically cleaned and crushed independently. Extraction blank controls were processed in parallel with samples (1 blank for each 6 samples). PCR negative controls, with no DNA template, were always included (1 blank for each 4 samples). The authenticity criteria include the absence of a detectable amplicon in the extraction blank and PCR negative controls; PCR positive controls were not included. More than one target was performed for MTC detection, and host DNA was analyzed in parallel with the MTC DNA. In addition, environmental control samples were collected around and between the burial sites and analyzed to monitor possible MTC contamination of soil.

### 2.3. aDNA extraction

All bone and teeth samples were decontaminated of exogenous DNA by exposing the surface to UV light for 15 min on all sides, and

**Table 1**  
Samples analyzed from the archeological site, Nossa Senhora do Carmo Church, Rio de Janeiro, Brazil.

Burial	Burial type	No. of bodies	Age (years)	Gender	Sample type (sample name)
3	1 <sup>a</sup>	1	Adult (>30)	Undetermined	Lung sediment (3G), cervical vertebra (3H)
5	1 <sup>a</sup>	1	Adult	Male	Calcaneus (5A)
6	1 <sup>a</sup>	1	Adult (>20)	Female	Metatarsus (6A)
7	1 <sup>a</sup>	1	Young (18–25)	Female	Lung sediment (7H)
8	1 <sup>oa</sup>	1	Adult	Undetermined	Vertebra (8C)
9	1 <sup>a</sup>	1	Adult	Male	Rib (9A), lung sediment (9B)
12	1 <sup>a</sup>	1	Adult	Undetermined	Rib (12E)
14	1 <sup>a</sup>	1	Adult	Undetermined	Ileum (14B)
15	1 <sup>a</sup>	1	Young (18–20)	Female	Rib (15B), lung and mouth sediment (15D)
17	1 <sup>oa</sup>	2	Adult (>30)	Undetermined	Lung sediment (17A), rib (17C)
			Adult (<25)	Undetermined	Rib (17I)
18	1 <sup>a</sup>	1	Young (18–20)	Female	Phalange (18D)
19	1 <sup>oa</sup>	1	Young	Undetermined	Rib (19A), lung sediment (19B)
20	1 <sup>a</sup>	1	Adult (25)	Female	Rib (20B)
22	1 <sup>a</sup>	1	Young (18–20)	Female	Rib (22F)
23	1 <sup>oa</sup>	1	Adult (<30)	Female	Metatarsus (23D)
25	1 <sup>a</sup>	1	Adult (<30)	Male	Rib (25D)
26	2 <sup>oa</sup>	1	Child (5–7)	Undetermined	Vertebra (26C)
28	1 <sup>a</sup>	1	Adult (<30)	Male	Phalange(28E)
29	1 <sup>a</sup>	1	Adult	Undetermined	Clavicle (29B)
30	1 <sup>a</sup>	1	Adult (<30)	Male	Metatarsus (30D)
31	2 <sup>oa</sup>	3	Undetermined	Undetermined	Skull (31c10)
			Undetermined	Undetermined	Skull (31c12)
			Undetermined	Undetermined	Skull (31c15)
32	1 <sup>a</sup>	1	Adult (<30)	Female	Mouth sediment (32A), lung sediment (32B)
33	1 <sup>a</sup>	1	Adult (>30)	Male	Metatarsus (33C)
34	1 <sup>a</sup>	1	Adult (<30)	Male	Lung sediment (34A), clavicle (34I)
36	2 <sup>oa</sup>	2	Adult (<30)	Male	Vertebra (36B)
			Child	Undetermined	Rib (36C)
38	2 <sup>a</sup>	1	Undetermined	Undetermined	Nose sediment (38A), mouth sediment (38B)
39	2 <sup>a</sup>	1	Undetermined	Undetermined	Parietal (39A)
41	2 <sup>a</sup>	1	Undetermined	Undetermined	Skull (41A)
Total: 28		32			40

<sup>a</sup> Collective burial.

subsequently the surfaces were removed (Iniguez et al., 2003). The bone and teeth samples were submitted to manual trituration using liquid nitrogen and approximately 200 mg of the resulting powder were used for aDNA extraction. The sediment-samples were rehydrated (1:2 w/v) with 0.5% aqueous trisodium phosphate solution for 48 h at 4 °C. Approximately 200 µL rehydrated sediment-samples were used for aDNA extraction. Samples were treated with 1.0 mL digestion buffer (NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, SDS 0.5%, EDTA 50 mM, pH 8.0) with 1 mg/mL of Proteinase K (Invitrogen) and incubated at 65 °C for 48–72 h. The bone and teeth solutions were then treated with IQ System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and the sediment-samples with the standard phenol:chloroform method. The aDNA extract was purified by a GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE HealthCare), and the concentrations were estimated at 260 nm absorbance on a spectrophotometer (NanoVue Plus – GE).

#### 2.4. MTC DNA hybridization analysis

A dot blot procedure was conducted as described elsewhere (Sambrook and Russel, 2001). A total of 40 aDNA samples extracted from human remains and 6 controls (including 5 positive and 1 negative) were applied to an 11 × 7.5 cm Hybond membrane (Amersham). Multiple samples from the same individual and samples from different individuals from the same burial were used. After air-drying, the membrane was subjected to UV light for 30 min. DNA probes of 93 and 113 bp, corresponding to the molecular targets IS6110 and IS1081, respectively (Taylor et al., 1996, 2005), were prepared by PCR and purified by a GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE HealthCare). Probes were labeled by chemiluminescence using Gene Images Alkphos Direct Labeling and Detection Systems (Amersham), according to the manufacturer's instructions.

The membranes were incubated overnight at 60 °C. Development was performed with Kodak reagents following the manufacturer's instructions. A dot blot membrane containing the DNA from environmental control samples of burials was performed following the same procedure described above. DNA from four MTC type strains were used as hybridization positive controls for IS6110 and IS1081 probes: *M. tuberculosis* T92 (ATCC27294<sup>T</sup>), *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294<sup>T</sup>), *M. bovis* BCG (ATCC19210<sup>T</sup>) and *Mycobacterium africanum* T85 (ATCC25420<sup>T</sup>). The DNA extraction of the MTC type strains was performed in the Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacterium (LBMAM/IOC/FIOCRUZ), an independent laboratory located in a building geographically distant from the Unit of Paleogenetics and LGMM laboratories. Human DNA used as a hybridization negative control to MTC probes was obtained from the human DNA collection of the LGMM laboratory.

#### 2.5. Human mtDNA amplification and sequencing

The attempt to amplify fragments of hypervariable segment I (HVS-I) of the human mtDNA was performed using two sets of primers: L16209 (5'-CCATGCTTACAAGCAAGT-3') and H16356 (5'-GTCATCCATGGGACGAGAA-3') (Handt et al., 1996) and L16070 (5'-ACCCATCAACAACCGCTATG-3') and H16259 (5'-GTGGCTTTGGAGTTGCAGTT-3') (designed in this study), with 147 base pair (bp) and 189 bp, respectively. PCR amplification was carried out in 50 µL volumes containing 1× PCR buffer, 2 mM of MgCl<sub>2</sub>, 1 mM of dNTPs, 2.0 units of Platinum Taq (Invitrogen), 100 ng each primer and 5 µL of DNA or 30 ng. Cycling conditions were: an initial denaturation step at 94 °C for 3 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s; followed by a final extension step at 72 °C for 5 min. Extraction blank controls and PCR negative controls were included, but positive PCR controls

were not included. PCR products were visualized by 3% agarose gel electrophoresis (Specially Purified Agarose NA, GE HealthCare) stained with ethidium bromide. The Reconstructive Polymerization method was performed before PCR amplification, as described by Golemberg et al. (1996). The sequencing reaction was performed using an ABI BigDye Terminator kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol, with analysis in both directions, on an ABI 3730 (Applied Biosystems) automated sequencer. Bio Edit v 7.0.4 (Department of Microbiology, North Carolina State University, USA) and Lasergene Seqman v. 7.0.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA) were used for editing and sequence analysis. The human mtDNA sequences were compared to mtDNA from the GenBank database and from laboratory staff.

### 3. Results

#### 3.1. Preservation of samples

In general, the human remains from the archeological site were found in a poor state of preservation and were extremely fragmented. In addition, since the Nossa Senhora do Carmo Church is located near the coast, some burials were affected by tidal saltwater intrusion. This was apparent at the archeological site during the process of anthropological investigation and paleogenetic collecting. The human remains observed consisted only of bone and teeth samples from incomplete and partial skeletons and ossuaries (Table 1). In some individuals in primary burials it was possible to observe the characteristic Christian burial, with the feet pointed toward the altar.

#### 3.2. Archeological context

Given the fact that the archeological site was located in a church, many articles related to Catholicism were expected to be

found (Dias, 2008). However, not many artifacts of this type were recovered. Fragments of crucifixes and gold ornaments were recovered (Fig. 1A). In particular a fragment of a metal crucifix was discovered with the body of burial 22 (Fig. 1B). Interestingly, evidence of non-Catholic religions, such as elements of African culture used by African-Brazilian cults, was also found, not directly associated with a specific burial, but arranged in an area that lay outside the original chapel (Fig. 1C and D).

#### 3.3. Tuberculosis hybridization

*M. tuberculosis* complex aDNA was detected in human remains samples from the archeological site. The results showed varying intensities of hybridization, classified as strong, moderate, or weak. Twenty-three samples corresponding to 17/32 individuals (53.1%) showed positive results with the IS6110 target (Fig. 2A and B). Five samples showed strong intensity, four had moderate intensity, and 14 exhibited weak intensity. Seventeen samples produced negative results. The aDNA hybridization with the IS1081 target showed 14 positive samples, corresponding to 10/32 individuals (31.2%) (Fig. 2C). Two samples had moderate intensity, 12 had weak intensity, and 26 showed negative results. Of the 10 rib samples analyzed, 7 showed positive results with IS6110 and 3 with IS1081. Four vertebra samples were analyzed with only one being positive for the IS6110 target. All sediment-samples exhibited positive results with the IS6110 target, and only one showed a negative result with the IS1081 target.

Multiple samples from a single individual were examined from burials 3, 9, 15, 17, 19, 32, 34, and 38 (Table 1). For four of the eight burials MTC positivity was confirmed in more than one sample. In burials 9 and 17, the MTC signals from rib samples were confirmed on lung sediments. MTC positive results were corroborated by sediment collected from two organ sites of the same individual in burials 32 and 38. In 4/8 burials the MTC aDNA hybridization

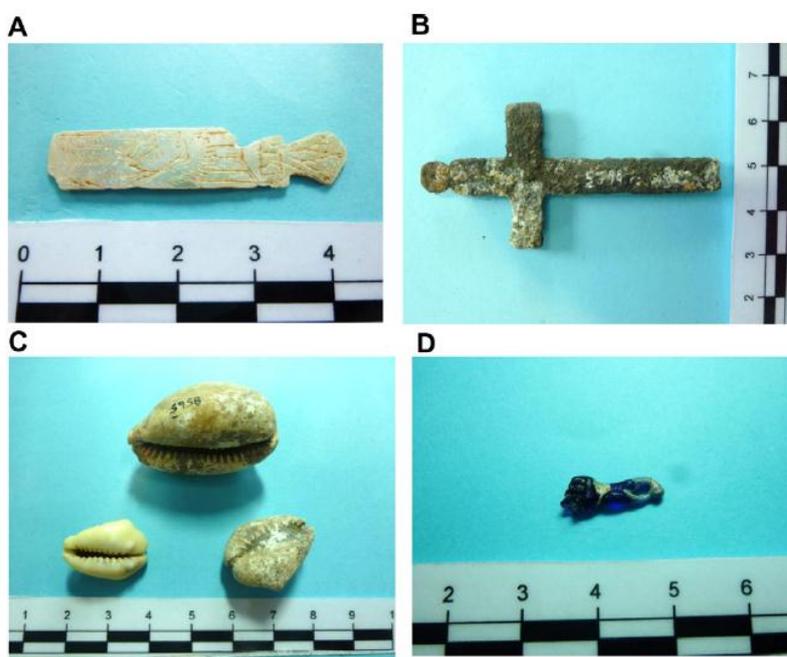
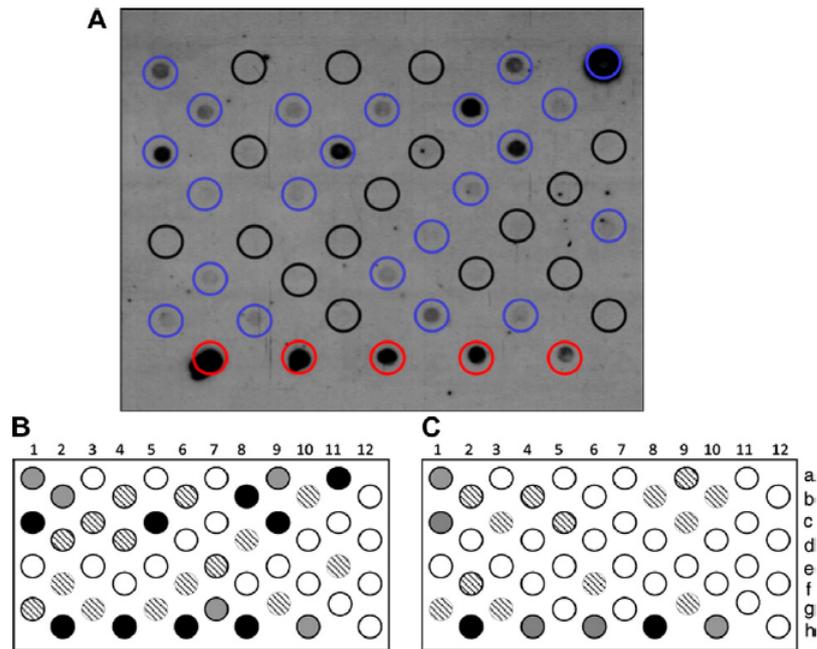


Fig. 1. Cultural artifacts found on the archeological site of the Nossa Senhora do Carmo Church, Rio de Janeiro, Brazil. IAB collection. Scale bars = 1.0 cm. Photographed by A.M. Iniguez. A: A fragment of a crucifix on mother of pearl; B: A crucifix on metal; C: Snails named African "buzios" commonly used in Afro-Brazilian cults; D: A Afro-Brazilian amulet on blue glass named "figa". (For interpretation of the references in color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Fig. 2.** Results and schematic representation of aDNA hybridization with MTC probes for TB detection. **A:** Results of aDNA hybridization using MTC IS6110 target. Blue circles are positive samples; Black circles are negative samples; Red circles are MTC positive controls; Green circles are negative control. **B:** Schematic representation of hybridization results for IS6110 target; **C:** for IS1081 target. a1: 3G; a3: 3H; a5: 5A; a7: 6A; a9: 7H; a11: 8C; b2: 9A; b4: 9B; b6: 12E; b8: 14B; b10: 15D; b12: 15B; c1: 17A; c3: 17C; c5: 17I; c7: 18D; c9: 19B; c11: 19A; d2: 20B; d4: 22F; d6: 23D; d8: 25D; d10: 26C; d12: 28E; e1: 29B; e3: 30D; e5: 31c10; e7: 31c12; e9: 31c15; e11: 32B; f2: 32A; f4: 33C; f6: 34A; f8: 34I; f10: 36B; f12: 36C; g1: 38A; g3: 38B; g5: 39A; g7: 41A; h2: *M. tuberculosis* T92 positive control; h4: *M. bovis* BCG positive control; h6: *M. africanum* T85 positive control; h8: *M. tuberculosis* H37Rv positive control; h10: pool DNAs positive controls; h12: human DNA negative control. Colorless/white circles: negative results; full black circle: strong positive; gray circle: intermediate positive; dashed circle: weak positive intensity. (For interpretation of the references in color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

intensity was observed in lung sediment, but not confirmed in bone samples.

In burial 17, where two bodies were found, the analysis of a rib from each body, and a lung sediment-sample from one of the individuals, yielded positive signals for both targets. In burial 36, vertebra and rib samples from two individuals were analyzed, but no MTC signal was observed. Almost all individuals positive for MTC hybridization were from primary burials, 14/17 (82.3%). Only 31c12, 38, and 41 were from secondary type burials.

All positive controls had the expected positive result, with intensities varying according to the target used. The human DNA negative control showed no hybridization to either molecular MTC target. The membrane with environmental samples showed no signal of DNA hybridization for either target.

### 3.4. Human mtDNA analysis

The analysis of human mtDNA showed that it was possible to retrieve the HVS-I target and determined the mtDNA haplotype in 20/28 burials corresponding to 23/32 individuals (71.8%). Results showed a high diversity of mtDNA haplotypes with the majority of European ancestry, 21/23 (91.3%) (Table 2). The haplogroup U was the most frequent with 26.1%. All individuals found in primary burials belonged to European haplogroups U, J, V, H, T, K, N, and R. The analysis of mtDNA samples from the secondary burials showed the European haplogroups U, T, K, N, and H. In both types of burials, the European haplogroup U was the most frequent, with 4/15 (26.7%) and 2/8 (25.0%) in primary and secondary burials, respectively. Interestingly, in secondary burials single re-

**Table 2**

Results of MTC and mtDNA haplogroup analysis from aDNA the archeological site, Nossa Senhora do Carmo Church, Rio de Janeiro, Brazil.

Burial	Burial type	Hybridization results		mtDNA haplotypes
		IS6110	IS1081	
3	1°	+	+	U22
8	1 <sup>sa</sup>	+	–	J1b
9	1°	+	–	T2a
12	1°	+	–	V
14	1°	+	+	K1a
17	1 <sup>sa</sup>	+	+	T1-T5
18	1°	–	–	U1b
19	1 <sup>sa</sup>	+	+	N1b1
20	1°	+	–	H
22	1°	+	–	U5
23	1 <sup>sa</sup>	–	–	U1b
25	1°	+	–	N
28	1°	–	–	U5
29	1°	–	–	R1
30	1°	–	–	N1b1
31	2 <sup>sa</sup>	–	–	T1-T5
		+	–	H
		–	–	U1b
34	1°	+	+	V
36	2 <sup>sa</sup>	–	–	C
		–	–	L
38	2°	+	+	H
41	2°	+	–	K1a

<sup>a</sup> Collective burial.

cords of the Amerindian haplogroup C and the African haplogroup L were found (Table 2).

#### 4. Discussion

This study demonstrated the presence of infection by mycobacteria from MTC in individuals dating from the 17th to 19th centuries buried at the archeological site of Nossa Senhora do Carmo Church, Rio de Janeiro, Brazil. This site presented an unprecedented opportunity to study the population and infectious disease in Brazil for this time period. Moreover, because the Antiga Sé church was founded on an old chapel, prehistoric material was also observed (Dias, 2008). However, the bioanthropological material found consisted only of extremely fragmented human skeletal material. The normal climate of Rio de Janeiro is characterized by high temperatures and humidity and may have interfered with the preservation of the remains. Additionally, the numerous episodes of rebuilding of the church could have altered the original burial disposition and hampered preservation. It is known that climatic conditions such as low temperatures and high altitudes facilitate the preservation of nucleic acid in ancient samples. Despite the poor preservation of the samples, it was possible to detect the presence of mycobacteria through MTC and to determine the human ancestry of individuals.

From the outset of the research, measures were taken to improve aDNA detection and to avoid or control modern DNA contamination. The human remains were collected following paleogenetic investigation guidelines on the archeological site, and the aDNA procedures were performed at the Unit of Paleogenetics in an isolated environment exclusively dedicated to aDNA research. The laboratories had not been previously exposed to mycobacteria, and human mtDNA haplotypes from archeologists and laboratory staff were identified. The application of the DNA hybridization technique, which is more sensitive than PCR and is not subject to PCR product contamination, reinforced the credibility of results. Moreover, the high diversity of human mtDNA haplotypes observed in the buried population and the differences in the intensity of MTC hybridization signals confirmed the validity of results.

Immigration contributed to the formation of the Latino American populations. Brazilians are one of the most heterogeneous populations in the world, the product of a genetic admixture of three ancestral groups: native Amerindians, European colonizers, and African slaves. It is estimated that approximately 500,000 Portuguese people migrated to Brazil during the colonial period. Alves-Silva et al. (2000) reported that the human DNA pool of contemporary Brazilians clearly reflects the imprints of early Portuguese colonization as well as the immigrant waves from Europe of the past century. The finding of European haplogroup individuals in the majority of burial sites and especially in primary burial sites is consistent with the historical and genetic evidence. The church traditionally received the bodies of individuals of the ecclesiastical class and Catholics of high social position, who could bear the costs of the burial ceremony (Pereira, 2007). In Europe, during the 16th century to the end of the 18th century, the dead were buried in the church foundation following the Catholic liturgy (Gijon Botella et al., 2010). In Brazil, the Catholic Church persisted with this practice. Moreover, the typical Christian burial position of some bodies and the cultural evidence of Catholicism found on the archeological site, such as crucifixes, sometimes associated with a specific burial, affirmed the Catholicism of individuals.

The finding of African and Amerindian haplogroups in secondary burials suggests the use of the site as a cemetery before the construction of the foundation of the church (1761). This is an assumption based on the nonexistence of a cemetery in the city dating to that time and supposes the use of the area of the old chapel for this purpose. Evidence of Amerindian culture was not found, but diverse articles of the African-Brazilian culture of a religious character were recovered. In addition, the location of

the African-Brazilian artifacts, corresponding to areas originally external to the chapel, corroborates our statements.

The detection of tuberculosis infection was possible through the application of the DNA hybridization technique. In our experience, this technique is superior in paleogenetic analysis and has advantages over PCR technique, especially working with poorly preserved samples: (i) the technique is highly sensitive to detect the molecular probe, which is an excellent tool for the extremely fragmented condition of aDNA; (ii) the technique is not subject to the action of potential inhibitors of the enzymatic reaction that is common in archeological samples; and (iii) the hybridized membrane can be used many times with different targets, allowing optimization of the analysis of the original samples. Of the two targets utilized, IS6110 was more sensitive in detection of MTC in the samples. It is known that multicopy genes and repeated sequences make satisfactory targets for aDNA studies. The largest number of positives to the target IS6110 can be explained by the number of copies present in the genome of MTC bacteria. The IS6110 element may vary from 1 to 25 copies, depending on the species, and the IS1081 element has up to 6 copies (Collins and Stephens, 1991; McEvoy et al., 2007). The use of environmental control samples in parallel with the human remains samples is one of the aDNA criteria defined by Drancourt and Raoult (2005). In our study, we analyzed seven environmental control samples of burial sites and all were negative for MTC aDNA hybridization.

The remains found in the Nossa Senhora do Carmo Church were mainly of adults less than 30 years old. All lung sediment samples and 7/10 rib samples showed positive results for TB infection. These results suggest an acute and active pulmonary disease rather than chronic or miliary disease. No bone changes were observed; probably the majority of individuals died before lesions had time to form or did not develop bone lesions. Mays et al. (2001) revealed that skeletal TB occurs only in a minority of instances, based on data from the pre-antibiotic era that indicates about 5–7% of cases showing bone changes (Steinbock, 1976). Our results demonstrated that sediment samples can be an important source of pathogenic bacterial aDNA detection and should be considered at the time of collection of material.

The high frequency of TB infection detected in Nossa Senhora do Carmo Church site, suggests that TB was highly prevalent in Rio de Janeiro during the colonial period. When considering primary burials of Europeans, the positivity for tuberculosis was even higher. These data are in accord with historical estimates suggesting that, in 1855, the mortality from tuberculosis in Brazil was 1/150 inhabitants (Campos and Pianta, 2001), with lethality estimated at 50% death rate of individuals affected by TB (Hijjar et al., 2007). In 2003, Fletcher and colleagues detected *M. tuberculosis* DNA in over 50% of ribs from an eighteenth century Hungarian population, yet less than 5% showed pathological changes (Fletcher et al., 2003). In the present study, only individuals of European ancestry were positive for MTC in secondary burials, while African and Amerindian individuals were negative. This indicated that European settlers probably introduced, or at least were responsible for the spread of, TB in the country. Tuberculosis was widespread in Europe, accounting for one in four deaths from the 16th to the 18th centuries (Spigelman and Donoghue, 2003). It reached epidemic proportions in crowded villages and cities with poor sanitation, peaking during the industrial revolution (Stearns and Koella, 2008). In Brazil, TB also followed the social and economic development of big cities. Rio de Janeiro city was the capital of Brazil from 1763 to 1960. In the 18th century it became the main commercial center of the country and as a consequence underwent massive urbanization (Fragoso and Florentino, 2001). Only in 1899, were nongovernmental organizations created to control the spread of the disease in the city (Goncalves, 2000; Hijjar et al., 2007).

The study of human remains from the historical period in South American countries can provide fundamental information concerning the origin and spread of TB in the New World. This paleogenetic study demonstrating the presence of TB in the city of Rio de Janeiro since the 17th century, is the first conducted with archeological samples from Brazil. In spite of the ecclesiastical and aristocratic bias in the population of this study, human ancestry analysis revealed the prominent contribution of European people in the introduction or spread of TB in the city. The evidence presented in this work, with high frequency of TB in people of European origin, confirms the historical observations that the European settlers were important carriers of pathogens to the New World. Future studies to detect MTC in pre-Colombian populations, as well as to characterize and compare the MTC species and *M. tuberculosis* strains from historical populations, should be conducted in order to establish the paleoepidemiology and historical epidemic of TB in the New World.

#### Acknowledgements

We thank the Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria of IOC/FIOCRUZ for DNA samples of MTC used for positive control of assays and PDTIS/FIOCRUZ genomic platform for technical assistance. Project support was provided by LGMM/IOC/FIOCRUZ, by grant from FAPERJ (E-26/110.189/2008 and E-26/111.637/2010) and CNPq fellowships.

#### References

- Allison, M.J., Mendoza, D., Pezzia, A., 1973. Documentation of a case of tuberculosis in Pre-Columbian America. *Am. Rev. Respir. Dis.* 107, 985–991.
- Alves-Silva, J., da Silva Santos, M., Guimarães, P.E., Ferreira, A.C., Bandelt, H.J., Pena, S.D., Prado, V.F., 2000. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 444–461.
- Arriaza, B.T., Salo, W., Aufderheide, A.C., Holcomb, T.A., 1995. Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am. J. Phys. Anthropol.* 98, 37–45.
- Brosch, R., Gordon, S.V., Marmiesse, M., Brodin, P., Bucgrieses, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K., Parsons, L.M., Pym, A.S., Samper, S., van Soolonger, D., Cole, S.T., 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS* 99, 3684–3689.
- Buikstra, J., Cook, D.C., 1981. Pre-Colombian tuberculosis in West-Central Illinois: prehistoric disease in biocultural perspective. *Prehistoric Tuberculosis in the Americas*. Northwestern University Archaeological Program, pp. 115–139.
- Buikstra, J.E., Ubelaker, D.H., 1994. Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains. *Arkansas Archeological Series*, Fayetteville.
- Campos, R., Pianta, C., 2001. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. *Bol. Saude* 15, 61–71.
- Cole, S.T., 2002. Comparative mycobacterial genomics as a tool for drug target and antigen discovery. *Eur. Respir. J. Suppl.* 36, 78s–86s.
- Collins, D.M., Stephens, D.M., 1991. Identification of an insertion sequence, IS1081, in *Mycobacterium bovis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 67, 11–15.
- Cooper, A., Poinar, H.N., 2000. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289, 1139.
- Daniel, T.M., 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4, 395–400.
- Dias, O., 2008. *Arqueologia, Igreja de Nossa Senhora do Carmo da Antiga Sé: História e Restauração*. Editora Nacional, Rio de Janeiro.
- Donoghue, H.D., Spigelman, M., Greenblatt, C.L., Lev-Maor, G., Bar-Gal, G.K., Matheson, C., Vernon, K., Nerlich, A.G., Zink, A.R., 2004. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet. Infect. Dis.* 4, 584–592.
- Drancourt, M., Raoult, D., 2005. Palaeomicrobiology: current issues and perspectives. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 23–35.
- Fletcher, H.A., Donoghue, H.D., Taylor, G.M., van der Zanden, A.G., Spigelman, M., 2003. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from a family of 18th century Hungarians. *Microbiology* 149, 143–151.
- Fragoso, J., Florentino, M., 2001. *O arcaísmo como projeto: Mercado atlântico, sociedade agrária e elite mercantil em uma economia colonial tardia*, 4 ed. Civilização Brasileira, Rio de Janeiro.
- Gijon Botella, H., Afonso Vargas, J.A., Arnay de la Rosa, M., Leles, D., Gonzalez Reimers, E., Vicente, A.C., Iniguez, A.M., 2010. Paleoparasitologic, paleogenetic and paleobotanic analysis of XVIII century coprolites from the church La Concepcion in Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands, Spain. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 1054–1056.
- Golemberg, E.M., Bickel, A., EWeis, P., 1996. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res.* 24, 5026–5033.
- Gomez i Prat, J., de Souza, S.M., 2003. Prehistoric tuberculosis in America: adding comments to a literature review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1), 151–159.
- Goncalves, H., 2000. Tuberculosis throughout the times. *Hist. Cienc. Saude Manguinhos* 7, 305–327.
- Handt, O., Krings, M., Ward, R.H., Paabo, S., 1996. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am. J. Hum. Genet.* 59, 368–376.
- Hijjar, M.A., Gerhardt, G., Teixeira, G.M., Procópio, M.J., 2007. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. *Rev. Saude Publica* 41, 50–58.
- Iniguez, A.M., Araujo, A., Ferreira, L.F., Vicente, A.C., 2003. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1), 63–65.
- Klaus, H.D., Wilbur, A.K., Temple, D.H., Buikstra, J.E., Stone, A.C., Fernandez, M., Wester, C., Tam, M.E., 2010. Tuberculosis on the north of Peru: skeletal and paleopathology of late pre-Hispanic and postcontact mycobacterial disease. *J. Archaeol. Sci.* 37, 2587–2597.
- Mays, S., Taylor, G.M., Legge, A.J., Young, D.B., Turner-Walker, G., 2001. Paleopathological and biomolecular study of tuberculosis in a medieval skeletal collection from England. *Am. J. Phys. Anthropol.* 114, 298–311.
- McEvoy, C.R., Falmer, A.A., Gey van Pittius, N.C., Victor, T.C., van Helden, P.D., Warren, R.M., 2007. The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 87, 393–404.
- Pereira, J.C.M.S., 2007. *À flor da terra: o cemitério dos pretos novos no Rio de Janeiro*. Garamond, Rio de Janeiro.
- Requena, A., 1945. Evidencia de tuberculosis en la América Precolombiana. *Acta Venezolana* 1, 141–164.
- Salo, W.L., Aufderheide, A.C., Buikstra, J., Holcomb, T.A., 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2091–2094.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Sotomayor, H., Burgos, J., Arango, M., 2004. Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a Colombian prehispanic mummy. *Biomedica* 24 (Suppl. 1), 18–26.
- Souza, A.M., 1997. *Dicionário de Arqueologia*. ADESA, Rio de Janeiro.
- Spigelman, M., Donoghue, H., 2003. Paleobacteriology with special referenceto pathogenic mycobacteria, *Emerging Pathogens Archaeology, Ecology & Evolution of Infectious Disease*, 1st ed. Oxford University Press, New York.
- Spigelman, M., Lemma, E., 1993. The use of the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *Int. J. Osteoarchaeol.* 3, 137–143.
- Sreevatsan, S., Pan, X., Stokbauer, K.E., Connell, N.D., Kreiswirth, B.N., Wittam, T.S., Musser, J.M., 1997. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9869–9874.
- Stearns, S.C., Koella, J.C., 2008. *Cows, Mycobacteria and Tuberculosis, Evolution in Health and Disease*, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.
- Steinbock, R.T., 1976. *Paleopathological diagnosis and interpretation*. Springfield.
- Taylor, G.M., Crosse, M., Saldanha, J., Waldron, T., 1996. DNA from *Mycobacterium tuberculosis* identified in medieval human skeletal remains using polymerase chain reaction. *J. Archaeol. Sci.* 23, 789–798.
- Taylor, G.M., Young, D.B., Mays, S.A., 2005. Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *J. Clin. Microbiol.* 43, 2236–2240.
- Wilbur, A.K., Farnbach, A.W., Knudson, K.J., Buikstra, J.E., 2008. Diet, tuberculosis, and the paleopathological record. *Curr. Anthropol.* 49, 963–977.

### 3.2 *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Remains of 18th–19th Century Slaves, Brazil



Figura 3.2: Artefatos arqueológicos e amostra óssea encontrados no sítio arqueológico Cemitério dos Pretos Novos, Rio de Janeiro, Brasil. Artefatos arqueológicos característicos da cultura africana: cachimbos (A, B e C) e miçangas (D); e o processamento e limpeza de material ósseo (E). Escala: 1 cm. Os artefatos arqueológicos fazem parte da coleção do IAB.

No final do século XVIII, com o início das políticas higienistas na cidade do Rio de Janeiro, o Marquês de Lavradio ordenou a transferência do porto de desembarque dos escravos da região do Paço para o Valongo. Assim, um cemitério foi criado, o chamado Cemitério dos Pretos Novos (CPN) (1769-1830). Neste cemitério eram enterrados corpos de escravos africanos que chegavam mortos nos navios negreiros ou que morriam em seguida que chegavam à cidade, durante o período em que estavam nos mercados de escravos. Esses corpos eram dispostos sem respeitar os ritos funerários, e por vezes, eram submetidos à cremação. O cemitério foi fechado em 1830, e com o crescimento da malha urbana na região este cemitério foi perdido. Em 1996, durante obras em uma casa na região da Gamboa,

enterramentos humanos foram descobertos datados dos séculos XVIII-XIX. Estudos bioantropológicos realizados nas ossadas destes indivíduos revelaram a presença de modificações dentárias intencionais características da cultura africana. Além disso, artefatos da cultura africana, como cachimbos e miçangas foram encontrados. O salvamento arqueológico realizado pelo IAB caracterizou os enterramentos como secundários. Análises bioantropológicas confirmaram a utilização da cremação dos corpos *peri - mortem*. Foram analisados ossos (fêmur direito) de 16 indivíduos. A análise de detecção de indivíduos positivos para tuberculose foi realizada através da técnica de Hibridação de aDNA total por quimioluminescência, com os alvos específicos para bactérias do MTC: IS6110 e IS1081. A análise da ancestralidade humana foi realizada através da PCR, utilizando a região hipervariável I do DNA mitocondrial humano. Os resultados da ancestralidade humana revelaram que foi possível identificar três haplótipos africanos nos indivíduos analisados. Os haplogrupos identificados estão presentes na população atual da África Central e Ocidental. Os três haplogrupos já foram descritos na atual população brasileira, e os haplogrupos L3d e L1c são o primeiro e terceiro mais comumente encontrados, respectivamente. Uma análise mais refinada demonstrou que os haplótipos L3d1 e L3e2 já foram descritos na atual população brasileira afrodescendente, entretanto, o haplótipo L1c2 nunca foi descrito nesta população, apenas na população atual da Angola. Este trabalho confirma a ancestralidade africana dos indivíduos e corrobora com dados históricos que demonstram que a principal fonte de escravos africanos trazidos para o Brasil são os países da África Central e Ocidental. As análises da TB revelaram a presença de infecção por bactérias do MTC em 4 dos 16 indivíduos analisados (25%) com o alvo IS6110. Esses resultados foram confirmados em 3 indivíduos (18%) com o alvo IS1081. Considerando os resultados da ancestralidade humana determinada neste estudo e os dados de estudos bioantropológicos anteriores, nós podemos afirmar que os indivíduos enterrados no CPN chegaram à cidade do Rio de Janeiro infectados por micobactérias do MTC. Existe a hipótese de que a África era “virgin soil” para a TB, entretanto este trabalho parece ser a prova mais contundente de que a África não era *naive* para esta infecção. Não se pode esquecer que a África é o berço das micobactérias. Além disso, é conhecido que os europeus estiveram presentes no continente desde o século XV. Se os indivíduos enterrados no CPN estavam infectados pelas cepas epidêmicas europeias ou pelas cepas endêmicas africanas não sabemos, o que podemos afirmar é que esses indivíduos trazidos como escravos da África trouxeram a TB com eles.

acids by PCR with a set of primers that amplify a 256-bp region of the gene encoding the 17-kDa antigen (6). To obtain information about *Rickettsia* spp., we amplified regions of the genes *gltA* (7,8), *ompA* (7), and *ompB* (9). PCR products were purified by the Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, WI, USA), quantified, and sent for sequencing to Macrogen Inc. (Amsterdam, the Netherlands).

Obtained sequences were aligned and analyzed by using Bioedit software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) and ClustalW version 2.0.10 (www.ebi.ac.uk/clustalw). DAMBE (http://dambe.bio.uottawa.ca/dambe.asp) and MEGA (www.megasoftware.net) software were used to obtain similarity percentages among analyzed sequences. To characterize *Rickettsia* spp., we used nucleotide sequence identity to reference strains (10).

Convalescent-phase serum was positive for *R. conorii*; IgG titer was 64. Sequence analysis of purified PCR products obtained from the eschar identified the isolate as *R. massiliae*. With respect to the reference strain *R. massiliae*, pairwise nucleotide sequence identity was 99% for the *gltA* gene (GenBank accession no. JN043507), 99% for the *ompA* gene (accession no. JQ480842), and 97% for the *ompB* gene (accession no. AF123714). Phylogenetic analysis (online Technical Appendix, wwwnc.cdc.gov/EID/article/19/5/12-1169-Techapp1.pdf) also confirmed the identity of the *Rickettsia* species.

Considering the diagnosis of *R. massiliae* infection and the patient who had acute vision loss (5), this patient was called back for a fundus examination, which showed no changes. At the time of this visit, a small area of alopecia at the eschar site was observed (Figure). Unfortunately, the tick had been discarded and was not available for genus and species identification.

The presence of *R. massiliae* in Italy demonstrates that this *Rickettsia*

species can cause scalp eschar and neck lymphadenopathy. Further studies are needed to complete the list of microorganisms that can cause this condition and to understand if they can be associated with minor findings (e.g., alopecia, painful eschar, high fever).

**Antonio Cascio,  
Alessandra Torina,  
Mariella Valenzise,  
Valeria Blanda,  
Natalia Camarda,  
Sara Bombaci, Chiara Iaria,  
Filippo De Luca,  
and Malgorzata Wasniewska**

Author affiliations: University of Messina, Messina, Italy (A. Cascio, A. Torina, M. Valenzise, N. Camarda, S. Bombaci, F. De Luca, M. Wasniewska); Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italy (A. Torina, V. Blanda); and Azienda Ospedaliera Piemonte-Papardo, Messina (C. Iaria)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1905.121169>

#### References

1. Angelakis E, Pulcini C, Waton J, Imbert P, Socolovschi C, Edouard S, et al. Scalp eschar and neck lymphadenopathy caused by *Bartonella henselae* after tick bite. *Clin Infect Dis*. 2010;50:549–51. <http://dx.doi.org/10.1086/650172>
2. Parola P, Roveery C, Rolain JM, Brouqui P, Davoust B, Raoult D. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne rickettsioses. *Emerg Infect Dis*. 2009;15:1105–8. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1507.081449>
3. García-García JC, Portillo A, Nunez MJ, Santibanez S, Castro B, Oteo JA. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;82:691–2. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0662>
4. Vitale G, Mansuelo S, Rolain JM, Raoult D. *Rickettsia massiliae* human isolation. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:174–5. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1201.050850>
5. Parola P, Socolovschi C, Jeanjean L, Bitam I, Fournier PE, Sotto A, et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2:e338. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000338>
6. Tzianabos T, Anderson BE, McDade JE. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J Clin Microbiol*. 1989;27:2866–8.
7. Oteo JA, Portillo A, Santibanez S, Blanco JR, Perez-Martinez L, Ibarra V. Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2669–71. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00366-06>
8. Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol*. 1991;173:1576–89.
9. Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, et al. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:237–44. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1102.040603>
10. Zhu Y, Fournier PE, Ereemeeva M, Raoult D. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multilocus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. *BMC Microbiol*. 2005;5:11. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-5-11>

Address for correspondence: Antonio Cascio, Programma di Infettivologia Speciale, Medicina Tropicale e delle Migrazioni e Parassitologia, Policlinico "G. Martino," Via Consolare Valeria n. 1, 98125 Messina, Italia; email: [acascio@unime.it](mailto:acascio@unime.it)

## **Mycobacterium tuberculosis Complex in Remains of 18th–19th Century Slaves, Brazil**

**To the Editor:** Nineteenth century Rio de Janeiro, Brazil, was marked by increased illness and deaths from tuberculosis (TB). By the twentieth century, it was still believed that most TB cases in the Americas originated from Europe; the “virgin soil” hypothesis for African (1) and Amerindian populations was accepted. However, modern and archeological DNA evidence confirms the wide distribution of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) and TB in the Old and New Worlds.

LETTERS

Rio de Janeiro was a main entry port for millions of Africans captured for the slave trade. Pretos Novos (New Blacks) Cemetery (PNC; 1769–1830) was created in Rio de Janeiro as a burial ground for the many slaves who died at market. Comingled bone fragments (≈5,000) from ≈30 persons were recovered at PNC; most bones were broken and had been exposed to fire (2,3). Bioanthropological analysis determined most of the bones were from men 18–25 years of age (2); none had lesion consistent with TB.

Femurs from 16 persons were surveyed for *M. tuberculosis* ancient DNA (aDNA). The thick shafts of femur offered a preserved condition for molecular analysis, and the bones could be individualized, avoiding duplication of samples. Paleogenetic investigation guidelines were followed. Sample preparation, aDNA extraction, and PCR were performed at the Paleogenetics Unit (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro) an isolated environment exclusively dedicated to aDNA research.

Before removal of the bone surface, samples were decontaminated by ultraviolet light (15 min/all sides), frozen in liquid nitrogen, and

subjected to manual trituration. Bone powder (≈200 mg) was then incubated with digestion buffer (56°C, 48–72 h) as described (4). aDNA hybridizations with MTC probes were conducted as described (4). By using 2 segments of mitochondrial DNA (mtDNA) hypervariable segment I (HVS-I) target, we determined the ancestry of the humans from whom the bones were derived (4). To control for recent contamination, we compared the HVS-I sequences with those in GenBank and also in a database for the laboratory staff.

Using the hybridization assay with insertion sequence (IS) 6110 target, we detected MTC aDNA in bones from 4/16 persons (samples PN1, PN8, PN13, PN15); 3 of these samples (PN1, PN8, PN13) were also positive for IS1081 target, confirming MTC infection (Table). HVS-I target was retrieved from 3 samples (PN6, PN14, PN15), which enabled determination of the human mtDNA haplotypes (L3e2, L3d1, L1c2, respectively) (Table). The haplotypes showed that the 3 persons were of African descent (GenBank accession nos. JQ639893–Q639895). Our findings are consistent with those from studies based on

current African populations, which show that haplotype L1c is restricted to central Africa (5) and L3d and L3e are most frequently found in western and central Africa, respectively (6).

Historic data (3) showed that 95% of persons buried in PNC were New Blacks, meaning they were born in Africa and died just after arriving in America. Our mtDNA results confirm historic and genetic records that indicate a large percentage of persons brought to Brazil as slaves originated from western–central and western Africa. This makes the PNC samples unique for the paleogenetic purpose of this investigation.

The endemicity of TB in Rio de Janeiro during the colonial period was confirmed by Jaeger and colleagues, who demonstrated MTC infection in 56.6% of persons with European ancestry buried at Nossa Senhora do Carmo Church (4). The difference in the frequency of MTC found in the remains of slaves buried in PNC and of Europeans buried at Nossa Senhora do Carmo Church may be explained by the types of samples analyzed and the epidemiologic conditions of both groups. The cremation of corpses at PNC may also partly explain the difference. The

Table. Results of genetic analyses of *Mycobacterium tuberculosis* complex hybridization and human mtDNA haplotypes from human bone samples collected from Pretos Novos Cemetery, Rio de Janeiro, Brazil\*

Sample	TB hybridization		Nucleotide position of mtDNA hypervariable segment I†												mtDNA haplotype
	IS6110	IS1081	129	145	148	172	187	189	213	223	278	311	319	320	
CRS	NA	NA	G	G	C	T	C	C	G	C	C	T	G	C	H
PN1	+	+													
PN2	–	–													
PN3	–	–													
PN4	–	–													
PN5	–	–													
PN6	–	–	G	G	C	T	C	T	G	T	C	C	G	T	L3e2
PN7	–	–													
PN8	+	+													
PN9	–	–													
PN10	–	–													
PN11	–	–													
PN12	–	–													
PN13	+	+													
PN14	–	–	G	G	C	T	C	T	G	T	C	T	A	C	L3d1
PN15	+	–	A	A	C	T	T	C	A	T					L1c2
PN16	–	–													

\*The cemetery was used as a burial ground for African slaves who died in slave markets during 1769–1830. Blank cells mean target could not be retrieved. mtDNA, mitochondrial DNA; TB, tuberculosis; IS, insertion sequence; CRS, Cambridge Reference Sequence (accession no. AB055387); NA, not applicable; PN, bone samples from humans buried in Pretos Novos Cemetery; Abs, absence of nucleotide.  
†The prefix 16 has been omitted from the nucleotide numbers.

finding of MTC aDNA in the remains of 25% of persons buried at PNC could be an underestimation of infection.

Our finding that some of the slaves buried in PNC had TB infection when they arrived in Brazil is in agreement with previous findings of the differential distribution of TB and with a tuberculin survey on the African continent, supporting the hypothesis of native African TB (7,8). Therefore, the hypothesis of Africa as virgin soil for TB (1,9) cannot be easily supported. The incidence of TB among the slaves/Blacks in Rio de Janeiro was less than expected given their social and sanitary conditions (10), especially in a TB-endemic situation (4). Previous exposure to MTC might explain their apparent relative resistance.

Other evidence showing African contact with Europeans before the sixteenth century, supports the existence of TB in Africa (8), and TB was prevalent in urbanized centers along coastal areas of western Africa (7,8). Although some of those cases were probably the result of European contact, it is not possible to exclude that some were caused by TB native to Africa. We can affirm that persons buried in PNC, who were transported to Brazil as slaves from Africa, brought TB infection with them; whether the infection was caused by European TB endemic to Africa or by TB native to Africa is not known.

#### Acknowledgments

We thank the Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Instituto Oswaldo Cruz (IOC)/FIOCRUZ for providing samples of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA for positive control assays. We also thank the genomics platform of Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde/FIOCRUZ for technical assistance.

Support for this study was provided by IOC/FIOCRUZ; a grant from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (grants E-26/110.189/2008

and E-26/ 111.637/2010); and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico fellowships (to L.H.J., grant 142260/2010-0, and to A.M.I., grant 300484/2008-9).

**Lauren H. Jaeger,  
Sheila M.F.M. de Souza,  
Ondemar F. Dias,  
and Alena M. Iñiguez**

Author affiliations: Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil (L.H. Jaeger, S.M.F.M. de Souza, A.M. Iñiguez); and Instituto de Arqueologia Brasileira, Belford Roxo, Brazil (O.F. Dias).

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1905.120193>

#### References

- Cummins SL. "Virgin soil"—and after: a working conception of tuberculosis in children, adolescents, and aborigines. *BMJ*. 1929;2:39–41. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.2.3575.39>
- Machado LC. Sítio cemitério dos Pretos Novos: análise biocultural. In: Dias O, Carvalho E, Zimmermann M, editors. Estudos contemporâneos de arqueologia. Palmas (Brazil): Fundação Universidade do Tocantins Neurosci, Instituto de Arqueologia Brasileira; 2006.
- Pereira JCMS. À flor da terra: o cemitério dos Pretos Novos no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Garamond; 2007.
- Jaeger LH, Leles D, Lima VD, Silva LD, Neto OD, Iñiguez AM. *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2012;12:642–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.021>
- Harich N, Costa MD, Fernandes V, Kandil M, Pereira JB, Silva NM, et al. The trans-Saharan slave trade—clues from interpolation analyses and high-resolution characterization of mitochondrial DNA lineages. *BMC Evol Biol*. 2010;10:138. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-10-138>
- Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sanchez-Diz P, et al. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet*. 2002;71:1082–111. <http://dx.doi.org/10.1086/344348>
- Calmette A. Enquete sur l'épidémiologie de la tuberculose dans les colonies Françaises. *Ann Inst Pasteur (Paris)*. 1912;7:497–514.
- Daniel TM. The early history of tuberculosis in central East Africa: insights from the clinical records of the first twenty years of Mengo Hospital and review of relevant literature. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998;2:784–90.
- Stead WW. Tuberculosis in Africa. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998;2:791–2.
- Sigaud JFX. Do clima e das doenças do Brasil, estatística médica deste império. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz. 2009.

Address for correspondence: Alena M. Iñiguez, Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Pavilhão Rocha Lima, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Avenida Brasil 4365, Manguinhos 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil; email: [alena@ioc.fiocruz.br](mailto:alena@ioc.fiocruz.br)

## Treatment of Listeriosis in First Trimester of Pregnancy

**To the Editor:** Foodborne infections with *Listeria monocytogenes* continue to be dangerous and disruptive. A 2011 outbreak in the United States, linked to cantaloupes, affected 147 persons; 33 persons died, and 1 pregnant woman experienced a miscarriage (1). Moreover, the incidence of listeriosis has been rising in several European countries (2). Compared with the general population, pregnant women are at markedly increased risk of acquiring listeriosis (3). Women who are infected with *L. monocytogenes* in the third trimester of pregnancy are typically treated with antimicrobial drugs until the child's delivery (3). However, the optimal treatment regimen for listeriosis early in pregnancy is unknown.

We cared for a 28-year-old, previously healthy woman who sought treatment at 12 weeks' gestational age with fever, headache, and neck stiffness; blood cultures were positive for *L. monocytogenes*. Lumbar puncture on admission to our hospital in Boston, Massachusetts, in December 2011, revealed clear fluid and an opening pressure of 15 mm Hg;

### 3.3 Paleoparasitological results from XVIII century human remains from Rio de Janeiro, Brazil

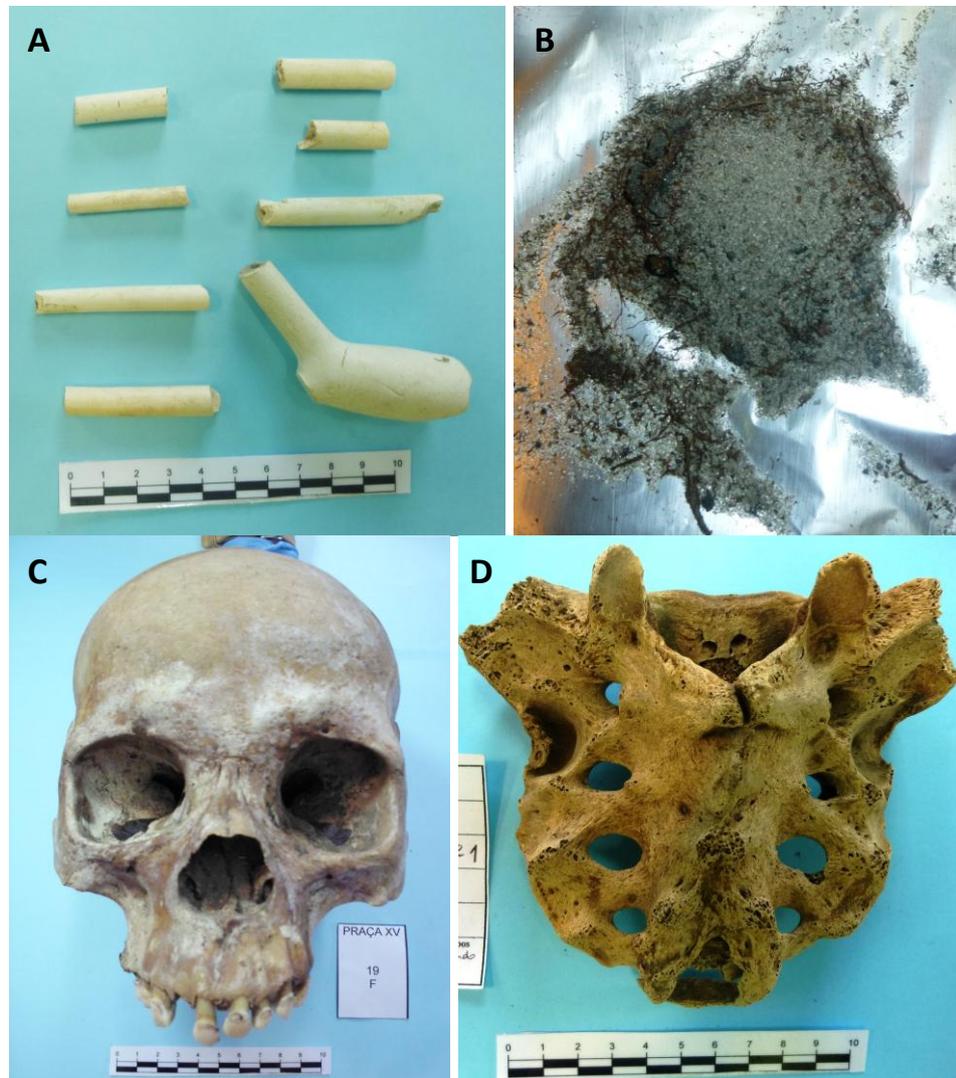


Figura 3.3: Artefatos arqueológicos e amostras ósseas encontrados no sítio arqueológico Cemitério da Praça XV, Rio de Janeiro, Brasil. Artefatos arqueológicos característicos da cultura africana (A); amostras de sedimentos coletadas diretamente dos forames do sacro por raspagem (B); e amostras ósseas, crânio (C) e sacro (D). Escala: 1 cm. Coleção do IAB.

Antes do início das políticas higienistas do final do século XVIII, na região central da cidade do Rio de Janeiro estavam localizados o porto de desembarque

dos escravos e os mercados de escravos. Na região portuária, existia um cemitério para enterrar os corpos de escravos que chegavam mortos nos navios negreiros mas também para corpos de indigentes e da população geral que morria das grandes epidemias que assolaram a cidade na época. Em 1996, durante obras de reestruturação da região, enterramentos humanos datados dos séculos XVIII a XIX foram descobertos. Além disso, artefatos arqueológicos da cultura africana foram encontrados, como cachimbos. O salvamento arqueológico foi realizado pelo IAB e as análises bioantropológicas demonstraram a presença de características negróides em 31% dos indivíduos e modificações dentárias intencionais em 25%. Para este estudo foram coletadas amostras de sedimento dos forames do sacro de 10 indivíduos, submetidos ao processo de curadoria museológica, através de raspagem. A análise paleoparasitológica foi realizada através de microscopia de luz e pelo menos 10 lâminas foram visualizadas para cada indivíduo. Apesar do escasso material, foi possível identificar que 80% dos indivíduos estavam infectados por parasitos intestinais. Foram visualizados ovos de *Ascaris* sp., *Trichuris* sp., *Taenia* sp. e protozoários intestinais. Os ovos de *Trichuris* sp. foram os mais frequentemente encontrados (n=26) e a análise de estatística descritiva demonstrou que esses ovos são compatíveis com a espécie *Trichuris trichuira*, a espécie que parasita o hospedeiro humano. Este é o primeiro trabalho descrevendo parasitos intestinais em sítios arqueológicos do Rio de Janeiro colonial. Esta é a primeira descrição de *Taenia* sp. em sítios arqueológicos no Novo Mundo. E considerando a natureza do material coletado para a análise paleoparasitológica deste sítio arqueológico, a prevalência e diversidade parasitária devem ser consideradas como subestimados.



## Short communication

## Paleoparasitological results from XVIII century human remains from Rio de Janeiro, Brazil

Lauren Hubert Jaeger<sup>a</sup>, Veronica Taglioretti<sup>b</sup>, Martín Horacio Fugassa<sup>b</sup>, Ondemar Dias<sup>c</sup>, Jandira Neto<sup>c</sup>, Alena Mayo Iñiguez<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos, Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil<sup>b</sup> CONICET-Laboratorio de Paleoparasitología y Arqueología Contextual, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina<sup>c</sup> Instituto de Arqueología Brasileira, Belford Roxo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 23 May 2012

Received in revised form 31 October 2012

Accepted 16 November 2012

Available online 27 November 2012

## Keywords:

Paleoparasitology

Sacral foramina

Museum collection

Helminths

Brazil

## ABSTRACT

Paleoparasitological studies of the Brazilian colonial period are scarce. A paleoparasitological analysis was performed on human remains from the archeological site *Praça XV* Cemetery in Rio de Janeiro, dating from the early 18th to 19th Centuries. The samples were obtained from the Institute of the Brazilian Archaeology collection, and showed evidence of washing and brushing. Sediments were extracted from sacral foramina by scraping. Sediments from skulls were used as negative paleoparasitological controls. Spontaneous sedimentation method was performed prior to microscopic analysis. The results revealed that 8 of 10 individuals were infected with intestinal helminths and/or protozoa. Eggs of the nematodes *Trichuris* sp. and *Ascaris* sp. as well as a single taeniid egg were found. Protozoa cysts suggestive of *Entamoeba* sp. were also observed. *Trichuris* sp. was the most frequent and abundant parasite, found in 70% of individuals (26 eggs). The study showed the importance of analysis of sediment from human remains preserved in museum or scientific collections, even those subjected to a curating procedure. The levels of infection revealed here should be considered underestimations. This is the first paleoparasitological study from Rio de Janeiro city for the Brazilian colonial period and the first report of human *Taenia* sp. in the New World.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

During the Brazilian colonial period, Rio de Janeiro was the capital of Brazil and the main commercial center of the country and, as a consequence, underwent massive urbanization (Fragoso and Florentino, 2001). Located on the coast, the city's port was a trading center for the entire southeast region, primarily handling sugar, coffee and gold (Fragoso and Florentino, 2001). The accelerated population growth, combined with disordered expansion of the city and poor sanitary conditions, allowed the introduction and spread of infectious and parasitic diseases.

Paleoparasitology is the study of parasites in archeological or paleontological materials. Such research provides information on past and present diseases and contributes to understanding the evolution of human social structure, biology, and behavior (Pike, 1968; Bouchet et al., 2003a; Gonçalves et al., 2003). Many studies have shown the presence of parasites in human remains in Pre-Columbian Brazil (Ferreira et al., 1980; Araújo et al., 1981;

Gonçalves et al., 2003; Iñiguez et al., 2003); however studies that demonstrate the presence and frequency of parasites in colonial periods are scarce. The most common biological samples for paleoparasitological analyses are coprolites (desiccated or mineralized feces), and sediments from latrines and the pelvic and abdominal regions of mummified bodies (Bouchet et al., 2003a). Nevertheless, Fugassa et al. (2008), working with bones that had undergone museum curation, recovered *Ascaris* sp. and *Capillaria* spp. eggs from organic material in the human sacrum foramina found at a Patagonian archeological site (850–500 years BP).

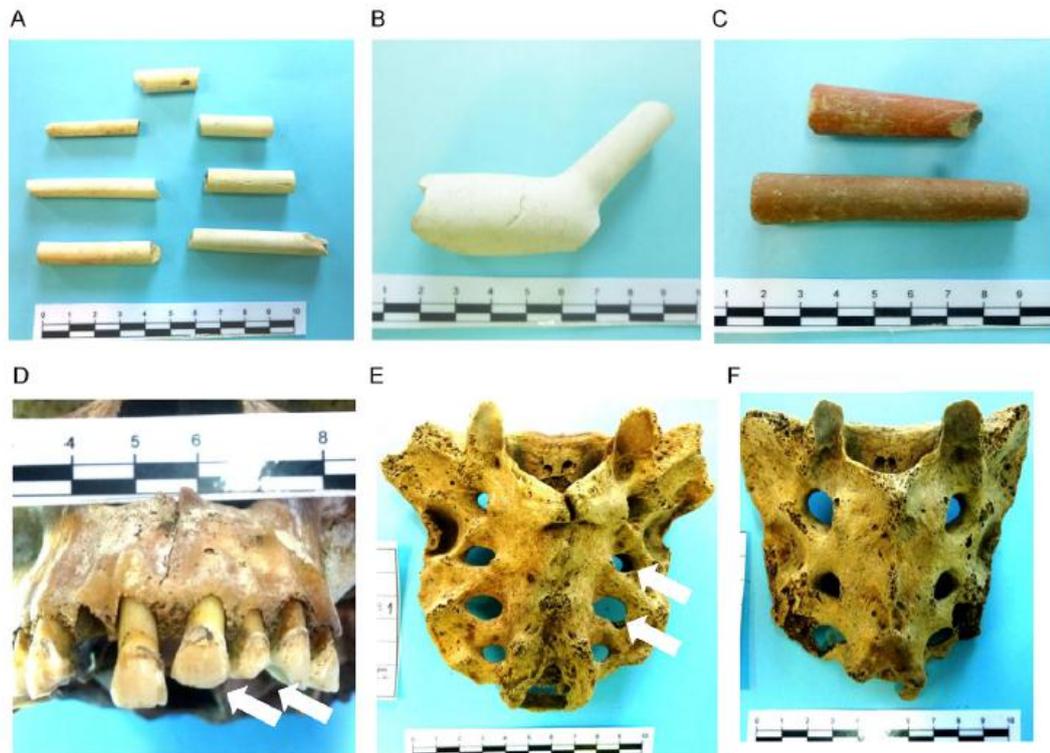
In the present study, a paleoparasitological analysis of human remains from the archeological site *Praça XV* Cemetery in Rio de Janeiro, Brazil, was conducted in order to verify the presence of intestinal parasites in osteological remains of the Brazilian colonial period, submitted to a curatorial process, and to generate new data on the epidemiology of parasitic diseases in Brazilian colonial period.

## 2. Materials and methods

The present day *Praça XV de Novembro* (November XV Square) was a central area of Rio de Janeiro city in colonial times. In 1996, during the construction of a tunnel in the port, human skeletons dating from the 18th and 19th centuries were discovered. There

\* Corresponding author at: Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21045 900, Brazil. Tel.: +55 21 25621416.

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



**Fig. 1.** Archeological remains from the archaeological site Praça XV Cemetery, Rio de Janeiro, Brazil. IAB collection. (A–C) Cultural artifacts related to AfroBrazilian culture. (D) Intentional dental modifications. (E and F) Human sacrum and sacral foramina. Scale bars = 1.0 cm. Photographed by A.M. Iñiguez.

was a burial ground for the general population in the region. African slaves who died in the slave markets located near the port were also buried in the cemetery. The archeological remains, including cultural artifacts (Fig. 1A–C), were collected by the Institute of Brazilian Archaeology (Instituto de Arqueologia Brasileira – IAB). Stratigraphic analysis performed during excavation confirmed that human skeletal remains were found in argillaceous and sandy soil, characteristic of a typical mangrove ecosystem. During excavation, due to a high degree of disaggregation of the burials and the anatomic separation of individuals, complete skeletal series were not identified. Instead, a series of types of bones, skulls and mandibles for example, were collected, stored at room temperature, and protected from light. All bones were well preserved and were submitted to the process of curation. In this process, the bones were cleaned of the original soil, but no chemicals were added.

The bio-anthropological analysis of 37 skulls showed that 59% were young adults, 27% mature adults, 11% adolescents, and 3% children. Forty-six percent were male, 38% female, and 16% undetermined. Craniofacial analysis of 14 skulls revealed that 11 showed evidence of ethnic African origin. The preliminary analysis of 12 skulls demonstrated that 9 individuals presented dental modifications (Fig. 1D).

The sediment samples were recovered from the interior of the sacral foramina of ten individuals (Fig. 1E and F). Three to 7 g of sediment, comprising chiefly sand, were used in the paleoparasitological analysis. Samples were transported to laboratory at 4 °C and kept at –20 °C until paleoparasitological analysis. The sediment samples were rehydrated (1:2 w/v) with 0.5% aqueous trisodium

phosphate solution for 72 h at 4 °C. Paleoparasitological analysis was conducted by spontaneous sedimentation prior to microscopic examination. Ten to 20 slides of each sample were examined under 10× and 40× magnification (Axiostar Plus – Zeiss). Parasites eggs were measured and photographed with a Canon A650 IS and edited using the ImageJ 1.44p program (National Institutes of Health – USA). Descriptive statistical analyses were performed using the program R (version 2.13.2).

Sediment scrapings from the interior of skulls ( $n=5$ ) were used as negative controls for paleoparasitological analysis. The control sediments were processed following the methodology described above.

### 3. Results

Paleoparasitological examination revealed that 8/10 individuals were infected by intestinal parasites. *Trichuris* sp. eggs (Nematoda) were the most frequently found, in 7/10 individuals. Twenty-six eggs were recovered (Fig. 2A–E). Most of these *Trichuris* sp. eggs possessed no content or polar plugs. Eggs measurements were 40.84–56.1 μm in length and 22.0–33.0 μm in width (Table 1). Descriptive statistical analyses demonstrated that *Trichuris* sp. eggs of mean length,  $47.83 \pm 4.46$  ( $n=24$ ) and mean width,  $27.41 \pm 3.23$  ( $n=24$ ), corresponded to that established for *Trichuris trichiura* species by Confalonieri et al. (1988) (Table 2; Fig. 3). A single *Ascaris* sp. egg, measuring  $79.2 \mu\text{m} \times 56.9 \mu\text{m}$ , was found in sample XV31 (Fig. 2F).

A helminth egg, measuring  $31.5 \mu\text{m} \times 31.5 \mu\text{m}$ , belonging to the family Taeniidae was found in sample XV33 (Fig. 2G). The taeniid

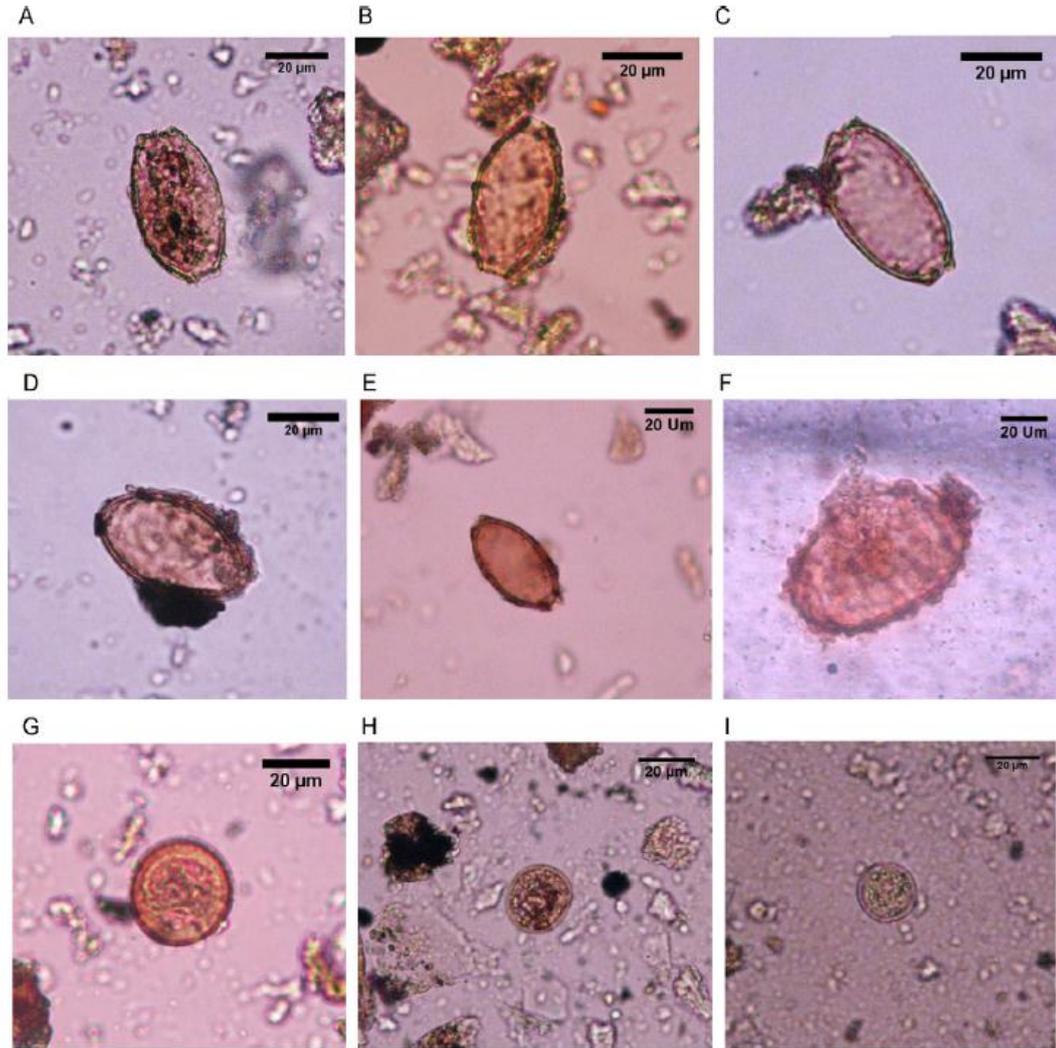


Fig. 2. Results Paleoparasitological analysis. A-E *Trichuris* sp. eggs; F *Ascaris* sp. egg; G *Taenia* egg; H-I Protozoan cysts. Scale bars are on the figures.

egg is characteristic of human *Taenia* sp., displaying a thick shell with a prism aspect and dimensions of 31–43 µm (WHO, 2007).

Two spherical structures similar to intestinal protozoa were observed in the samples XV29 and XV33, measuring 25.2 µm × 25.2 µm and 22.5 µm × 22.5 µm in diameter, respectively (Fig. 2H and I). These putative intestinal protozoa are suggestive of *Entamoeba coli*, due to the absence of flagella and fibrils, and the size of both mature and immature cysts of 10–35 µm, usually 15–25 µm (WHO, 2007). Control samples of skull sediment were negative.

#### 4. Discussion

This is the first report of intestinal parasites in human remains from archeological sites in Rio de Janeiro from the Brazilian colonial period. *T. trichiura* and Trichostrongylide infection have been reported in archeological sites from the historic period of Brazil in Minas Gerais and Piauí states (Confalonieri et al., 1981; Araújo et al., 1984). The human remains retrieved from this site constituted

an opportunity to study infectious and parasitic diseases during the Brazilian colonial period due to the absence of data related to this period, and the preservation of material. In general, the preservation of organic material is limited to places of low humidity or frozen conditions (Bouchet et al., 2003b). Tropical climates are usually unsuitable for the preservation of organic matter. The Rio de Janeiro city has a tropical climate with high temperatures and humidity. The combination of heavy rainfall, abundant insect life, and acid soil usually accelerate the process of decomposition of organic material (Bouchet et al., 2003b). Nevertheless, it was possible to find helminth eggs in organic material recovered from human remains from this site.

*Ascaris lumbricoides* and *T. trichiura* infections reflect poor sanitation and hygiene (Bouchet et al., 2003a). They are the most common human intestinal parasites in European archeological sites dated to medieval and historic times (Bouchet et al., 2003a). However, *Ascaris* eggs are rarely found in American prehistoric populations, while *T. trichiura* had a wide distribution in the New World in pre-Colombian times (Gonçalves et al., 2003). This

**Table 1**  
Morphometric data for *Trichuris* sp. eggs found in *Praça XV* Cemetery, Rio de Janeiro, Brazil.

Sample (n = 24 eggs)	Length (μm)	Width (μm)
XV24	42.07	22.20
XV24	47.25	24.75
XV24	47.25	28.46
XV25	56.10	33.00
XV25	45.80	27.20
XV25	44.55	27.22
XV26	47.02	22.20
XV26	40.84	24.75
XV26	44.55	24.75
XV26	45.78	24.75
XV28	42.75	24.75
XV28	37.12	34.65
XV28	49.50	27.22
XV28	51.97	29.70
XV28	49.50	29.70
XV29	44.55	29.70
XV31	55.68	29.70
XV31	47.02	27.22
XV31	49.05	30.93
XV31	47.02	24.75
XV31	49.50	27.20
XV32	44.55	24.75
XV32	49.50	28.46
XV32	54.45	32.17
XV32	47.02	29.70
Mean	47.83 ± 4.46	27.41 ± 3.23

difference may be due to environmental and taphonomic factors that affect preservation of eggs (Leles et al., 2010) or by some inherent characteristic of the egg.

*Taenia* spp. eggs have been recovered from human coprolites and latrine sediments from Old World archeological sites (Bouchet et al., 2003b; Gonçalves et al., 2003). They have not been found in humans of the New World in pre-Columbian times prior to the

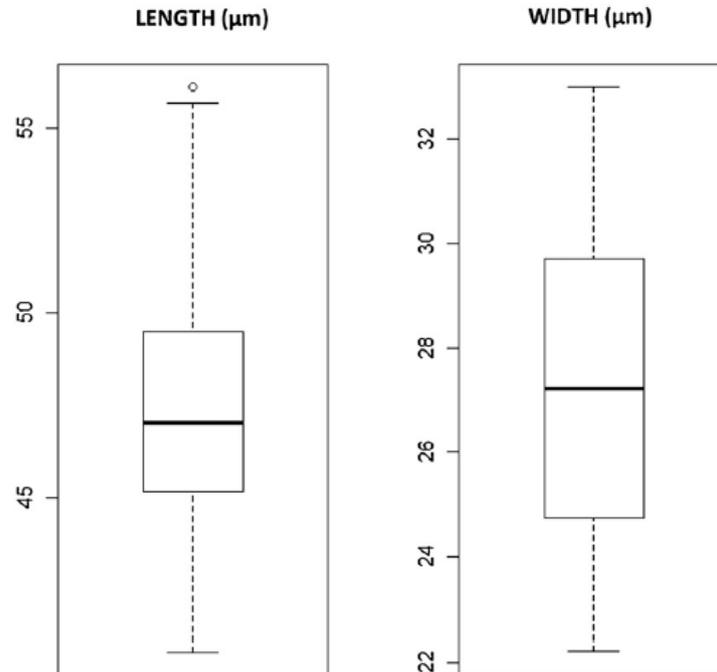
**Table 2**  
Morphometric data for *Trichuris* sp. eggs (n = 24) found in *Praça XV* Cemetery, Rio de Janeiro, Brazil.

Measurements	Length (μm)	Width (μm)
Min.	40.84	22.20
1st Qu.	45.16	24.75
Median	47.02	27.22
Mean	47.83	27.41
3rd Qu.	49.50	29.70
Max.	56.10	33.00
SD	4.46	3.23

introduction of pigs and cattle (Gonçalves et al., 2003). Paleoparasitological studies have demonstrated the presence of taeniid eggs in pre-Columbian Patagonia in zooarchaeological material, where human tapeworms have not been found (Beltrame et al., 2010, 2011). In the present study, because the parasite eggs were found in sediments from the sacrum, (Fig. 1E and F) with external deposits and/or contamination removed during the curatorial processes, the finding suggests infection by human taeniids, *Taenia solium* or *T. saginata*.

There is some evidence pointing to the human origin of the *Taenia* sp. egg: (1) Bio-anthropological analysis indicates that the *Praça XV* Cemetery archeological site was a human cemetery; (2) Control samples of skull sediment were negative for paleoparasitological analysis; and (3) the finding is statistically supported, of the human-specific parasite *T. trichiura*, corroborated the human origin of the samples. Therefore, this is possibly the first record of human *Taenia* sp. in the New World, corroborating with new data of the paleodistribution of tapeworms.

However, we cannot rule out the possibility that the *Praça XV* Cemetery was used for disposal of organic refuse, including animal excrement. Rocha et al. (2006) showed animal-specific parasites, such as *Capillaria* sp. and *Oxyuris equi* eggs, in the Place d'Armes archeological site (Namur, Belgium) of the Gallo-Roman

**Fig. 3.** Descriptive statistical analyses of morphometric data from *Trichuris* sp. eggs from this study.

Period through the 19th century, confirming the zoological origin of organic sediments. The presence of human and animal specific-eggs confirms the used of this site for disposal of various types of organic matter, including human and animal excrement. In the present study, although no human material contaminated with animal feces was found, we cannot rule out the possibility of a post-mortem artifact, or contamination, as only a single egg was found.

This study contributes to the understanding of parasitic diseases with zoonotic potential, especially in cities such as Rio de Janeiro that had increased population growth, crowding, and poor sanitation conditions in colonial times.

We found spherical structures that may be intestinal protozoan cysts. Cysts are fragile and less resistant to decay compared to helminth eggs (Gonçalves et al., 2003). Of 3 archeological samples positive for *Giardia duodenalis* antigen by immunoassay, Gonçalves et al. (2002) found only one positive by microscopic examination. We observed only two cysts that we attributed to protozoa. The vulnerability of cysts to decay may result in artificially low estimates of protozoa in paleoparasitology (Gonçalves et al., 2002). The location of *Praça XV* Cemetery, near the coastline in the port of Rio de Janeiro at Guanabara Bay, may have contributed to preservation of intestinal protozoa. Historical records show that the location corresponded to a vast mangrove swamp, and the human skeletal remains were found in argillaceous and sandy soil characteristic of a typical mangrove ecosystem. It is possible that the microenvironment of a mangrove swamp permitted differential preservation of cysts and eggs. In addition, the foramina sacrum trapped parasitic eggs and cysts and may also have provided protection against taphonomic effects, allowing better preservation of parasites.

The eggs of *Trichuris* sp. found were within the size range reported for both desiccated and non-desiccated eggs of *T. trichiura* species (Confalonieri et al., 1988). The average length expected for the human *T. trichiura*, without polar plugs, is 48.08 and 47.65  $\mu\text{m}$  for non-desiccated and desiccated eggs, respectively (Confalonieri et al., 1988). The results confirmed the experimental observations of Confalonieri et al. (1988), who found that the size of *T. trichiura* eggs does not change with desiccation.

Paleoparasitological records suggest that, although the majority of studied intestinal parasites infected pre-Columbian Amerindians (Gonçalves et al., 2003), parasitosis seemed to have become a major public health problem after the arrival of European settlers (Le Bailly et al., 2006). A considerable increase may have occurred with European colonization and the creation of new urban settlements (Fernandes et al., 2005). It would be likely to find these parasites in Brazilian historical archeological sites; however, there is no current data from this period. The present study demonstrated the frequent occurrence and diversity of intestinal parasites in historic times, and suggests a high intensity of parasites in this population, since the source of material examined was cleaned human remains.

The study showed the importance of analysis of sediment from human remains preserved in museum or scientific collections, even following the museum curating process. Our work was successful in recovering helminth eggs in 80% of individuals, even when the bone materials were cleaned. In addition, we found a large number of eggs, mainly of *T. trichiura*, suggesting that the results represent an underestimation of the prevalence of intestinal infection in historic times. If it were possible to access all organic material associated with the abdominal region, such as complete sacral sediment or coprolites, the prevalence, intensity, and/or diversity of recovered parasites would likely be much greater.

The study of sediment samples from the human sacral region submitted to the curatorial process opens opportunities for the

study of past disease patterns and increased understanding of the introduction and spread of disease. The curatorial process should be regulated, and all organic material preserved, to enable future studies in paleoparasitology, as well as in paleogenetic, paleopalynology, and paleodiet.

## Acknowledgements

We thank the Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos IOC/FIOCRUZ. The project support was provided by CAPES/MINCYT and CNPq fellowships. We could like to thanks to FAPERJ, IOC/FIOCRUZ and CAPES. All authors report no conflicts of interest relevant to this paper.

## References

- Araújo, A., Confalonieri, U., Ferreira, L.F., 1984. Encontro de ovos de *Trichostrongylidae* e *Trichuris trichiura* em corpo mumificado do período colonial brasileiro. Rev. Centr. Cienc. Biol. Saúde 1, 11–16.
- Araújo, A., Ferreira, L.F., Confalonieri, U., 1981. A Contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. Rev. Bras. Biol. 41, 873–881.
- Beltrame, M.O., Fugassa, M., Sardella, N.H., Civalero, M.T., Aschero, C., 2011. Raptor pellets as zooarchaeological material for paleoparasitological studies in Patagonia. J. Archaeol. Sci. 38, 1511–1515.
- Beltrame, M.O., Fugassa, M., Sardella, N.H., 2010. First paleoparasitological results from late Holocene in Patagonian coprolites. J. Parasitol. 96, 648–651.
- Bouchet, F., Guidon, N., Dittmar, K., Harter, S., Ferreira, L.F., Chaves, S.M., Reinhard, K., Araújo, A., 2003a. Parasite remains in archaeological sites. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1), 47–52.
- Bouchet, F., Harter, S., Le Bailly, M., 2003b. The state of the art of paleoparasitological research in the Old World. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1), 95–101.
- Confalonieri, U.E., Ribeiro Filho, B., Ferreira, L.F., Araújo, A., 1988. The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. In: Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U.E. (Eds.), Paleoparasitologia No Brasil. PEC/ENSP, Rio de Janeiro.
- Confalonieri, U.E., Araújo, A., Ferreira, L.F., 1981. *Trichuris trichiura* infection in Colonial Brazil. Paleopathol. News 51, 9–11.
- Fernandes, A., Ferreira, L.F., Gonçalves, M.L., Bouchet, F., Klein, C.H., Iguchi, T., Sianto, L., Araújo, A., 2005. Intestinal parasite analysis in organic sediments collected from a 16th-century Belgian archeological site. Cad. Saúde Pública 21, 329–332.
- Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U., 1980. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74, 798–800.
- Fragoso, J., Florentino, M., 2001. O arcaísmo como projeto: Mercado atlântico, sociedade agrária e elite mercantil em uma economia colonial tardia, 4 ed. Civilização Brasileira, Rio de Janeiro.
- Fugassa, M., Sardella, N.H., Guichón, R.A., Denegri, G.M., Araújo, A., 2008. Paleoparasitological analysis applied to museum-curated sacra from Meridional Patagonian collections. J. Archaeol. Sci. 35, 1408–1411.
- Gonçalves, M.L., Araújo, A., Ferreira, L.F., 2003. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98 (Suppl. 1), 103–118.
- Gonçalves, M.L., Araújo, A., Duarte, R., da Silva, J.P., Reinhard, K., Bouchet, F., Ferreira, L.F., 2002. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96, 640–643.
- Iñiguez, A.M., Araújo, A., Ferreira, L.F., Vicente, A.C.P., 2003. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain Reaction approach. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 63–65.
- Le Bailly, M., Gonçalves, M.L., Lefevre, C., Roper, D.C., Pye, J.W., Araújo, A., Bouchet, F., 2006. Parasitism in Kansas in the 1800: a glimpse to the past through the analysis of grave sediments from Meadowlark cemetery. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101 (Suppl. 2), 53–56.
- Leles, D., Reinhard, K.J., Fugassa, M., Ferreira, L.F., Iñiguez, A.M., Araújo, A., 2010. A parasitological paradox: why is ascariid infection so rare in the prehistoric Americas. J. Archaeol. Sci. 37, 1510–1520.
- Pike, A.W., 1968. Recovery of helminth eggs from archaeological excavations, and their possible usefulness in providing evidence for the purpose of an occupation. Nature 219, 303–304.
- Rocha, G.C., Harter-Lailheugue, S., Le Bailly, M., Araújo, A., Ferreira, L.F., da Serrafreire, N.M., Bouchet, F., 2006. Paleoparasitological remains revealed by seven historic contexts from Place d'Armes, Namur, Belgium. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 101 (Suppl. 2), 43–52.
- WHO, 2007. Pranchas para o Diagnóstico de Parasitas Intestinais.

### 3.4 Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th century in Rio de Janeiro, Brazil



Figura 3.4: Coleta paleogenética e artefatos arqueológicos encontrados no sítio arqueológico Igreja Nossa Senhora do Carmo, Rio de Janeiro, Brasil. Coleta paleogenética (A) realizada diretamente no sítio arqueológico, demonstrando o uso de EPIs e materiais descartáveis. Artefatos arqueológicos da religião católica: crucifixo (B); e da cultura africana: búzios (C) e figa (D). Escala: 1 cm. Os artefatos arqueológicos fazem parte da coleção do IAB.

Durante o período colonial brasileiro, na região central da cidade estava localizada a Igreja Nossa Senhora do Carmo. Após chegada da família Real Portuguesa ao Brasil, essa igreja tornou-se capela Real e posteriormente catedral da

cidade por décadas. Enterramentos humanos foram descobertos durante as obras de restauração para a comemoração dos 200 anos da chegada da família Real Portuguesa ao Brasil. A coleta paleogenética foi realizada, levando em conta todos os cuidados necessários para evitar a contaminação com DNA moderno e a degradação do aDNA, como o uso de EPIs por todos os membros da equipe, o uso de ferramentas e materiais estéreis e descartáveis. O material recém coletado no sítio arqueológico foi protegido da luz e mantido a 4°C até a chegada ao laboratório onde foi mantido a -20°C até o processamento. A análise paleogenética anterior demonstrou a ancestralidade europeia em 91% dos indivíduos enterrados na INSC. Este trabalho tem como principal objetivo verificar a presença de parasitos intestinais nos indivíduos enterrados no sítio arqueológico INSC, através de uma análise paleoparasitológica utilizando três diferentes técnicas parasitológicas. Os resultados demonstraram a presença de infecção pelos helmintos *Ascaris* sp. e *Trichuris* sp. em 11,8% da população. Uma análise de estatística descritiva revelou que os ovos de *Trichuris* sp. são compatíveis com a espécie *Trichuris trichiura*. O estudo demonstra que a aplicação das três técnicas parasitárias complementa o cenário epidemiológico das parasitoses intestinais. Considerando os resultados de estudos anteriores, que demonstram a presença de parasitos intestinais em amostras provenientes no Cemitério Praça XV (CPXV), este estudo sugere que os nematoides *Ascaris* sp. e *Trichuris trichiura* foram amplamente distribuídos no Rio de Janeiro colonial. O estudo sugere que a diferença entre a prevalência dos dois sítios é um reflexo de que os indivíduos enterrados na INSC tinham melhores condições de vida e higiene comparadas aos indivíduos enterrados no CPXV.



Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Paleopathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpp](http://www.elsevier.com/locate/ijpp)

## Research article

## Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th century in Rio de Janeiro, Brazil

Lauren Hubert Jaeger<sup>a</sup>, Veronica Taglioretti<sup>b</sup>, Ondemar Dias<sup>c</sup>, Alena Mayo Iñiguez<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil<sup>b</sup> Laboratório de Paleoparasitologia, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina<sup>c</sup> Instituto de Arqueologia Brasileira, Belford Roxo, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 13 December 2012

Received in revised form 28 March 2013

Accepted 1 April 2013

## Keywords:

Paleoparasitology  
Intestinal parasites  
Parasitological techniques  
Colonial period  
Brazil

## ABSTRACT

Most paleoparasitological studies based on archeological sites in the New World are from pre-Columbian times. However, understanding of the introduction and spread of parasites with the arrival of European settlers and African slaves in America remains a topic for investigation. This study evaluated the presence of intestinal parasites in human remains from an archeological site of the colonial period, and compared the sensitivity of three parasitological techniques for paleoparasitological study. Samples were collected from the archeological site *Nossa Senhora do Carmo Church*, Rio de Janeiro, Brazil. Paleoparasitological examination revealed intestinal helminths in 2/17 (11.8%) individuals. *Trichuris trichiura* and *Ascaris* sp. eggs were found. The spontaneous sedimentation technique showed a greater numerical recovery of parasites, while the flotation techniques were superior in retrieving more parasite types. The study demonstrated that combining the three techniques improves the recovery of parasites in terms of number and diversity. Similar diversity of parasites to that of a previous historical archeological site suggests that the distribution of intestinal parasites was widespread in Rio de Janeiro, regardless of social status.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Paleoparasitological study is becoming more widespread among researchers in paleopathology. The identification of parasites in human remains has generated information about infectious diseases and lifestyle of ancient populations, as well as helping to chart human migration routes (Araújo et al., 2008; Ferreira, 2011).

Most paleoparasitological studies in the New World have been focused on pre-Columbian times (Ferreira et al., 1980; Araújo et al., 1981; Iñiguez et al., 2003). However, the introduction and spread of parasites after the arrival of European settlers and African slaves to America remains understudied. Evidence of *Trichuris trichiura* and trichostrongylid nematode infections have been reported in archeological sites from the colonial period of Brazil, in the Minas Gerais and Piauí states (Confalonieri et al., 1981; Araújo et al., 1984). Recently, Jaeger et al. (2013) found infections with the nematodes *Trichuris* sp., *Ascaris* sp., and the cestode *Taenia* sp. in individuals buried in a cemetery in Rio de Janeiro dating to the 18th century.

The city of Rio de Janeiro, on the Atlantic coast, has a semi-humid tropical climate with an annual rainfall in the range 1000–1500 mm. The *Nossa Senhora do Carmo Church* (INSC) is

located in the neighborhood of the *Largo do Paço*, in the center of Rio de Janeiro. Historically, the church was designated the Chapel Royal, and later it became the cathedral of the city. In 2007, during an architectural and artistic restoration, an archeological site was identified by the Institute of Brazilian Archeology [Instituto de Arqueologia Brasileira (IAB)]. Forty-three human burials and ossuaries were identified, dating from the 17th to 19th centuries (Dias, 2008). Bio-anthropological analysis revealed that most of the subjects were adults less than 30 years old (78%), with an equal number of men and women (Jaeger et al., 2012). A tuberculosis paleogenetic study conducted in the INSC population showed positivity for bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in 53.1% of the individuals (Jaeger et al., 2012). Using the mitochondrial DNA, European ancestry was identified in 100% of primary burials. Considering that intestinal parasite infection is an indicator of health and hygiene conditions of a population, the aim of this study was to evaluate the presence of intestinal parasites in samples from the archeological site of the *Nossa Senhora do Carmo Church*. In addition, the sensitivity of three parasitological techniques in paleoparasitological analyses was compared.

## 2. Materials and methods

Sediment samples were collected directly from the pelvic region of the seventeen human bodies. All samples were derived

\* Corresponding author. Tel.: +55 21 25621416.  
E-mail address: [alena@ioc.fiocruz.br](mailto:alena@ioc.fiocruz.br) (A.M. Iñiguez).

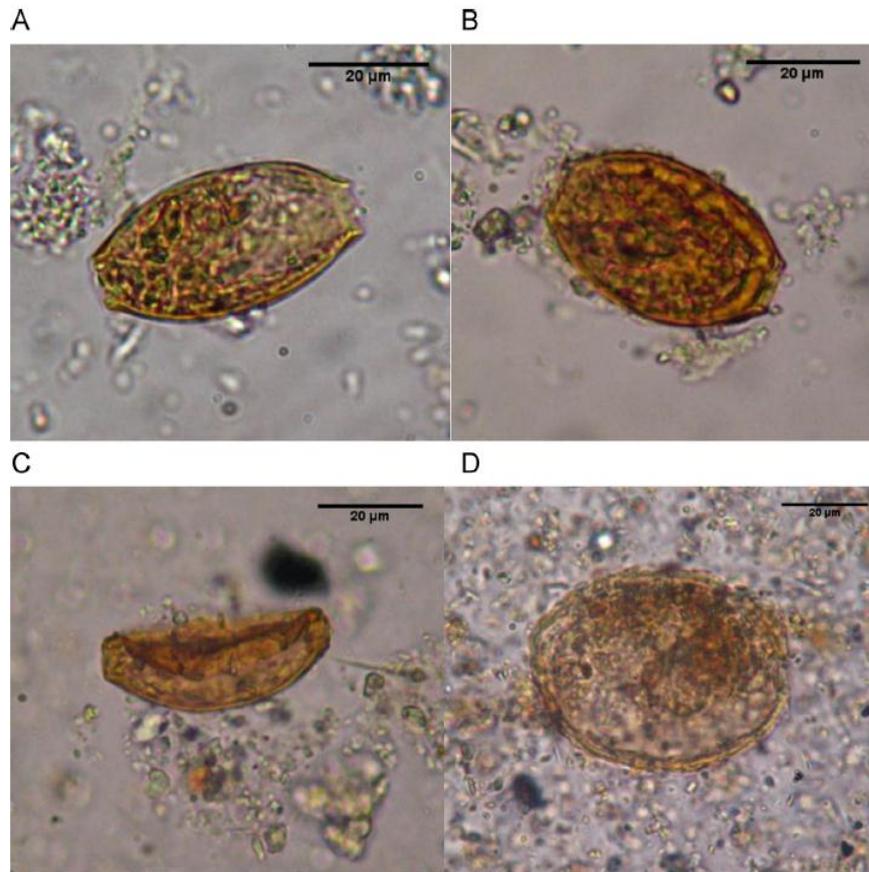


Fig. 1. Paleoparasitological results of archeological site INSC, Rio de Janeiro, Brazil. (A, B) *Trichuris* sp. eggs; (C) warped *Trichuris* sp. egg; (D) *Ascaris* sp. egg. Scale bar in the figures.

from primary burials, with the exception of burial 38, which was from secondary burial (Jaeger et al., 2012). The samples (1–2 g) were rehydrated (1:2, w/v) with 0.5% aqueous trisodium phosphate at 4 °C for 72 h. Paleoparasitological investigation was conducted using three techniques, which followed the protocol of Taglioretti et al. (2012): spontaneous sedimentation, sucrose flotation, and zinc chloride flotation. We conducted the three parasitological techniques on all samples in an effort to obtain the maximal results and for comparative purposes.

For spontaneous sedimentation (Lutz, 1919), ten slides of each sample were examined. Sucrose flotation was conducted at a sucrose density of 1.2 (Sheather, 1923, modified). At least 3 slides were examined after 15, 45, and 105 min flotation or until no further structures were recovered. The sediment samples were cleaned twice with aqueous trisodium phosphate 0.5%, and zinc chloride flotation was conducted at a density of 1.5 (Reinhard et al., 1988). At least 5 slides were examined after 10, 25, 40, 55, and 70 min flotation or until no structures were observed. A minimum of 18 slides was examined for each sample. Slides were examined under 100× and 400× magnification, and measured with an ocular micrometer. The images were made by Canon AS 650, and edited by ImageJ 1.44p (National Institutes of Health, USA). The program R (version 2.13.2) was used for descriptive statistical analyses and construction histograms.

### 3. Results

When the results of all three methods are combined, we find that two of seventeen (11.8%) individuals had intestinal helminthes (Table 1). A single positive sample was found when using spontaneous sedimentation (5.9%) with 10 of *Trichuris* sp. eggs recovered. Sucrose flotation and zinc chloride flotation each showed a single (5.9%) positive sample for *Ascaris* sp. and *Trichuris* sp., respectively (Table 1).

Two methods (spontaneous sedimentation and zinc chloride flotation) recovered a total of 13 *Trichuris* sp. eggs from individual 14A (Table 1 and Fig. 1A–C). Most *Trichuris* sp. eggs possessed no content or polar plugs. *Trichuris* sp. egg deformation ( $n=3$ ) was observed with zinc chloride flotation (Fig. 1C), and data from those samples were excluded from the descriptive analysis. *Trichuris* sp. eggs ( $n=10$ ) measured 40.0–47.5 µm in length and 22.5–27.5 µm in width (mean  $\pm$  SD = 43.5  $\pm$  2.48 µm L and 24.0  $\pm$  1.84 µm W) (Fig. 2). The *Trichuris* sp. mean egg size corresponds to that established for *T. trichiura* (Confalonieri et al., 1988). A single *Ascaris* sp. egg measuring 57.5  $\times$  45.0 µm was found in individual 38H (Fig. 1D), using the sucrose flotation technique.

### 4. Discussion

In the Americas, parasite infections became a major health problem after the arrival of European settlers and the slave trade.

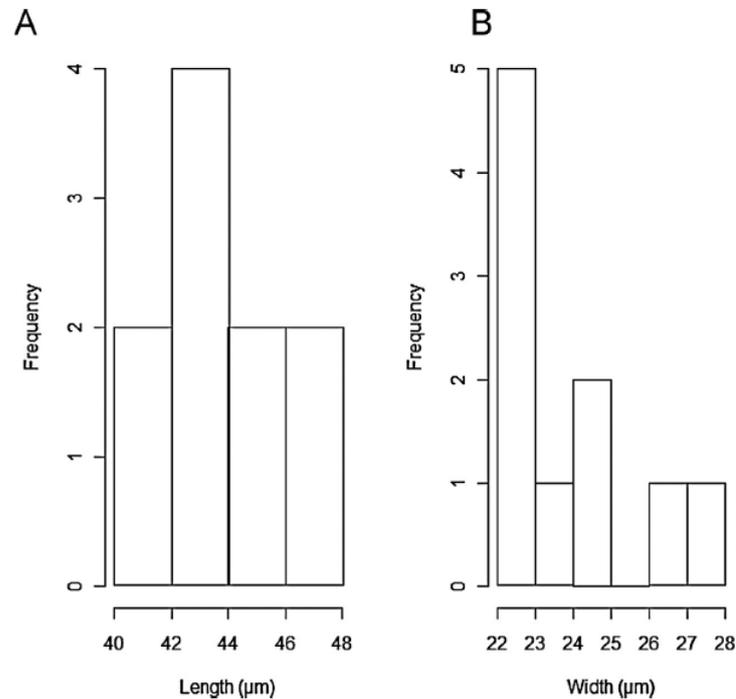


Fig. 2. Frequency histograms of (A) length and (B) width of *Trichuris* sp. eggs.

Changes in the lifestyle of the native populations, population growth and overcrowding of colonized cities, may have facilitated the transmission and spread of infectious and parasitic diseases. For this reason, and since the parasitological studies in the colonial period in Americas are scarce, the study of intestinal parasites in that historical period is necessary.

Findings of *Trichuris* sp. and *Ascaris* sp. in Brazil have been reported dating from 8000 to 7000 BP and  $3490 \pm 120$  to  $430 \pm 70$  BP, respectively (Goncalves et al., 2003), through the colonial period (Confalonieri et al., 1981; Araújo et al., 1984). The observation of *Trichuris* sp. and *Ascaris* sp. in the present study is in agreement with previous investigations reporting the recovery of those species in human samples dating from the Brazilian colonial period (Jaeger et al., 2013). We recently found an 80% infection for intestinal parasites in human remains recovered in *Praça XV* cemetery. In historical times, this cemetery served as a burial place for the general population of the city, along with a considerable number of African slaves (Jaeger et al., 2013). Because the *Praça XV* samples underwent a curation process before paleoparasitological analysis, the prevalence of infection and abundance of parasites observed should be considered an underestimation. On the other hand, the individuals buried at the archeological site INSC were of European maternal ancestry, which is consistent with the clergy and more affluent population of the city (Jaeger et al., 2012). As expected, since these individuals should have lived under more healthful conditions than the general population and the African slaves, they were less parasitized than individuals from the *Praça XV* cemetery. In spite of the lower prevalence of intestinal parasites in the INSC archeological site, a similar diversity of parasites, with *Trichuris* sp. and *Ascaris* sp. was observed, suggesting that the distribution of intestinal parasites was widespread in the city, regardless of social status. A previous study showed *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in 53.1% of individuals buried in INSC (Jaeger et al.,

2012). Ten individuals analyzed in the present study (58.8%) were infected with mycobacteria, including the two individuals positive for intestinal helminths.

The presence of preserved parasites is influenced by the taphonomic conditions to which the samples have been subjected. The semi-humid tropical climate of the city affects the preservation of the parasites as well as of organic compounds. Despite this, the recovery of a reasonable egg number was possible at the INSC archeological site. Other taphonomic factors, such as proximity to the coast, the temperature variations, and possible contact with groundwater may also have influenced preservation.

Table 1

Paleoparasitological results from archeological site *Nossa Senhora do Carmo* Church, Rio de Janeiro, Brazil. (+): positive result; (–): negative result; [] number of eggs found.

Sample	Spontaneous sedimentation	Flotation		Parasites
		Sucrose	Zinc chloride	
03A	–	–	–	
04A	–	–	–	
08A	–	–	–	
12B	–	–	–	
14A	+ [10]	–	+ [3]	<i>Trichuris</i> sp.
17H	–	–	–	
18A	–	–	–	
20A	–	–	–	
22B	–	–	–	
23A	–	–	–	
25B	–	–	–	
28C	–	–	–	
30F	–	–	–	
32C	–	–	–	
33C	–	–	–	
34A	–	–	–	
38H	–	+ [1]	–	<i>Ascaris</i> sp.

Paleoparasitology usually involves morphometry to identify genus, and sometimes species, of a particular parasite. In this study, descriptive statistical analyses demonstrated that *Trichuris* sp. egg size corresponds to that established for desiccated eggs of *T. trichiura* (Confalonieri et al., 1988), the human species. Although it is not easy to assess the parasite load of an individual at time of death (Bouchet et al., 2003), the large number of eggs observed in individual 14A combined with the poor preservation of samples suggests a substantial infection by *T. trichiura*.

Concentration techniques such as sedimentation and flotation have the main objective of recovering the largest number of parasites possible from fecal samples (De Carli, 1994). In paleoparasitology, these techniques are often used because they increase the chance of finding parasitic forms in coprolites and sediment samples. Spontaneous sedimentation concentrates of the parasitic debris through deposition in an aqueous solution of lower density than eggs or other parasite forms (Fugassa, 2011). Flotation techniques are based on difference in the density between helminth eggs or protozoan cysts and the fecal material, in which the less dense organisms float to the surface of a saturated solution of suitable density (De Carli, 1994). The density of helminth eggs ranges from 1.05 and 1.15 g/mL (De Carli, 1994). Trematodes are denser than nematodes and therefore need a flotation solution of higher density than that used for nematodes (Fugassa, 2011). The disadvantage of flotation is that the solution may cause deformation or distortion of the egg wall, making identification difficult.

Paleoparasitological techniques attempt to find parasites and/or parasitic structures in archeological samples. In the present study, three parasitological techniques were employed, as in Taglioretti et al. (2012). Although Taglioretti et al. (2012) found that zinc chloride flotation was more sensitive than sucrose flotation or spontaneous sedimentation for the recovery of *Ascaris* sp., *T. trichiura*, and *Enterobius vermicularis* eggs from human fecal samples, in the present study, spontaneous sedimentation recovered the greatest number of eggs, with no deformation of the eggs compared to the other tested techniques. However, the flotation techniques recovered a greater diversity of parasite species than did spontaneous sedimentation. The difference in our results from those of Taglioretti et al. (2012) may be related to the nature of samples: modern vs. archeological sediments. Usually, paleoparasitological studies use a single concentration technique for recovering parasites, most often spontaneous sedimentation. Our observations, using each technique separately, demonstrated differing parasite infections within the population, from 5.9% prevalence with only *T. trichiura* infection (spontaneous sedimentation) to the same prevalence with only *Ascaris* sp. infection (sucrose flotation). The combined approach revealed a more complete picture of infection of the Rio de Janeiro population. Applying multiple parasite concentration techniques in paleoparasitological studies increases the recovery of parasites in both number recovered and the diversity of species.

## Acknowledgements

We thank Dr. Aurea Maria Lage de Moraes from the Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and the Laboratório de Paleontologia UNMDP, Mar del Plata, Argentina for technical supporting. The project was supported by FAPERJ (E-26/110.189/2008 and E-26/111.637/210), CAPES/MINCYT (530/2011) and CNPq fellowships (A.M.I., grant number 300484/2008-9, and L.H.J., grant number 142260/2010-0).

## References

- Araújo, A., Ferreira, L.F., Reinhard, K.J., Gardner, S.L., 2008. Parasites as probes for prehistoric human migrations? *Trends in Parasitology* 24 (3), 112–115.
- Araújo, A., Confalonieri, U., Ferreira, L.F., 1984. Encontro de ovos de *Trichostrongylidae* e *Trichuris trichiura* em corpo mumificado do período colonial brasileiro. *Revista do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde* 1, 11–16.
- Araújo, A., Ferreira, L.F., Confalonieri, U., 1981. A contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 41, 873–881.
- Bouchet, F., Guidon, N., Dittmar, K., Harter, S., Ferreira, L.F., Chaves, S.M., Reinhard, K., Araujo, A., 2003. Parasite remains in archaeological sites. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1), 47–52.
- Confalonieri, U.E., Ribeiro Filho, B., Ferreira, L.F., Araujo, A., 1988. The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. In: Ferreira, L.F., Araujo, A., Confalonieri, U.E. (Eds.), *Paleoparasitologia no Brasil*. PEC/ENSP, Rio de Janeiro.
- Confalonieri, U.E., Araujo, A., Ferreira, L.F., 1981. *Trichuris trichiura* infection in Colonial Brazil. *Paleopathology Newsletter* 51, 9–11.
- De Carli, G., 1994. *Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas – Métodos e Técnicas*, first ed. Medsi, Rio de Janeiro.
- Dias, O., 2008. *Arqueologia, Igreja Nossa senhora do Carmo da Antiga Sé: História e Restauração*. Ed. Nacional, Rio de Janeiro.
- Ferreira, L.F., 2011. Introdução à paleoparasitologia. In: Ferreira, L.F., Reinhard, K.J., Araújo, A. (Eds.), *Fundamentos da Paleoparasitologia*. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 27–41.
- Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U., 1980. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74, 798–800.
- Fugassa, M.H., 2011. Diagnóstico paleoparasitológico. In: Ferreira, L.F., Reinhard, K.J., Araújo, A. (Eds.), *Fundamentos da Paleoparasitologia*. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 227–261.
- Goncalves, M.L., Araujo, A., Ferreira, L.F., 2003. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1), 103–118.
- Iñiguez, A.M., Araújo, A., Ferreira, L.F., Vicente, A.C.P., 2003. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. 1), 63–65.
- Jaeger, L.H., Taglioretti, V., Dias, O., Fugassa, M.H., Iñiguez, A.M., 2013. Paleoparasitological results from XVIII century humans remains from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Tropica* 125 (3), 282–286.
- Jaeger, L.H., Leles, D., Lima, V.S., da Silva, L.P., Dias, O., Iñiguez, A.M., 2012. Mycobacterium tuberculosis complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 12 (4), 642–648.
- Lutz, A.O., 1919. *Schistosoma mansoni* e schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 11, 121–155.
- Reinhard, K.J., Confalonieri, U.E., Herrmann, B., Ferreira, L.F., Araujo, A., 1988. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo* 37, 217–239.
- Sheather, A.L., 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Therapy* 36, 266–275.
- Taglioretti, V., Fugassa, M.H., Iñiguez, A.M., Sardella, N.H., 2012. Evaluación de la eficacia de la flotación con cloruro de zinc como método de enriquecimiento para la recuperación de huevos de enteroparásitos. *Revista Argentina de Parasitología* 1, 164.

### 3.5 The *Praça XV* cemetery: an opportunity for the study of infectious and parasitic diseases in colonial Rio de Janeiro.



Figura 3.5: Artefatos arqueológicos e amostras ósseas encontrados no sítio arqueológico Cemitério da Praça XV, Rio de Janeiro, Brasil. Amostras ósseas, crânio e dentes (A), sacro (D) e sedimento da região sacral obtido por raspagem (C); e artefatos arqueológicos característicos da cultura africana, cachimbo (D). Escala: 1 cm. Os artefatos arqueológicos fazem parte da coleção do IAB.

O sítio arqueológico Cemitério da Praça XV (CPXV) é conhecido por receber corpos de escravos que chegavam mortos nos navios negreiros mas também foram enterrados ali corpos de indigentes e da população geral que morria das grandes epidemias que afligiram o Rio de Janeiro durante o período colonial. Por isso, a população deste cemitério se torna uma excelente oportunidade para o estudo das doenças infecciosas e parasitárias que circulavam na cidade durante esse período. Um estudo anterior demonstrou a presença de parasitos intestinais em 80% dos indivíduos enterrados neste cemitério e a presença de números ovos de *Trichuris trichiura*. Neste estudo, nós desenvolvemos um painel paleoparasitológico molecular para o diagnóstico das principais parasitoses intestinais em amostras arqueológicas. Além disso, avaliamos a presença de infecção por bactérias do MTC e determinamos a ancestralidade matrilinear dos indivíduos. Os resultados do perfil paleoparasitológico demonstraram a presença de *Ascaris* sp., *Trichuris trichiura* e *Enterobius vermicularis*. Esta é a primeira descrição de *E. vermicularis* em sítios arqueológicos do Novo Mundo. A presença de infecção por bactérias do MTC foi detectada em 2 amostras sítio específicas das 28 analisadas. E a ancestralidade humana revelou a presença de haplogrupos representantes dos três grandes grupos populacionais, como esperado para um cemitério da população geral da cidade.

The *Praça XV* cemetery: an opportunity for the study of infectious and parasitic diseases in colonial Rio de Janeiro

Lauren Hubert Jaeger<sup>1</sup>, Ondemar Dias<sup>2</sup>, Alena Mayo Iñiguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. 21045-900.

<sup>2</sup> Instituto de Arqueologia Brasileira, Belford Roxo, Rio de Janeiro, Brazil. 26193-415.

Corresponding author: Tel.: 55 21 25621416; Email: [alena@ioc.fiocruz.br](mailto:alena@ioc.fiocruz.br); Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 21045-900, Brazil.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) has plagued the man for thousands of years. A recent work demonstrated the infection in Rio de Janeiro, Brazil at least 400 years ago in a population of European and African ancestry. In order to understand the dynamics of dispersion/origin of tuberculosis in Brazil, we conducted a paleogenetic study, in human remains recovered from the archaeological site *Praça XV* cemetery, to determine the presence of bacteria of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC). Additionally, the maternal ancestry of individuals was accessed by human mitochondrial DNA (mtDNA) analysis of hypervariable segment I polymorphisms, and the panorama of molecular paleoparasitological diagnosis was performed. Despite the poor preservation of samples, it was possible to verified the presence of TB infection by aDNA hybridization with IS6110 and IS1081 MTC targets, in 2 individuals. The mtDNA analysis allowed the recovery of HVS-I sequences in 11 individuals. European, African and Amerindian mtDNA haplogroups were identified, confirming the historical data the *Praça XV* cemetery was used to bury general population. It was possible to detect the infection by *Trichuris trichiura*, *Ascaris* sp., *Taenia* sp., and *Enterobius vermicularis* parasites. The study provides new data about the TB epidemic in the city during the colonial period. It also discusses the contribution of different population groups to the TB epidemic in Rio de Janeiro city.

Keywords: molecular paleoparasitology, tuberculosis, intestinal helminths, molecular panorama.

## 1. INTRODUCTION

The study of pathogens in ancient populations has unraveled the history of infectious and parasitic diseases. Tuberculosis (TB) is an example of these diseases. It is known that mycobacteria have accompanied early hominids since they left the African soil (Comas et al., 2013); and was widely distributed in Europe since the Middle Ages (Spigelman and Donoghue, 2003; Daniel, 2000). In Americas, it is known that TB existed before the arrival of Colombo (Sotomayor et al., 2004; Arriaza et al., 1995). However, after the arrival of European explorers, large centers were formed with poor sanitary condition and overcrowding, such as the disease exacerbated. The disease persists even today worldwide as an endemic form in several countries and more than 8.7 million new cases in the year 2011 (WHO, 2012). TB is a chronic disease caused by bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), in which is transmitted through contaminated aerosols released from an infected person.

Likewise, intestinal parasites are present in the human population and some species are considered 'heirloom parasites', since these have evolved with the human host (Araujo et al., 2008). They are the most common infections worldwide when transmitted by soil, and is estimated that 24% of the world's population are infected (WHO, 2011). Such parasites are usually transmitted through soil contaminated by human faeces, via the fecal-oral route, like *Ascaris* sp. and *Trichuris trichiura*, or by skin contact with infective third-stage larvae, like hookworms.

Recently, our group demonstrated the presence of TB in human remains with European ancestry in a Catholic cemetery dating from the Brazilian colonial period (Jaeger et al., 2012), and in skeletons with African ancestry, from a slave cemetery of

the same period (Jaeger et al, 2013a). In order to access the epidemiological scenario of TB during this period in Rio de Janeiro, this study analyzed the presence of disease in human remains from the *Praça XV* cemetery (CPXV – *Cemitério da Praça XV*). Additionally, we demonstrated previously the presence of intestinal parasites in individuals recovered this ancient cemetery (Jaeger et al., 2013b). Therefore, we performed a paleogenetic analysis in order to compare the results of the paleoparasitologic analysis and establish a panorama of molecular diagnostics in paleoparasitology.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1. The archaeological site *Praça XV* cemetery

The city of Rio de Janeiro was founded in the early 16th century. It was an important commercial center and suffered from unrestrained Portuguese exploration. The present day *Praça XV de Novembro* (November XV Square) was a central area of Rio de Janeiro city in colonial times. In this area, there was a port, where they left all the riches (gold, diamond, coffee and sugar) of Southeast region, and where Europeans entered to populate the new country, and African slaves to work the plantations. In 1996, during the construction of a tunnel in the port, human skeletons dating from the 18th and 19th centuries were discovered. It is known that there was a burial ground for the general population in the region. African slaves who died in the slave markets located near the port were also buried in the cemetery. The archaeological campaign excavation was conducted by the Institute of Brazilian Archaeology (*Instituto de Arqueologia Brasileira -IAB*). During excavation, due to a high degree of disaggregation of the burials and the anatomic separation of individuals, complete skeletal series were not identified. Instead, a series of types of bones, skulls and mandibles for example, were collected, stored at room

temperature, and protected from light. All bones were well preserved and were submitted to the curation process.

## 2.2. Precautions to avoiding contamination

Several precautions were taken to avoid aDNA degradation and modern DNA contamination during the collection procedure and aDNA analysis in a Paleogenetic Unit (LabTrip – IOC/Fiocruz). Clean protective clothing, gloves, head covering, mask and sterile material (tubes and instruments) was used. DNA extraction and amplification were performed under the procedures established for working with aDNA (Iñiguez, 2011). The preparation of sample, aDNA extraction, and PCR were performed at the Paleogenetic Unit, Oswaldo Cruz Institute/Oswaldo Cruz Foundation (IOC/FIOCRUZ). Electrophoresis, sequencing and sequence analysis were conducted at the Laboratory of Trypanosomatid Biology, IOC/FIOCRUZ. These two laboratories are physically distant from each other.

## 2.3. Archaeological samples

The bio-anthropological analysis of 37 skulls showed that 59% were young adults, 27% mature adults, 11% adolescents, and 3% children. Forty-six percent were male, 38% female, and 16% undetermined. The preliminary analysis of 12 skulls demonstrated that 9 individuals presented dental modifications. There were no lesions indicative of TB in samples of ribs. A total of 28 bone samples, including eight ribs and 20 vertebrae (associated or not to corpses) were obtained from the IAB collection. At least twenty individuals were analyzed. The bones could be individualized to the extent possible, avoiding duplication of samples. The sediment samples (n=10) were recovered from the interior of the sacral foramina of ten individuals by scraping. Samples were transported to laboratory at 4°C and kept at -20°C until paleoparasitological and paleogenetic analysis.

### 2.3. Ancient DNA Extraction

All bone samples were decontaminated of exogenous DNA by exposing the surface to UV light for 15 min in all faces and then, the surfaces were removed (Iñiguez et al., 2006). The samples were submitted to triturating in a mill, using nitrogen liquid. About 200 mg bone powder was used for aDNA extraction. The bone powder was treated with QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. The sediment samples were rehydrated (1:2, w/v) with 0.5% aqueous trisodium phosphate solution for 48 hours at 4°C. About 200µL sediment solution was used for aDNA extraction. The sediment samples were treated with 1.2 mL digestion buffer (NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM, SDS 0.5%, EDTA 50 mM, pH 8.0) with 1 mg/mL of Proteinase K (Invitrogen) and incubated at 56°C for 24 hours. Thereafter, the sediment samples were treated with IQ System (Promega) according to manufacturer's instructions. The aDNA was purified by a GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE HealthCare) and the DNA concentrations were estimated on spectrophotometer.

### 2.4. Hybridization Analysis

A dot blot procedure was conducted as described elsewhere (Jaeger et al., 2012). The DNA probes were prepared by PCR, purified by a GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE HealthCare) and labeled by chemiluminescence using Gene Images Alkphos Direct Labeling and Detection Systems (Amersham), according to the manufacturer's instructions. MTC hybridization was performed with two distinct DNA probes corresponding to insertion elements IS6110 and IS1081 (Taylor et al., 2005); and the parasitic hybridization with cytochrome b (*cyt b*) and NADH dehydrogenase of *Ascaris* sp. (Gijón-Botella et al., 2010; Peng et al., 2005), two regions of Internal transcribed spacer (ITS) of *T. trichiura* (Oh et al., 2010),

cytochrome c oxidase subunit I (COI) and ITS of *E. vermicularis*, and 18S and 28S ribosomal DNA (rDNA) of *S. stercoralis* (Basuni et al., 2011). DNA from *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294<sup>T</sup>) was used as hybridization positive controls for IS6110 and IS1081 probes. Nine controls were used to parasitic hybridization, including eight positive controls (*cyt b* and NADH of *Ascaris* sp., two regions of ITS *T. trichiura*, COI and ITS of *E. vermicularis*, and 18S and 28S rDNA of *S. stercoralis*) and one negative control (human DNA from the lab collection).

## 2.5. Human mtDNA Amplification and Sequencing

The attempt to amplify fragments of hypervariable segment I (HVS-I) of the human mtDNA was performed using four sets of primers: L16070/H16259 (Jaeger et al., 2012); L16209/H16356 (Handt et al., 1996); L16234/H15422; and L16268/H16498 with 189, 148, 189 and 231 base pair (bp), respectively. PCR amplification was carried out in 50  $\mu$ L volumes containing 1X PCR buffer, 2 mM of  $MgCl_2$ , 1 mM of dNTPs, 2.0 units of Platinum Taq (Invitrogen), 100 ng each primer and 5  $\mu$ L of DNA or 30 ng. Cycling conditions were: an initial denaturation step at 94 °C for 3 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s; followed by a final extension step at 72 °C for 5 min. Extraction blank controls and PCR negative controls were included, but positive PCR controls were not included. PCR products were visualized by 3% agarose gel electrophoresis (Specially Purified Agarose NA, GE HealthCare) stained with ethidium bromide. The sequencing reaction was performed using an BigDye Terminator kit v.3.1 (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol, with analysis in both directions, on an ABI 3730 (Applied Biosystems) automated sequencer. Bio Edit v 7.0.4 (Department of Microbiology, North Carolina State University, USA) and Lasergene Seqman v. 7.0.0 (DNASTAR, Madison, WI, USA) were used for editing and sequence analysis. The

human mtDNA sequences were compared to the GenBank database and from the laboratory staff.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Tuberculosis Hybridization

*M. tuberculosis* complex aDNA was detected in 2 vertebra samples from the archeological site *Praça XV* cemetery. Two vertebra samples yielded positive signals for both targets, IS6110 and IS1081 (Table 1). Twenty-six samples produced negative results. All rib samples produced negative results. All positive controls had the expected positive result.

#### 3.2. Parasitological Hybridization

The panorama of molecular paleoparasitological diagnosis showed infection by *E. vermicularis* in 5/10 individuals (50%), and by *Trichuris* sp. and *Ascaris* sp. in 4/10 (40%) individuals (Table 2). *Strongyloides stercoralis* aDNA was not detected in the sediment samples from *Praça XV* cemetery. All positive and negative controls had the expected result.

#### 3.3. Human mtDNA analysis

The analysis of human mtDNA showed that it was possible to retrieve the HVS-I target and determined the mtDNA haplogroup in 11 samples (Table 1). Results showed a high diversity of mtDNA haplogroups, as expected for a general cemetery in the city. Haplogroups representatives of the three great groups were identified: five European (45%), four Amerindian (36%), and two African (18%) haplogroups. There was no repetition of haplogroups, confirming the selection of bone from different individuals.

#### 4. DISCUSSION

Deguilloux et al. (2014) asserts that “cemeteries potentially hold a wealth of information about the biological and social aspects of the communities who used them”. The *Praça XV* cemetery was a mass grave that was used to bury the common people had no financial condition to afford a Catholic burial, in the churches. This cemetery is known to receive the bodies of people who died during the great epidemics that plagued the city during the colonial period. Therefore, we have an excellent opportunity for the study of infectious and parasitic diseases in Brazil during this period, because the Rio de Janeiro was the gateway to the country during this period. It was the capital of Brazil from 1763 to 1960. The city became the main commercial center of the country and as a consequence underwent massive urbanization (Fragoso and Florentino, 2001). The urban and population growth has not been accompanied by adequate public hygiene policy.

This study demonstrates the presence of MTC infection in two individuals buried in the *Praça XV* cemetery. This result was confirmed by two specific targets to MTC members. These are an obligate pathogen with no known environmental reservoir (Comas et al., 2013). Although we found positive results in two vertebrae unarticulated, the samples could be individualized, avoiding duplication of samples. Furthermore, analysis of human mtDNA allowed differentiating the haplogroup, confirming that the samples belong to different person. In a previous study, our group demonstrated the high prevalence (53%) of TB infection in individuals buried in the *Nossa Senhora do Carmo* church (*Igreja Nossa Senhora do Carmo* – INSC) with European ancestry (Jaeger et al., 2012), and 25% in African slaves from *Pretos Novos* cemetery (Cemitério dos Pretos Novos – CPN) (Jaeger et al., 2013a). Despite

that those cemeteries were of the same period, there was a lowest prevalence of TB infection in CPXV (7%). This may be due to the fact that in INSC was analyzed lung tissue samples. Because the CPXV bones were stored in a museum collection and was submitted to museological curation, it was not possible to have access to lung tissue samples, as performed at the INSC.

The pulmonary infection is the most frequently found. It is estimated that bone TB occurs in only 3–5% of infections, and that the spine is involved in approximately 40% of these (Donoghue, 2011). Although we demonstrated the presence of aDNA of MTC in bone samples which normally has no predilection, as femur (Jaeger et al., 2013a), and skull and ileum/sacral samples (Jaeger et al., 2012), the most of the positive results were observed in samples related to the site of infection, lung tissue and rib samples (Jaeger et al., 2012), even though different DNA concentrations are present in different bones (Misner et al., 2009). In this study, we chose samples which usually the mycobacteria is installed, such as ribs and vertebrae, representing pulmonary and disseminated infection, respectively. Regardless these only two vertebrae samples were positive. In fact, the low prevalence of TB infection in CPXV is unexpected, mainly because these archaeological sites are in the same city and period. They suffered the same environmental conditions and taphonomic factors. However, the clear low preservation of samples may have contributed to obtain more negative results. It is known that the major degradation of the aDNA happens rapidly after death that depends on factors such as temperature, pH, and salinity which may vary depending on depositional conditions (Sawyer et al., 2013). The CPXV was found during restoration of the city, like a large grave disorganized, with many bodies mixed and disjointed. This trait may have been harmful to the preservation of bones and organic material, such as aDNA. The preservation of the samples may have

been different from that observed in the INSC archaeological site where the bodies were presented in primary burials and articulated bodies (Jaeger et al., 2012).

In addition, in the INSC site was carried out paleogenetic collection of samples, following the recommendations for the better preservation of the material and to prevent contamination with modern DNA (Iñiguez, 2011). These samples were not handled by archaeologists or anthropologists without the use of gloves. A study performed by Pilli et al. (2013) showed that manipulated samples present incomplete or ambiguous genetic profiles compared to virgin samples. Furthermore, the CPXV cemetery was built to receive people who died in the great epidemics in the city. TB was not the only existing infection at the time in the city. It is known that smallpox, yellow fever, syphilis, Chagas disease, and worms were present in colonial Brazil (Maciel et al., 2012; Sheppard et al., 2001). It is possible that these individuals have undergone other injuries.

Although few studies in colonial Brazil, it has been demonstrated the contribution of European settlers in the dispersion of several infectious diseases in Americas. TB was widespread in Europe, accounting for one in four deaths from the 16th to the 18th centuries (Spigelman and Donoghue, 2003). It suggests that more virulent strains of the tubercle bacilli originated in Europe and spread to the Americas during the colonial expansions (Donoghue, 2009). Hence, a more severe disease, with acute and epidemic character, has spread among Native Americans. In 1855, the TB mortality in Brazil was 1/150 inhabitants (Maciel et al., 2012; Campos and Pianta, 2001), with lethality estimated at 50% (Hijjar et al., 2007).

In this study, we detected aDNA of intestinal helminths by using the molecular panorama. Previous studies demonstrated the presence of *Trichuris trichiura*, and *Ascaris* sp. eggs in CPXV (Jaeger et al 2013b) and INSC (Jaeger et al., 2013c)

archaeological sites. Our paleoparasitological results are in agreement with historic evidences that demonstrate poor sanitary conditions and hygiene of Rio de Janeiro during the colonial period (Hijjar et al., 2007). Frequent cases of co-infection between TB and others pathogens are well documented in ancient populations, like malaria (Lalremruata et al., 2012) and *M. leprae* (Donoghue et al., 2005). The finding of TB and intestinal helminths is expected, considering the poor sanitary and hygienic conditions and overcrowding.

Interestingly, we observed that helminth eggs were observed in samples with negative results for aDNA, and *vice-versa*. It is expected to find positive results through a technique and not by another, since they often eggs are not observed, it broke up or are not content inside. Molecular analysis can help to differentiate or confirm organisms, even in the absence of visible physical remains (Cleeland et al., 2013). We suggest the use of a combined approach to confirm and complement the diagnosis of intestinal parasites in the past.

This is the first identification of *E. vermicularis* aDNA in archaeological sites of Brazil. The conventional parasitological techniques, sedimentation and flotation, are used for many years for the diagnosis of intestinal parasites in archaeological material. In this study, we detected the presence of *E. vermicularis* aDNA in 50% of individuals; however no eggs were visualized by parasitological techniques. This fact suggests that the environmental conditions of the city and taphonomic factors affect more the helminth eggs such as *E. vermicularis* than others, such as *Ascaris* sp. and *Trichuris* sp., which have multiple layers and resistant protective protein. Moreover, considering the life cycle of this parasite, pregnant females placed in the perianal region explode and release their eggs (Rey, 2008). They are often carried by feces; however, usually the eggs are not shown in conventional parasitological examinations. The *S. stercoralis* infection was not diagnosed by any of techniques:

paleoparasitologic or paleogenetic. Considering the life cycle of this parasite, the eggs are normally released by the female still inside the intestine, which quickly hatch out (Rey, 2008). The larvae are released in the feces, requiring a period in the soil to become infective larvae (Rey, 2008). The larvae are markedly more fragile structures, and should not resist very well to the effects of time and/or the taphonomic factors. Furthermore, the material sediment sacral region of individuals from the site CPXV was collected from skeletons that had been submitted to museological curation.

In this study we identified a variety of mtDNA haplogroups in individuals buried in CPXV, with representatives of the three groups, Amerindians, Europeans and Africans. These results are expected and are in agreement with the historical evidence to say that this was a cemetery to bury the general population of the city. The current Brazilian population is formed by mixing between Native Americans, European explorers and African slaves. It is expected to find such diversity in a cemetery in the general population of the city.

### **Acknowledgements**

We thank the Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria of IOC/FIOCRUZ for yield DNA samples of MTC for positive control of assays, and PDTIS/FIOCRUZ genomic platform for technical assistance. Project support was provided by FAPERJ and CNPq fellowship. We could like to thanks to IOC/FIOCRUZ, LAPIH and CAPES.

## REFERENCES

- Araújo A, Reinhard KJ, Ferreira LF, Gardner SL (2008) Parasites as probes for prehistoric human migrations? *Trends Parasitol* 24(3):112-115.
- Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA (1995) Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am J Phys Anthropol* 98:37–45.
- Batini C, Lopes J, Behar DM, Calafell F, Jorde LB, van der Veen L et al (2011) Insights into the demographic history of African Pygmies from complete mitochondrial genomes. *Mol Biol Evol.* 28(2):1099-110.
- Cardoso S, Alfonso-Sánchez MA, Valverde L, Sánchez D, Zarrabeitia MT, Odriozola A (2012) Genetic uniqueness of the Waorani tribe from the Ecuadorian Amazon. *Heredity.* 108(6):609-15.
- Cardoso S, Valverde L, Alfonso-Sanchez MA, Palencia-Madrid L, Elcoroaristizabal X, Algorta J et al (2013) The Expanded mtDNA Phylogeny of the Franco-Cantabrian Region Upholds the Pre-Neolithic Genetic Substrate of Basques. *Plos One.* 8(7):e67835.
- Campos R, Pianta C (2001) Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. *Bol da Saude* 15(1):61-71.
- Cleeland LM, Reichard MV, Tito RY, Reinhard KJ, Lewis CM Jr (2013) Clarifying Prehistoric Parasitism from a Complementary Morphological and Molecular Approach. *J Archaeol Sci* 40(7):3060-3066.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, et al (2013) Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 45(10):1176-82.
- Daniel TM (2000) The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis* 4:395–400.
- Deguilloux MF, Pemonge MH, Mendisco F, Thibon D, Cartron I, et al (2014) Ancient DNA and kinship analysis of human remains deposited in Merovingian

necropolis sarcophagi (Jau Dignac et Loirac, France, 7th-8th century AD). *J Archaeol Sci* 41:399-405.

Donoghue HD (2011) Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 17(6):821-929.

Donoghue HD (2009) Human tuberculosis – an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes Infect* 11(14-15):1156-62.

Donoghue HD, Marcsik A, Matheson C, Vernon K, Nuorala E, et al (2005) Co-infection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* in human archaeological samples: a possible explanation for the historical decline of leprosy. *Proc Biol Sci* 272(1561):389-94.

Fernandes V, Alshamali F, Alves M, Costa MD, Pereira JB, Silva NM et al (2012) The Arabian cradle: mitochondrial relicts of the first steps along the southern route out of Africa. *Am J Hum Genet.* 90(2):347-55.

Fragoso J, Florentino M (2001) O arcaísmo como projeto: Mercado atlântico, sociedade agrária e elite mercantil em uma economia colonial tardia. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira. 259p.

Gijón Botella H, Afonso Vargas JA, Arnay de la Rosa M, Leles D, González Reimers E, et al (2010) Paleoparasitologic, paleogenetic and paleobotanic analysis of XVIII century coprolites from the church La Concepción in Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands, Spain. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(8):1054-1056.

Handt O, Krings M, Ward RH, Paabo S (1996) The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet* 59:368–376.

Hijjar MA, Gerhardt G, Teixeira GM, Procópio MJ (2007) Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. *Rev Saúde Pública* 41(supl.1):50-58.

Iñiguez AM (2011) Paleoparasitologia Molecular. In: Ferreira LF, Araújo A, Reinhard KJ, editors. *Fundamentos da Paleoparasitologia*. Rio de Janeiro: Fiocruz. p 301-316.

Iñiguez AM, Reinhard KJ, Gonçalves MLC, Ferreira LF, Araujo A, et al (2006) SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int J for Parasitology* 36:1419–1425.

- Jaeger LH, de Souza SM, Dias OF, Iñiguez AM. (2013a). *Mycobacterium tuberculosis* complex in remains of 18th-19th century slaves, Brazil. *Emerg Infect Dis* 19(5):837-839.
- Jaeger LH, Taglioretti V, Fugassa MH, Dias O, Neto J, et al (2013b) Paleoparasitological results from XVIII century human remains from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop* 125(3):282-286.
- Jaeger LH, Taglioretti V, Dias O, Neto J, Iñiguez AM (2013c) Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th century in Rio de Janeiro, Brazil. In Press.
- Jaeger LH, Leles D, Lima VD, Silva LD, Neto OD, et al (2012) *Mycobacterium tuberculosis* complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol* 12:642–648.
- Lalremruata A, Ball M, Bianucci R, Welte B, Nerlich AG, et al (2013) Molecular identification of falciparum malaria and human tuberculosis co-infections in mummies from the Fayum depression (Lower Egypt). *PLoS One* 8(4):e60307.
- Maciel MS, Mendes PD, Gomes AP, Siqueira-Batista R (2012) A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. *Ver Bras Clin Med São Paulo* 10(3):226-30.
- Misner LM, Halvorson AC, Dreier JL, Ubelaker DH, Foran DR (2009) The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *J Forensic Sci* 54(4):822-828.
- Pala M, Olivieri A, Achilli A, Accetturo M, Metspalu E, Reidla M et al (2012) Mitochondrial DNA signals of late glacial recolonization of Europe from near eastern refugia. *Am J Hum Genet.* 90(5):915-24.
- Pilli E, Modi A, Serpico C, Achilli A, Lancioni H, et al (2013) Monitoring DNA contamination in handled vs. directly excavated ancient human skeletal remains. *PLoS One* 8(1):e52524.
- Rey L (2008) *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 883p.

- Sawyer S, Krause J, Guschanski K, Savolainen V, Pääbo S (2012) Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. *PLoS One* 7(3):e34131.
- Scheible M, Alenizi M, Sturk-Andreaggi K, Coble MD, Ismael S, Irwin JA (2011) Mitochondrial DNA control region variation in a Kuwaiti population sample. *Forensic Sci Int Genet.* 5(4):e112-3.
- Sheppard DS (2001) A literatura médica brasileira sobre a peste branca: 1870-1940. *História, Ciências, Saúde — Manguinhos* VIII(1):172-92.
- Spigelman M, Donoghue H (2003) Paleobacteriology with special reference to pathogenic mycobacteria, Emerging Pathogens Archaeology, Ecology & Evolution of Infectious Disease. New York: Oxford University Press. 175-188p.
- Soares P, Alshamali F, Pereira JB, Fernandes V, Silva NM, Afonso C et al (2012) The Expansion of mtDNA Haplogroup L3 within and out of Africa. *PLoS One* 7(3):e34131.
- Sotomayor H, Burgos J, Arango M (2004) Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a Colombian prehispanic mummy. *Biomedica* 24 (Supp. 1):18–26.
- Taylor GM, Young DB, Mays SA (2005) Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *J Clin Microbiol* 43:2236–2240.
- Wang D, Su LY, Zhang AM, Li YY, Li XA, Chen LL et al (2012) Mitochondrial DNA Copy Number, but Not Haplogroup, Confers a Genetic Susceptibility to Leprosy in Han Chinese from Southwest China. *PLoS One* 7(6): e38848.
- WHO (2012) Global Tuberculosis Report. Geneva: WHO.
- WHO (2011) Helminth control in school age children: a guide for managers of control programmes. Geneva: WHO.
- Zhang AM, Jia X, Bi R, Salas A, Li S, Xiao X et al (2011) Mitochondrial DNA Haplogroup Background Affects LHON, but Not Suspected LHON, in Chinese Patients. *Plos One* 6(11):e27750.

Table 1: MTC Hybridization and human mtDNA Haplogroup results of the *Praça XV* cemetery, Rio de Janeiro, Brazil. (+): positive result; (-): negative result; [ ]: reference; (<sup>a</sup>): associated to a complete skeleton.

Sample	Sample Type	MTC Hybridization		mtDNA Haplogroup
		IS6110	IS1081	
XV C4b	Vertebra <sup>a</sup>	-	-	A2 [Cardoso et al., 2012]
XV C6a	Vertebra <sup>a</sup>	-	-	A2 [Cardoso et al., 2013]
XV VC4	Cervical vertebra	-	-	F/R/M [Wang et al., 2012]
XV VT5	Thoracic vertebra	-	-	U [Wang et al., 2012] / R [Scheible et al., 2011]
XV VT6	Thoracic vertebra	+	+	-
XV VT8	Thoracic vertebra	+	+	A [Scheible et al., 2011]
XV VT12	Thoracic vertebra	-	-	L3 [Soares et al., 2012] / M [Zhang et al., 2011]
XV VT13	Thoracic vertebra	-	-	X [Pala et al., 2012] / D [Fernandes et al., 2012]
XV 16	Rib	-	-	M [Zhang et al., 2011]
XV 18	Rib	-	-	T/J [Pala et al., 2012]
XV 20	Rib	-	-	L1c [Batini et al., 2011]
XV 22	Rib	-	-	M7 [Zhang et al., 2011]

Table 2: Results of the panorama of molecular paleoparasitological diagnosis from archeological site *Praça XV* cemetery, Rio de Janeiro, Brazil. (+): positive result; (-): negative result; (<sup>a</sup>): results of Jaeger et al., 2013b.

Sample	Paleoparasitologic Analysis <sup>a</sup>					Paleoparasitologic Molecular Analysis				
	Ascaris sp.	<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Enterobius vermicularis</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>		Ascaris sp.	<i>Trichuris trichiura</i>	<i>Enterobius vermicularis</i>	<i>Strongyloides stercoralis</i>	
XV24	-	+	-	-		+	-	-	-	
XV25	-	+	-	-		+	+	+	-	
XV26	-	+	-	-		-	-	-	-	
XV27	-	-	-	-		-	-	-	-	
XV28	-	+	-	-		-	-	-	-	
XV29	-	+	-	-		-	+	+	-	
XV30	-	-	-	-		-	-	-	-	
XV31	+	+	-	-		-	-	+	-	
XV32	-	+	-	-		+	+	+	-	
XV33	-	-	-	-		+	+	+	-	

## 4 DISCUSSÃO

### 4.1 Tuberculose

No presente trabalho nós demonstramos a presença de infecção por bactérias do MTC em remanescentes ósseos humanos do Rio de Janeiro, datados do período colonial brasileiro. É conhecido que aDNA de micobactérias pode ser detectado em remanescentes esqueléticos do passado, em humanos (Donoghue et al., 2005; Zink et al., 2005) e de animais (Rothschild et al., 2001). Essa peculiaridade é atribuída à característica dessas bactérias de possuir uma parede celular rica em lipídeos (os ácidos micólicos) (Verschoor et al., 2012) que atuaria na preservação da estrutura celular bacteriana e, conseqüentemente, na menor degradação do DNA. Além disso, o alto conteúdo GC presente no genoma das micobactérias contribui para uma melhor preservação do aDNA (Rollo et al., 2006).

A frequência de infecção por MTC em remanescentes humanos do sítio INSC foi alta (53,1%). Se considerarmos apenas a infecção por TB em remanescentes humanos de enterramentos primários, onde os indivíduos apresentam ancestralidade europeia, este valor aumenta para 56%. Estes achados estão de acordo com evidências históricas que afirmam que a TB foi amplamente distribuída na Europa desde o período Neolítico (Daniel, 2000), onde inicialmente se apresentava na forma de casos crônicos na zona rural (Stead, 1997). A TB foi prevalente na Europa durante a Idade Média (Daniel, 2004). A epidemia cresceu e espalhou-se rapidamente por toda a Europa Ocidental. Mas foi durante a Revolução Industrial, no século XVIII, que o ingrediente essencial para o desencadeamento da epidemia foi introduzido: formação das grandes cidades e pobreza generalizada (Stead, 1997). Estimativas propõem que a mortalidade por TB durante o século XVIII era de 900 mortes por 100.000 pessoas (Daniel, 2004). Corroborando com esses dados, Fletcher e colaboradores (2003) demonstraram uma frequência de infecção maior que 50% em remanescentes humanos, através da detecção de aDNA de bactérias do MTC, em costelas de indivíduos enterrados em uma igreja na Hungria, datados do século XVIII.

Com a avançada tecnologia da navegação, os europeus colonizaram outras regiões geográficas. Evidências históricas demonstram que durante a colonização

portuguesa do Brasil, jesuítas e colonos infectados pela micobactéria se estabeleceram no país (Maciel et al., 2012). Muitos deles, conscientes da doença, vieram atraídos pelas qualidades climáticas que se supunha na época serem importantes para o tratamento de doenças respiratórias (Hijjar e Procópio, 2006). Similarmente ao que ocorreu na Europa durante a Revolução Industrial, a epidemia de TB no Brasil tornou – se realidade na maior parte das grandes cidades brasileiras e não demorou em se tornar um importante problema de saúde pública (Campos e Pianta, 2001; Maciel et al., 2012). Apesar de sabermos da existência de TB no continente americano antes da chegada dos exploradores europeus (Salo et al., 1994; Arriaza et al., 1995), as viagens exploratórias europeias foram devastadoras em relação à dispersão da TB no continente (Herberg et al., 2008; Gagneux, 2012). Essas viagens foram tão hostis no que se refere à dispersão das linhagens chamadas modernas que ofuscaram a contribuição das linhagens antigas no estabelecimento da epidemia (Hersberg et al., 2008).

A cidade do Rio de Janeiro foi capital do país entre 1763 e 1960. Tornou-se o principal centro comercial no século XVIII e como consequência sofreu maciça urbanização (Fragoso e Florentino, 2001). No entanto, este crescimento urbano não foi acompanhado por uma adequada política de higiene pública (Espinoza, 2008). As doenças infecciosas são ditas como uma penalidade para a vida urbana e para a alta densidade populacional (Dye e Williams, 2010), e a TB, especialmente, estava associada à pobreza, a falta de higiene e má nutrição, além do ar abafado inalado pelos que moravam em lugares superpopulosos da época (Sheppard, 2001; Maciel et al., 2012). A alta frequência de infecção observada em indivíduos enterrados na INSC está de acordo com estimativas de mortalidade por TB durante o Brasil Império. Aproximadamente de 1 para cada 150 habitantes morria de TB, segundo alguns autores (Campos e Pianta, 2001; Maciel et al., 2012). Hijjar e colaboradores (2007) descrevem que no final do século XIX e início do século XX, morriam metade dos indivíduos acometidos por TB (Hijjar et al., 2007).

A faixa etária da maioria dos indivíduos com resultados positivos para MTC no sítio INSC era adulta com menos de 30 anos (60%). Estes resultados estão de acordo com dados atuais da OMS (2011a) que demonstram que a TB ocorre com mais frequência em indivíduos do sexo masculino e afeta principalmente adultos na idade economicamente produtiva, com cerca de 2/3 dos casos entre 15 e 59 anos (OMS, 2011a). Os resultados deste sítio arqueológico nos permitem sugerir que

estes indivíduos sofriam de doença pulmonar ativa, principalmente pelo fato de que a maioria dos resultados positivos foi identificada em amostras de sedimento pulmonar e costelas (68%). Além disso, as amostras ósseas provenientes do sítio INSC não apresentaram lesões ósseas sugestivas da doença. Segundo Rollo e colaboradores (2006) as manifestações de doenças em ossos, ou lesões ósseas, são geralmente expressões de doenças crônicas, desta maneira esqueletos sem sinais ósseos pertencem a indivíduos saudáveis ou que morreram de doença aguda. O indivíduo doente por TB pulmonar aguda deve morrer antes que ocorra uma resposta óssea (Rollo et al., 2006). Entretanto, a ausência de patologia visível não impede a recuperação de biomarcadores para TB (Mays et al., 2002). Estudos anteriores demonstram a recuperação de aDNA de MTC em ossos que não apresentam lesões sugestivas de TB (Baron et al., 1996; Zink et al., 2001; Muller et al., 2014) e esta detecção pode sugerir se a infecção foi localizada ou disseminada (Donoghue e Spigelman, 2006). Ortner e Putshar (1981) estimaram que apenas 3% das pessoas que morriam de TB na Europa durante o século XIX apresentavam lesões ósseas. A doença pulmonar é a manifestação clínica mais comum da TB (Gagneux, 2012), caracterizada pela presença de micobactérias em lesões calcificadas no pulmão, peculiaridade essa que pode contribuir na preservação do DNA residual da bactéria (Rollo et al., 2006). Nossos resultados demonstram ainda que amostras de sedimento de pulmão são importante fonte de material orgânico para a recuperação de aDNA de micobactérias em remanescentes humanos, e deve ser considerado no momento da coleta.

A detecção da infecção por bactérias do MTC em ossos que normalmente não são acometidos pela micobactéria ocorreu neste estudo. Ossos do crânio e um fragmento do íleo/sacro demonstraram estar infectados por bactérias do MTC. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a recuperação de aDNA em amostras ósseas do crânio e do tarso (pé) em remanescentes humanos do Egito datados de 3.000 a 2.000 a.C. (Zink et al., 2001), e do fêmur e dentes de indivíduos provenientes de sítios arqueológicos da Europa, datados dos séculos II-IV e XVIII-XIX, respectivamente (Muller et al., 2014). O osso esterno, as costelas e as vértebras são regiões especialmente suscetíveis à infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, devido a sua alta concentração de células hematopoiéticas e a vascularidade (Ortner e Putschar, 1981). Entretanto, qualquer osso do corpo pode ser acometido pela micobactéria (Zumla et al., 2013) e a

disseminação por via hematológica da micobactéria pode ocorrer a partir de focos de tecidos moles (Donoghue, 2011).

Por ser o único cemitério de escravos novos na América conhecido até o momento (Liryo et al., 2011) o Cemitério dos Pretos Novos (CPN) se apresenta como uma oportunidade única de se estudar a cultura Africana e as etnias trazidas para a América, assim como, as doenças que foram trazidas por essas populações. Os enterramentos humanos encontrados em 1996 durante as obras em uma casa na região da Gamboa foram descritos como enterramentos secundários (Machado, 2006). Este sítio se apresenta como uma grande cova, onde eram enterrados corpos de escravos africanos que chegavam mortos nos navios negreiros, que morriam assim que desembarcavam na cidade, ou nos primeiros dias em que estavam nos mercados de escravos, durante o período de “quarentena” de oito dias (Pereira, 2010). O CPN foi criado em 1769 pelo Marquês de Lavradio, por conta da transferência do porto de desembarque dos escravos do cais da Praça XV para o cais do Valongo (Mendonça de Souza et al., 2012). Essa transferência ocorreu principalmente pelos discursos higienistas que começavam a ganhar espaço na época (Medeiros, 2012) e pela proibição do comércio de escravos nas ruas principais (Marques, 2010). Assim, os escravos desembarcariam em um porto alternativo e não iam ser vistos pela população no estado lastimável em que desembarcavam (Pereira, 2010).

A preservação do material orgânico do sítio CPN foi pobre. Os corpos eram enterrados em valas comuns, que eram necessariamente retrabalhadas para receberem mais corpos (Medeiros, 2012). Porquanto, o remanejamento dos corpos e distúrbio dos enterros ocorreram *peri-mortem*. Os esqueletos foram descobertos durante obras em uma casa, o que provavelmente causou mais danos ao material. Além disso, as condições de armazenamento do material no acervo do IAB, em sacolas plásticas, a temperatura ambiente e sem o uso de equipamentos de proteção individual durante a coleta e manipulação dos ossos, não foram apropriadas e podem ter prejudicado a preservação do aDNA. Durante o processamento do material ósseo no laboratório, para análise de aDNA, foram visualizadas regiões com colorações que variaram do castanho claro ao branco na superfície dos ossos, assim como pontos pretos em seu interior. Um estudo bio-antropológico anterior demonstrou alterações macro e microscópicas nos ossos do CPN devido ao processo de cremação (Machado, 2006). A cremação é definida

como a redução de cadáver através da queima (Duncan et al., 2008); e o grau de alteração provocado está ligado: (i) ao tempo de exposição, (ii) se o osso estava protegido por tecido no momento da queima (Gonçalves et al., 2011) e (iii) da disponibilidade de oxigênio (Walker et al., 2008). Os indivíduos enterrados no CPN não foram cremados até o estágio de cinzas. As alterações observadas por Machado (2006) indicam uma queima parcial dos corpos a temperaturas que variam entre 525°C e 800°C; e tanto a ausência como a presença de tecidos no momento da queima. Evidências históricas revelam que os indivíduos eram submetidos à queima, para que seus corpos reduzissem mais rapidamente ou para eliminar o cheiro da decomposição, já que eram enterrados muito próximos da superfície e permaneciam dias insepultos (Pereira, 2007; 2010). No presente estudo demonstramos a recuperação de aDNA de ossos expostos à cremação. Walker e colaboradores (2005) demonstraram que compostos orgânicos (incluindo o DNA) podem estar preservados em ossos cremados a temperaturas entre 500°C e 600°C. Adicionalmente, Brown e colaboradores (1995) demonstraram a recuperação de aDNA humano por PCR e hibridação em remanescentes humanos cremados.

A infecção por bactérias do MTC foi detectada em 25% dos indivíduos analisados do CPN. Cummins (1929) define o continente africano como “virgin soil” para a infecção por TB. E a existência de registros históricos que demonstrem a presença da doença entre africanos no momento da chegada dos colonizadores europeus à África é escassa. Entretanto, um estudo realizado por Daniel (1998), onde analisou registros médicos de dezenas de pacientes da região de Buganda, Uganda, sugere que a infecção estava bem estabelecida no continente africano no momento da chegada dos europeus. Apesar disso, se considerarmos que a TB estava presente no continente africano, em baixos níveis de endemicidade e dispersa entre os grupos populacionais, é possível que algumas etnias fossem *naïve* para a infecção. Com a visita constante de exploradores europeus no solo africano a partir do século XV, é possível que linhagens europeias de MTC tenham circulado nas populações africanas. Da mesma forma, marinheiros gregos estavam presentes na costa africana desde 200 a.C., e comerciantes árabes exploravam a costa africana muitos séculos antes dos europeus (Daniel, 1998). Stead (1998) defende que a infecção limitou-se à região norte da África e às cidades da costa, e mesmo assim a infecção era incomum. Os indivíduos encontrados no CPN apresentaram aDNA de bactérias do MTC em seus ossos. O tempo estimado desde a captura até

a chegada de um escravo africano nas Américas era entre nove e 18 meses (Pereira, 2007). Mesmo que a TB não tenha sido uma doença importante na África, eles poderiam ter adquirido a infecção ou até mesmo desenvolvido a doença durante o período de captura e transporte da África para a América. A falta de higiene e a má nutrição, além da condição de confinamento forçado nos navios negreiros (Pereira, 2007), podem ter levado ao aumento da suscetibilidade a novas infecções e ao desenvolvimento de doenças a partir de infecções pré-existentes, como por exemplo a TB (Hijjar e Procópio, 2006).

Mesmo sabendo que exploradores europeus e árabes estavam presentes em terras africanas há décadas, não se pode desconsiderar que a África é o berço do bacilo da TB. Estudos revelaram que existiu um ancestral comum a todos os membros do MTC na África, que posteriormente sofreu um gargalo evolutivo ainda em solo africano (Gutierrez et al., 2005; Comas et al., 2013). A bactéria foi levada para fora da África através das populações humanas que migraram pelo planeta e as linhagens de MTC foram se diversificando por região geográfica (Namouchi et al., 2012). A África é o único continente em que todas as seis linhagens humanas de MTC ocorrem (Hersberg et al., 2008; Gagneux et al., 2006). O presente trabalho demonstrou a infecção por MTC em indivíduos africanos trazidos para o Brasil, entretanto as linhagens/cepas que afetaram esses indivíduos não foram definidas. Os indivíduos trazidos da África trouxeram a infecção por MTC com eles, mas se foi causada pelas cepas europeias ou pelas africanas ainda não sabemos.

O sítio CPXV apresentou uma baixa frequência de infecção por MTC (7%), confirmado pelos dois alvos genéticos específicos para bactérias do MTC. Esperávamos obter mais resultados positivos para os indivíduos enterrados neste sítio, principalmente por ser este cemitério historicamente conhecido por receber corpos de pessoas que morriam das grandes epidemias de doença na cidade. Entretanto, evidências históricas revelam que a TB não era a única epidemia existente na cidade durante este período. Epidemias de febre amarela e varíola estavam presentes na população residente no Brasil colonial, assim como outras doenças como a sífilis, a doença de Chagas e as parasitoses intestinais (Maciel et al., 2012; Sheppard, 2001). É possível que esses indivíduos tenham sofrido de outras injúrias.

Outra questão acerca da baixa frequência de detecção de aDNA de MTC é a baixa preservação do material. As regras para a coleta paleogenética foram seguidas durante a manipulação dos corpos no sítio INSC. O uso de equipamentos de proteção individual por todos os membros da equipe, bem como o uso de ferramentas e material estéril e descartável foi utilizado. Todo material orgânico coletado foi conservado a 4°C e mantido a esta temperatura até a chegada ao laboratório, onde foi conservado a -20°C até o momento do seu processamento. O material arqueológico proveniente dos sítios CPXV e CPN fazem parte do acervo do Instituto de Arqueologia Brasileira, na qual passou pelo processo de curadoria museológica. Neste processo, todo o sedimento e material orgânico proveniente do sítio arqueológico é retirado da superfície óssea e descartado. Geralmente o material ósseo é lavado. Além disso, a coleta, o armazenamento e a análise bio-antropológica clássica foram realizadas no final da década de 1990. Durante este período, os cuidados com a contaminação, controle de temperatura e preservação do aDNA no material arqueológico não eram rotina, apenas a proteção contra luz era realizada. Um estudo realizado por Pili e colaboradores (2013) demonstra que o perfil genético de amostras armazenadas em coleções (manipuladas) foi incompleto, ou ambíguo, comparado ao perfil de amostras não manipuladas (“*virgin samples*”).

Um aspecto a ser considerado para a detecção de uma maior frequência de infecção por TB no sítio INSC é o uso de amostras de sedimentos associados ao sítio de infecção. A amostra óssea utilizada para as análises paleogenéticas no CPN foi o fêmur, um osso que normalmente não é acometido pela micobactéria. Baron e colaboradores (1996) detectaram aDNA de bactérias do MTC em amostras de fêmur de indivíduos datados do século XIX, demonstrando que qualquer agente infeccioso carregado ao osso pela corrente sanguínea pode ser detectado por técnicas moleculares. Assim como Muller e colaboradores (2014), que demonstraram a presença de aDNA dessas bactérias em amostras de fêmur de remanescentes humanos datadas do século XVIII - XIX da Europa. Esses dados sugerem que ocorreu a disseminação da bactéria pela corrente sanguínea. Possivelmente uma doença disseminada ou sepse pode ter acometido esses indivíduos. O fêmur é composto principalmente de material compacto, com pouco componente esponjoso (Misner et al., 2009). Além disso, são ossos mais espessos, que preservam melhor o DNA do que os ossos mais finos (Quincey et al., 2013). No CPXV foram escolhidos ossos que são usualmente acometidos por essas bactérias, como costelas e

vértebras. Mesmo assim, foi observada uma baixa frequência de infecção, provavelmente porque costelas apresentam osso compacto apenas no córtex, sendo a maior parte compostas por osso tipo esponjoso (Misner et al., 2009).

A preservação do material orgânico no sítio INSC foi superior aos demais sítios arqueológicos analisados. Foram coletadas amostras principalmente de enterramentos primários, os indivíduos não haviam sido perturbados conservando a posição original do enterramento. A coleta paleogenética foi realizada, permitindo a recuperação do material orgânico sem contaminações. Misner e colaboradores (2009) observaram que amostras provenientes de um mesmo sítio arqueológico, expostas às mesmas condições climáticas, período de tempo, temperatura, precipitação, e condições do solo em geral demonstraram resultados divergentes para a recuperação do aDNA. Eles atribuíram à presença de micro – habitats envolvendo os corpos, com características únicas de pH e composição de sais, que poderiam ter atuado de diferentes formas na preservação dos esqueletos. A preservação de material orgânico na cidade do Rio de Janeiro é prejudicada pelas características climáticas da região. A cidade do Rio de Janeiro apresenta clima tropical, com uma temperatura média anual de 22°C (INMET, 2013), umidade de 79% (INMET, 2013) e pluviosidade que varia de 1.000 a 1.600 mm (Dereczynski et al., 2009). Sítios arqueológicos localizados em regiões com clima quente, como o deserto do Atacama (Arriaza et al., 1995), ou frio extremo como o solo congelado (*permafrost*) (Barnes et al., 2002), e com uma baixa umidade (Eglinton e Logan, 1991) apresentam condições propícias para uma excelente preservação do material orgânico, provavelmente por impedir a ação imediata das enzimas endógenas responsáveis pela degradação inicial do material.

#### **4.2 Parasitos intestinais**

Estudos paleoparasitológicos têm sido realizados em amostras humanas do Brasil datadas do período pré – Colombiano (Araújo et al., 1981; Ferreira et al., 1980; Gonçalves et al., 2003; Iñiguez et al., 2003; Leles et al., 2008). Entretanto, resultados demonstrando o padrão de infecção por parasitos intestinais nas populações humanas no Brasil colonial são escassos. Estudos anteriores demonstraram a presença de ovos de *Trichuris trichiura* e Trichostrongylidae em sítios arqueológicos de Minas Gerais e Piauí, (Confalonieri et al., 1981; Araujo et al.,

1984), e aDNA de *Ascaris* sp. e *Trichuris trichiura* no Rio de Janeiro (Leles, 2010a) datados do período colonial.

Através da análise paleoparasitológica, este estudo demonstrou que a frequência de infecção por parasitos intestinais em remanescentes humanos dos sítios CPXV e INSC foi de 80% e de 11,8%, respectivamente. O objetivo deste trabalho foi investigar o status saúde/doença dos indivíduos através da avaliação da infecção por parasitos intestinais. Considerando que na maioria dos casos, as infecções por *T. trichiura* e *Ascaris* sp. são leves e clinicamente benignas (Rey, 2008), podemos admitir que a população do Rio de Janeiro estava sob risco de contrair a infecção por esses nematoides. Do ponto de vista médico e social, as infecções parasitárias representam importantes problemas de saúde pública que ameaçam o bem – estar e a vida da população, redução da produtividade ou incapacitação para o trabalho (Rey, 2008).

Os nematoides *Ascaris* sp. e *T. trichiura* foram detectados nos dois sítios analisados, INSC e CPXV. As infecções por *Ascaris* sp. e *T. trichiura* são conhecidas por ocorrerem simultaneamente, devido à similaridades no modo de transmissão, grande fertilidade dos helmintos e semelhante resistência dos ovos ao meio exterior (Rey, 2008). A infecção por esses nematoides normalmente refletem as pobres condições sanitárias e de higiene em que vivem uma população (Bouchet et al., 2003). *Ascaris* sp. e *T. trichiura* existiram nas Américas antes da chegada dos exploradores europeus (Gonçalves et al., 2003; Leles et al., 2010b). Entretanto, essas parasitoses se tornaram um dos principais problemas de saúde pública após a chegada dos colonizadores ao Novo Mundo (Le Bailly et al., 2006). A cidade do Rio de Janeiro foi capital da colônia portuguesa e tornou – se o principal centro comercial no século XVIII (Fragoso e Florentino, 2001). O crescimento desenfreado da cidade e de sua população não foi acompanhado por um planejamento urbano nem por uma adequada política de higiene pública (Espinoza, 2008), o que tornou a cidade mais propensa à transmissão de microorganismos causadores de doenças relacionados à pobreza, à aglomeração e às míseras condições sanitárias.

Os sítios arqueológicos objetos deste estudo são da mesma cidade e mesmo período. Considerando somente estes aspectos, seria esperado que os indivíduos apresentassem mesma diversidade e prevalência de infecção por parasitos intestinais. Uma similar diversidade de parasitos foi observada (*Ascaris* sp. e *T.*

*trichiura*) o que indica que a infecção por esses parasitos era amplamente distribuída no Rio de Janeiro durante o período colonial. Apesar disso, um menor número de ovos foi observado nos indivíduos do sítio INSC. Este fato pode ser explicado pelas melhores condições de vida em que viviam as pessoas enterradas na INSC. Evidências históricas reforçam o conceito de que a classe eclesiástica e indivíduos católicos, com certa posição social e recursos financeiros para arcar com as despesas do sepultamento, eram enterrados nas igrejas (Pereira, 2010). Dados gerados neste estudo comprovam a ancestralidade europeia dos indivíduos provenientes de enterramentos primários deste sítio arqueológico. Ainda, no sítio INSC, foram utilizadas três técnicas parasitológicas de concentração parasitária, na tentativa de obter um diagnóstico mais completo. Entretanto, um menor número de ovos e menor abundância média de infecção foram observados.

Neste trabalho foi observado um número maior de ovos de *T. trichiura* em relação à de *Ascaris* sp., representando uma maior abundância e intensidade médias. Este resultado está de acordo com trabalhos anteriores que demonstram que ovos de *Ascaris* sp. são menos frequentemente encontrados em sítios arqueológicos da América do Sul quando comparados aos ovos de *T. trichiura*, que tem uma ampla distribuição por todo o Novo Mundo (Gonçalves et al., 2003; Leles et al., 2010b). Além disso, tem sido discutido sobre a pobre preservação dos ovos de *Ascaris* sp. em relação ao de *Trichuris trichiura* em material arqueológico (Leles, 2010a). Essa diferença pode ser explicada pelos fatores tafonômicos e ambientais existentes nas regiões tropicais que não favorecem a preservação da estrutura dos ovos (Leles et al., 2010b), entretanto esses fatores poderiam afetar os ovos dos dois parasitos igualmente. Ou por alguma característica inerente aos ovos, como por exemplo, a diferença na espessa casca dos ovos de *Ascaris* sp. e *T. trichiura*.

A presença de ovos de *Trichuris trichiura* e *Ascaris* sp. em amostras de sedimentos da região sacral de indivíduos enterrados no sítio INSC confirmam os resultados obtidos em um estudo anterior que demonstrou, através da abordagem paleogenética, a presença de aDNA desses parasitos em amostras da região sacral de indivíduos enterrados neste sítio arqueológico. O estudo de Leles (2010a) demonstrou pela técnica da Hibridação de aDNA total uma frequência de infecção de 83,3% e 50% para *Ascaris* sp. e *T. trichiura*, respectivamente; entretanto não encontra os ovos dos parasitos pela microscopia.

Considerando a natureza das amostras de sedimentos sacrais do sítio CPXV, que foram retirados dos forames do sacro de restos esqueléticos submetidos à curadoria museológica, pôde-se observar um grande número de indivíduos infectados por parasitos intestinais. Este dado sugere ainda, que a prevalência observada de 80% pode estar subestimada. Se tivéssemos tido acesso ao sedimento sacral original da região abdominal desses indivíduos, ou aos coprólitos, coletados diretamente do enterramento no sítio arqueológico, provavelmente, a prevalência, carga e/ou diversidade parasitária seriam ainda maiores aos observados.

Foi encontrado um ovo da família Taeniidea, que atribuímos a um ovo de *Taenia* sp., em um indivíduo proveniente do sítio CPXV. Este parasito nunca foi encontrado em material fecal humano do Novo Mundo datado do período pré – Colombiano (Gonçalves et al., 2003), já que a introdução dos hospedeiros intermediários gado e suíno, para *T. saginata* e *T. solium* respectivamente, ocorreu após a viagem dos exploradores europeus às Américas. Estudos paleoparasitológicos têm demonstrado a presença de ovos de taenídeos em material zooarqueológico da Argentina (Beltrame et al., 2010; 2011), atribuídos ao gênero *Echinococcus*. Entretanto, taenídeos humanos nunca foram encontrados.

Este trabalho descreve a utilização de um painel molecular para o diagnóstico das principais parasitoses intestinais humanas, que inclui a detecção de aDNA de *Ascaris* sp., *T. trichiura*, *S. stercoralis* e *E. vermicularis*. Interessantemente, nós observamos ovos de parasitos pela microscopia em amostras negativas para aDNA, e *vice – versa*. A ausência de correspondência observada entre as duas abordagens pode ser explicada pelo fato de serem visualizados ovos quebrados ou deformados através da microscopia, assim como não é incomum nos deparamos com ovos sem conteúdo em seu interior. Entretanto, a detecção de aDNA deste tipo de amostra com resultado paleoparasitológico positivo fica prejudicada.

No presente trabalho, foi detectada a presença de aDNA de *E. vermicularis* em 50% dos indivíduos do sítio CPXV, entretanto, não foram visualizados ovos deste parasito através da microscopia. Este dado sugere que as condições tafonômicas e ambientais da cidade afetam mais os ovos de *E. vermicularis* do que de *Ascaris* sp. e *T. trichiura*, possivelmente porque apresentam membrana proteica mais resistente. Além disso, considerando seu ciclo de vida, as fêmeas grávidas de *E. vermicularis*

ovipõem ou ficam ressecadas e rompem na região perianal (Rey, 2008). Muitas vezes, os ovos não são visualizados em exames parasitológicos convencionais, necessitando de testes, como o da fita gomada (técnica de Graham), para concluir o diagnóstico. Mesmo utilizando técnicas de enriquecimento, o exame parasitológico revela apenas 5 a 10% dos casos de parasitismo (Rey, 2008). A análise molecular pode auxiliar na diferenciação dos táxons ou confirmar o diagnóstico paleoparasitológico, até na ausência de remanescentes estruturais visíveis (Cleeland et al., 2013). Estudos anteriores têm realizado o diagnóstico molecular mesmo sem a visualização prévia de formas parasitárias (Iñiguez et al., 2003; 2006; Leles, 2010a). O estudo corrobora a importância do uso de uma abordagem combinada, a qual envolve técnicas paleoparasitológicas e paleoparasitológicas moleculares, para confirmar e complementar o diagnóstico dos parasitos intestinais em populações do passado.

#### **4.3 Ancestralidade Humana**

O estudo dos marcadores genéticos, especialmente o mtDNA, tem permitido reconstruir importantes eventos da história humana (Der Sarkissian et al., 2013). A história genética das populações americanas é influenciada principalmente pelas migrações das populações nos últimos séculos. A população brasileira, por exemplo, é uma das mais heterogêneas do mundo, produto da mistura entre três grupos ancestrais: nativos americanos, colonizadores europeus e escravos africanos (Alves-Silva et al, 2000; Ascunce et al., 2013). Durante o período colonial brasileiro, o Rio de Janeiro foi uma grande porta de entrada para o país quando recebeu em seu porto centenas de milhares de imigrantes. É estimado que aproximadamente 500.000 portugueses migraram para o Brasil após a vinda da família real portuguesa, em 1808 (Fragoso e Florentino, 2001), e não menos do que 10 milhões de africanos foram trazidos para as Américas desde o século XV até o XIX (Fragoso e Florentino, 2001; Hunemeier et al., 2007). Após cinco séculos de mistura entre nativos americanos, europeus, africanos e asiáticos, as atuais populações das Américas apresentam uma grande heterogeneidade genética (Ascunde et al., 2013).

As análises de ancestralidade nos indivíduos enterrados no sítio INSC demonstraram uma grande variedade de haplogrupos encontrados. Nos enterramentos primários foram recuperados exclusivamente haplogrupos europeus.

Estes resultados estão de acordo com evidências históricas que demonstram que na Europa, a partir do século IV, os reis passariam a ser enterrados nas igrejas (Medeiros, 2012); e as pessoas de certa posição social, que pudessem arcar com as despesas do sepultamento, também poderiam ter esse privilégio (Pereira, 2010). O catolicismo se impôs como uma religião inumista (Medeiros, 2012). No Brasil colonial, não existiam cemitérios, os corpos das pessoas católicas eram enterrados dentro das igrejas. Considerando que a INSC foi capela real e catedral da cidade após a chegada da família real portuguesa para o Brasil e era frequentada por grupos mais abastados da sociedade, é esperado encontrar haplogrupos europeus nos indivíduos analisados. Os haplogrupos encontrados no sítio INSC estão de acordo com estudos anteriores que demonstram a alta variabilidade de haplogrupos europeus.

Os haplogrupos Ameríndios (haplogrupo C) e Africano (haplogrupo L), identificados em indivíduos provenientes de enterramentos secundários do sítio INSC podem ser explicados pelo fato desses corpos terem sido encontrados em uma região originalmente localizada fora da igreja original. A INSC sofreu diversas reformas desde sua construção original, inclusive foi parcialmente destruída durante uma festa paroquial (Dias, 2008). E indivíduos que não tinham recursos para arcar com os sepultamentos no interior das igrejas, eram enterrados na parte exterior (Pereira, 2010).

O Brasil suportou uma das maiores diásporas humanas conhecidas (Mendonça de Souza et al., 2012). No contexto brasileiro, o Rio de Janeiro foi a grande capital da empresa escravista (Mendonça de Souza et al., 2012), já que seus portos receberam cerca de 40% dos africanos vindos para o país (Fragoso e Florentino, 2001). Evidências históricas revelam que 95% dos indivíduos enterrados no CPN eram de origem africana (Pereira, 2007). Foram identificados diferentes haplótipos africanos nos indivíduos enterrados neste sítio arqueológico. Era esperado que um cemitério conhecido por receber corpos de escravos africanos apresentasse indivíduos com ancestralidade africana.

No sítio CPN foi possível identificar o haplótipo em três indivíduos (L1c2, L3d1 e L3e2). Os haplogrupos L3e e L3d são os mais frequentemente encontrados na África Ocidental e Central (Salas et al., 2004). O haplogrupo L3d ocorre na atual população brasileira afrodescendente com uma frequência de 10% (Alves-Silva et

al., 2000). O haplótipo L3d1 está presente nos países africanos Etiópia, Angola, Senegal e Zambia e já foi descrito na atual população afrodescendente brasileira (Alves-Silva et al., 2000; Salas et al., 2004); assim como o L3e2 (Alves-Silva et al., 2000; Gonçalves et al., 2008). O haplogrupo L1c é característico da população da África Central (Harich et al., 2010). O haplótipo L1c2 nunca foi descrito na população brasileira, e é restrito à população de Angola (Plaza et al., 2004). Os resultados estão de acordo com estudos anteriores baseados na atual população brasileira na qual demonstra que os haplogrupos L3e e L1c são o segundo e terceiro mais frequentes encontrados em afrodescendentes brasileiros, respectivamente (Gonçalves et al., 2008). Esses haplogrupos juntos constituem 49% de toda a fração africana no Brasil, e é sugerido que eles podem ter uma origem na África Ocidental e Central (Alves-Silva et al., 2000; Salas et al., 2004; Hunemeier et al., 2007).

As linhagens africanas podem ser atribuídas às viagens e diferentes origens geográficas. Os haplótipos de mtDNA determinados neste estudo corroboram a pesquisa histórica e estudos anteriores, que demonstram que a principal fonte de migração africana para o Brasil se originou da África Central e Ocidental. As análises do livro de registro de óbitos da freguesia de Santa Rita revelam que quase 70% dos indivíduos enterrados no CPN eram de países da África Central e Ocidental, incluindo: Cabinda, Angola, Benguela, Luanda e Moçambique (Pereira, 2007). Estudos anteriores analisando as modificações dentárias intencionais (Liryo et al., 2011), as concentrações de estrôncio em dentes (Bastos et al., 2010) e as práticas de higiene dentárias (Cook et al., 2012) em indivíduos enterrados no CPN confirmaram a origem africana dos indivíduos. As práticas de modificações dentais intencionais, assim como as de higiene oral, estão ambas relacionadas aos cuidados com a saúde (Cook et al., 2012). As análises sobre o padrão dessas modificações, realizadas por Liryo e colaboradores (2011), revelaram 13 tipos de modificações dentais para os indivíduos de dois cemitérios do Brasil, incluindo o CPN; e a forma e acabamento esmerados das modificações são característicos africanos. Estes dados confirmam a diversidade étnica dos escravos trazidos para o Brasil. Entretanto, a tentativa de associar tipos de modificação dentária com etnias específicas não foi bem sucedida (Liryo et al., 2011).

No sítio CPXV foi identificada uma variedade de haplogrupos, incluindo representantes dos três grandes grupos de ancestralidade: nativos americanos, europeus e africanos. Estes resultados são esperados e estão de acordo com

evidências históricas que sugerem que este cemitério era utilizado para enterrar pessoas da população geral da cidade, que morriam durante as grandes epidemias que assolaram a cidade.

## 5 CONCLUSÕES

- A tuberculose era amplamente distribuída na cidade do Rio de Janeiro durante o período colonial.
- Existiu uma forte contribuição de indivíduos de ancestralidade europeia para a dispersão ou pelo menos para a manutenção da tuberculose na cidade.
- Escravos africanos chegaram á cidade do Rio de Janeiro infectados por bactérias do MTC, logo a África não era “*virgin soil*” para a tuberculose.
- A ancestralidade matrilinear africana foi geneticamente confirmada nos indivíduos denominados “Pretos Novos” provenientes da África.
- A infecção pelos parasitos *Trichuris trichiura*, *Ascaris* sp., *Taenia* sp. e *Enterobius vermicularis* estava presente na população do Rio de Janeiro no período colonial brasileiro.
- Possivelmente, as melhores condições de vida em que viviam a população enterrada no sítio INSC refletem a baixa prevalência de infecção por parasitos intestinais comparada ao sítio CPXV.
- Pela primeira vez é demonstrada a infecção por *Enterobius vermicularis* em sítios arqueológicos do Brasil.
- Pela primeira vez é demonstrada a infecção por *Taenia* sp. em sítios arqueológicos do Brasil.
- A hibridação de aDNA mostrou ser uma técnica útil no diagnóstico da tuberculose e parasitoses intestinais em amostras arqueológicas com baixa conservação de material genético.
- Foi possível recuperar aDNA humano e de micobactérias de amostras ósseas submetidas ao processo de cremação.
- A recuperação de formas parasitárias e aDNA de parasitos intestinais foi possível mesmo após a realização de curadoria museológica em remanescentes esqueléticos.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achilli A, Rengo C, Magri C, Battaglia V, Olivieri A, Scozzari R et al. The molecular dissection of mtDNA haplogroup H confirms that the Franco-Cantabrian glacial refuge was a major source for the European gene pool. *Am J Hum Genet.* 2004;75(5):910-918.
- Adékambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54(Pt 6):2095-2105.
- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, Gey van Pittius NC. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(8):1296-9.
- Allison M, Gerszten E, Munizaga J, Santoro C, Mendoza D. Tuberculosis in pre-Columbian andean populations. In: JE Buikstra, editor. *Prehistoric Tuberculosis in the Americas*. Evanston: Northwestern University Archaeological Program; 1981. p. 49-61.
- Allison M, Mendoza D, Pezzia M. Documentation of a case of tuberculosis of pre-Columbian America. *Am Rev Resp Dis.* 1973;107:985-991.
- Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000;67(2):444-461.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981; 290(5806):457-465.
- Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet.* 1999;23(2):147.
- Araújo A, Reinhard K, Ferreira LF, et al. Paleoparasitology: the origin of human parasites. *Arq Neuropsiquiatr.* 2013;71(9B):722-6.

- Araujo A, Reinhar KJ, Ferreira LF, Gardner SL. Parasites as probes for prehistoric human migrations? Trends Parasitol. 2008;24(3):112-115.
- Araújo A, Jansen AM, Bouchet F, Reinhard K, Ferreira LF. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(Suppl 1):5-11.
- Araujo A, Ferreira LF, Confalonieri U, Chame M. Hookworms and the peopling of America. Cad Saude Pub. 1988;2(4): 226-233.
- Araujo A, Confalonieri U, Ferreira LF. Encontro de ovos de Trichostrongylidae e *Trichuris trichiura* em corpo mumificado do período colonial brasileiro. Rev Centr Cienc Biol Saúde. 1984;1:11-16.
- Araujo A, Ferreira LF, Confalonieri U. A Contribution to the Study of Helminth Findings in Archaeological Material in Brazil. Rev Brasil Biol. 1981;41(4):873-881.
- Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA. Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. Am J Phys Anthropol. 1995;98(1):37-45.
- Ascunce MS, Fane J, Kassu G, Toloza AC, Picollo MI, González-Oliver A et al. Mitochondrial diversity in human head louse populations across the Americas. Am J Phys Anthropol. 2013;152(1):118-129.
- Barnes E. Diseases and Human Evolution. 1. ed. USA: University of New Mexico Press; 2005.
- Barnes I, Matheus P, Shapiro B, Jensen D, Cooper A. Dynamics of Pleistocene population extinctions in Beringian brown bears. Science. 2002;295(5563):2267-2270.
- Baron H, Hummel S, Herrmann B. *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA in Ancient Human Bones. J Arch Sc. 1996;23:667–671.
- Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrh S, Flynn J et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. Nat Rev Microbiol. 2009;7(12):845-855.
- Bastos MQR, Mendonça de Souza S, Cook DC, Rodrigues-Carvalho C, Santos RV. Da África ao Cemitério dos Pretos Novos, Rio de Janeiro: Um estudo sobre as

origens de escravos a partir da análise de isótopos de estrôncio no esmalte dentário. Rev Arqueol. 2010;24(1):88-97.

Beltrame MO, Fugassa MH, Sardella NH, Civalero MT, Aschero C. Raptor pellets as zooarchaeological material for paleoparasitological studies in Patagonia. J Arch Sc. 2011;38:1511–1515.

Beltrame MO, Fugassa MH, Sardella NH. First paleoparasitological results from late Holocene in Patagonian coprolites. J Parasitol. 2010;96(3):648-651.

Boattini A, Castrì L, Sarno S, Useli A, Cioffi M, Sazzini M et al. mtDNA variation in East Africa unravels the history of Afro-Asiatic groups. Am J Phys Anthropol. 2013;150(3):375-385.

Bonatto SL, Salzano FM. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(5):1866-1871.

Bouchet F, Guidon N, Dittmar K, Harter S, Ferreira LF, Chaves SM et al. Parasite Remains in Archaeological Sites. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(Suppl. I):47-52.

Bouchet F. Helminth eggs: trace elements of neolithic and paleolithic parasitosis on French sites. C R Seances Soc Biol Fil. 1997;191(4):529-536.

Bouwman AS, Kennedy SL, Müller R, Stephens RH, Holst M, Caffell AC et al. Genotype of a historic strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(45):18511-18516.

Braun M, Cook DC, Pfeiffer S. DNA from *Mycobacterium tuberculosis* Complex Identified in North American, Pre-Columbian Human Skeletal Remains. J Arch Sc. 1998;25:271–277.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99(6):3684-3689.

Brown KA, O'Donoghue K, Brown TA. DNA in Cremated Bone from an Early Bronze Age Cemetery Cairn. Int J Osteoarchaeol. 1995;5:181-187.

- Brown TA, Brown KA. Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *Bioessays*. 1994;16(10):719-726.
- Callen EO, Cameron TWM. A prehistoric diet revealed in coprolites. *New Sci*. 1960;8:35-40.
- Campos R, Pianta C. Tuberculose: histórico, epidemiologia e imunologia, de 1990 a 1999, e co-infecção TB/HIV, de 1998 a 1999, Rio Grande do Sul – Brasil. *Bol da Saúde*. 2001;15(1):61-71.
- Caws M, Thwaites G, Dunstan S, Hawn TR, Lan NT, Thuong NT. The influence of host and bacterial genotype on the development of disseminated disease with *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2008;4(3):e1000034.
- Chame M, Sianto L. Diagnóstico de Coprólitos, ou quem fez o coprólito? In: Ferreira LF, Araújo A, Reinhard K, editores. *Fundamentos da Paleoparasitologia*. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2011. p. 263-281.
- Chilvers ER, Bouwman AS, Brown KA, Arnott RG, Prag AJNW, Brown TA. Ancient DNA in human bones from Neolithic and Bronze Age sites in Greece and Crete. *J Archaeol Sci*. 2008;35:2707-2714.
- Cleeland LM, Reichard MV, Tito RY, Reinhard KJ, Lewis CM Jr. Clarifying Prehistoric Parasitism from a Complementary Morphological and Molecular Approach. *J Archaeol Sci*. 2013;40(7):3060-3066.
- Cockburn TA; Cockburn E; Reyman TA. *Mummies, Disease and Ancient Cultures*. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
- Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet*. 2013;45(10):1176-1182.
- Comas I, Gagneux S. A role for systems epidemiology in tuberculosis research. *Trends Microbiol*. 2011;19(10):492-500.
- Comas I, Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000600.
- Confalonieri UE, Araújo A, Ferreira LF. *Trichuris trichiura* infection in Colonial Brazil. *Paleopathol News*. 1981;35:13-14.

- Cook DC, Bastos MQR, Lopes C, Mendonça de Souza S, Santos RV. Pretos Novos: Evidence for African Oral Hygiene Practices in Brazil, 1769–1830. *Int J Osteoarchaeol*. 2012: In Press.
- Crubézy E, Ludes B, Poveda JD, Clayton J, Crouau-Roy B, Montagnon D. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *C R Acad Sci III*. 1998;321(11):941-951.
- Cummins SL. “Virgin soil” and After: A working conception of tuberculosis in children, adolescents, and aborigines. *Brit Med Journ*. 1929;2:39-41.
- Daniel TM. Robert Koch and the pathogenesis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2005;9(11):1181-2.
- Daniel TM. The impact of tuberculosis on civilization. *Infect Dis Clin North Am*. 2004;18(1):157-165.
- Daniel TM. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000;4(5):395-400.
- Daniel TM. The early history of tuberculosis in central East Africa: insights from the clinical records of the first twenty years of Mengo Hospital and review of relevant literature. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998;2(10):784-790.
- Der Sarkissian C, Balanovsky O, Brandt G, Khartanovich V, Buzhilova A, Koshelev S, Zaporozhchenko V, Gronenborn D, Moiseyev V, Kolpakov E, Shumkin V, Alt KW, Balanovska E, Cooper A, Haak W; Genographic Consortium. Ancient DNA reveals prehistoric gene-flow from siberia in the complex human population history of North East Europe. *PLoS Genet*. 2013;9(2):e1003296.
- Dereczynski CP, Oliveira JS, Machado CO. Climatologia da Precipitação no Município do Rio de Janeiro. *Ver Bras Meteorologia*. 2009;24(1):24-38.
- Dias O. Arqueologia. In: Castro M, coordenadora. Igreja Nossa Senhora do Carmo da Antiga Sé: história e restauração. São Paulo: Companhia Editora Nacional; 2008. p. 189-97.
- Donoghue HD. Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(6):821-829.

- Donoghue HD. Human tuberculosis--an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes Infect.* 2009;11(14-15):1156-62.
- Donoghue HD, Spigelman M. Pathogenic microbial ancient DNA: a problem or an opportunity? *Proc R Soc B.* 2006;273:641–642.
- Donoghue HD, Marcsik A, Matheson C, Vernon K, Nuorala E, Molto JE et al. Co-infection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* in human archaeological samples: a possible explanation for the historical decline of leprosy. *Proc Biol Sci.* 2005;272(1561):389-394.
- Dorrnsoro I, Torroba L. Microbiology of tuberculosis. *An. Sist. Sanit. Navar.* 2007;30(Supl. 2):67-84.
- Drancourt M, Raoult D. Paleomicrobiology: Current Issues and Perspectives. *Nature Reviews.* 2005;3:23-35.
- Duncan WN, Balkansky AK, Crawford K, Lapham HA, Meissner NJ. Human cremation in Mexico 3,000 years ago. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(14):5315-5320.
- Dye C, Williams BG. The population dynamics and control of tuberculosis. *Science.* 2010;328(5980):856-861.
- Eglinton G, Logan GA. Molecular preservation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1991;333(1268):315-327.
- Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):581-591.
- Espinoza JNN. Ideias e práticas médicas: luta contra a tuberculose nas cidades de Lima e Rio de Janeiro, 1882-1919. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado] – Casa de Oswaldo Cruz, História da Ciência e da Saúde; 2008.
- Fagundes NJ, Kanitz R, Eckert R, Valls AC, Bogó MR, Salzano FM et al. Mitochondrial population genomics supports a single pre-Clovis origin with a coastal route for the peopling of the Americas. *Am J Hum Genet.* 2008;82(3):583-592.

- Fernandes V, Alshamali F, Alves M, Costa MD, Pereira JB, Silva NM et al. The Arabian cradle: mitochondrial relicts of the first steps along the southern route out of Africa. *Am J Hum Genet.* 2012;90(2):347-355.
- Ferreira LF. A conservação do material orgânico através dos tempos. In: Ferreira LF, Araújo A, Reinhard K, editores. *Fundamentos da Paleoparasitologia.* Rio de Janeiro: Fiocruz; 2011. p. 43-52.
- Ferreira LF, Araujo A, Confalonieri U. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hig.* 1980;74(6):798-800.
- Ferreira LF, Araujo A, Confalonieri U. Subsídios para a paleoparasitologia no Brasil I – Parasitos encontrados em coprólitos no município de Unaí, MG. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia; 1979; Campinas, Brasil. Campinas: Sociedade Brasileira de Parasitologia; 1979.
- Fletcher HA, Donoghue HD, Taylor GM, van der Zanden AG, Spigelman M. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* DNA from a family of 18th century Hungarians. *Microbiology.* 2003;149:143–151.
- Fragoso J, Florentino M. O arcaísmo como projeto: mercado atlântico, sociedade agrária e elite mercantil em uma economia colonial tardia. 4. ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira; 2001.
- Gagneux S. Host-pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012;367(1590):850-859.
- Gagneux S, De Riemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S et al. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(8):2869-2873.
- Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(13):7877-7882.
- Golenberg EM, Giannasi DE, Clegg MT, Smiley CJ, Durbin M, Henderson D, Zurawski G. Chloroplast DNA sequence from a miocene *Magnolia* species. *Nature.* 1990;344(6267):656-8.

- Gómez i Prat J, de Souza SM. Prehistoric tuberculosis in America: adding comments to a literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(Suppl 1):151-159.
- Gomila M, Ramirez A, Gascó J, Lalucat J. *Mycobacterium llatzerense* sp. nov., a facultatively autotrophic, hydrogen-oxidizing bacterium isolated from haemodialysis water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008;58(Pt 12):2769-2973.
- Gomila M, Ramirez A, Lalucat J. Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(12):3787-3797.
- Gonçalves D, Thompson TJU, Cunha E. Implications of heat-induced changes in bone on the interpretation of funerary behavior and practice. *J Archaeol Sci*. 2011;38(6):1308-1313.
- Gonçalves VF, Carvalho CM, Bortolini MC, Bydlowski SP, Pena SD. The phylogeography of African Brazilians. *Hum Hered*. 2008;65(1):23-32.
- Gonçalves MLC, Araujo A, Ferreira LF. Human Intestinal Parasites in the Past: New Findings and a Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(Suppl. I):103-118.
- Greenberg JH, Turner CG, Zegura SL. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetic evidence. *Curr Anthropol*. 1986;27:477-498.
- Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omaïs B, Marmiesse M et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2005;1(1):e5.
- Haas CJ, Zink A, Pálfi G, Szeimies U, Nerlich AG. Detection of leprosy in ancient human skeletal remains by molecular identification of *Mycobacterium leprae*. *Am J Clin Pathol*. 2000;114(3):428-436.
- Harich N, Costa MD, Fernandes V, Kandil M, Pereira JB, Silva NM et al. The trans-Saharan slave trade - clues from interpolation analyses and high-resolution characterization of mitochondrial DNA lineages. *BMC Evol Biol*. 2010;10:138.
- Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S et al. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol*. 2008;6(12):e311.

- Hershkovitz I, Donoghue HD, Minnikin DE, Besra GS, Lee OY, Gernaey AM et al. Detection and molecular characterization of 9,000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic settlement in the Eastern Mediterranean. PLoS One. 2008;3(10):e3426.
- Higuchi R, Bowman B, Freiberger M, Ryder OA, Wilson AC. DNA sequences from the *quagga*, an extinct member of the horse family. Nature. 1984;312:282–284.
- Hijjar MA, Gerhardt G, Teixeira GM, Procópio MJ. Retrospecto do controle da tuberculose no Brasil. Rev Saúde Pública. 2007;41(Supl.1):50-58.
- Hijjar MA, Procópio MJ. Tuberculose – Epidemiologia e Controle no Brasil. Rev Hosp Univers Pedro Ern. 2006;5:15-23.
- Hofreiter M, Serre D, Poinar HN, Kuch M, Pääbo S. Ancient DNA. Nat Rev Genet. 2001;2(5):353-359.
- Hughes AL, Friedman R, Murray M. Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis. 2002;8(11):1342-1346.
- Hunemeier T, Carvalho C, Marrero AR, Salzano FM, Junho Pena SD, Bortolini MC. Niger-Congo speaking populations and the formation of the Brazilian gene pool: mtDNA and Y-chromosome data. Am J Phys Anthropol. 2007;133(2):854-867.
- Iñiguez AM. Paleoparasitologia Molecular. In: Ferreira LF, Araújo A, Reinhard K, editores. Fundamentos da Paleoparasitologia. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2011. p. 301-16.
- Iñiguez AM, Reinhard K, Carvalho Gonçalves ML, Ferreira LF, Araújo A, Paulo Vicente AC. SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. Int J Parasitol. 2006;36(13):1419-1425.
- Iñiguez AM, Reinhard KJ, Araújo A, Ferreira LF, Vicente AC. *Enterobius vermicularis*: Ancient DNA from North and South American Human Coprolites. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(Suppl. I): 67-69.
- INMET. Instituto Nacional de Meteorologia – Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>> Acesso em 17 Dez 2013.

- Kappelman J, Alçiçek MC, Kazanci N, Schultz M, Ozkul M, Sen S. First Homo erectus from Turkey and implications for migrations into temperate Eurasia. *Am J Phys Anthropol.* 2008;135(1):110-116.
- Keller A, Graefen A, Ball M, Matzas M, Boisguerin V, Maixner F et al. New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. *Nat Commun.* 2012;3:698.
- Kemp BM, González-Oliver A, Malhi RS, Monroe C, Schroeder KB, McDonough J et al. Evaluating the Farming/Language Dispersal Hypothesis with genetic variation exhibited by populations in the Southwest and Mesoamerica. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(15):6759-6764.
- Kemp BM, Tung TA, Summar ML. Genetic continuity after the collapse of the Wari empire: mitochondrial DNA profiles from Wari and post-Wari populations in the ancient Andes. *Am J Phys Anthropol.* 2009;140(1):80-91.
- Klaus HD, Wilbur AK, Temple DH, Buikstra JE, Stone AC, Fernandez M et al. Tuberculosis on the north coast of Peru: skeletal and molecular paleopathology of late pre-Hispanic and postcontact mycobacterial disease. *J Archaeol Sci.* 2010;37:2587-2597.
- Konomi N, Lebowitz E, Mowbray K, Tattersall I, Zhang D. Detection of mycobacterial DNA in Andean mummies. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4738-4740.
- Lalremruata A, Ball M, Bianucci R, Welte B, Nerlich AG, Kun JF et al. Molecular identification of falciparum malaria and human tuberculosis co-infections in mummies from the Fayum depression (Lower Egypt). *PLoS One.* 2013;8(4):e60307.
- Le Bailly M, Gonçalves MLC, Lefèvre C, Roper DC, Pye JW, Araujo A et al. Parasitism in Kansas in the 1800s: A glimpse to the past through the analysis of grave sediments from Meadowlark cemetery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(Suppl. II): 53-56.
- Leles D. Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer, 1761). Rio de Janeiro. Tese [Doutorado] – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Saúde Pública; 2010a.

- Leles D, Reinhard KJ, Fugassa MH, Ferreira LF, Iniguez AM, Araujo A. A parasitological paradox: Why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas? 2010b. *J Archaeol Sc.* 37;7:1510–1520.
- Leles D, Araujo A, Ferreira LF, Vicente AC, Iñiguez AM. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Columbian South America times. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(1):106-108.
- Levinson W, Jawetz E. *Microbiologia Médica e Imunologia.* 7. ed. Porto Alegre: Artmed; 2001.
- Liryo A, Mendonça de Sousa S, Cook DC. Dentes intencionalmente modificados e etnicidade em cemitérios do Brasil Colônia e Império. *R Museu Arq Etn.* 2011;21:315-334.
- Maca-Meyer N, González AM, Larruga JM, Flores C, Cabrera VM. Major genomic mitochondrial lineages delineate early human expansions. *BMC Genet.* 2001;2:13.
- Macaulay V, Hill C, Achilli A, Rengo C, Clarke D, Meehan W et al. Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes. *Science.* 2005;308(5724):1034-1036.
- Machado LC. Sítio Cemitério dos Pretos Novos: Análise Biocultural. In: Dias O, Carvalho E, Zimmermann M, editores. *Estudos Contemporâneos de Arqueologia.* Palmas:UNITINS/IAB; 2006. p.11-58.
- Maciel MS, Mendes PD, Gomes AP, Siqueira-Batista R. A história da tuberculose no Brasil: os muitos tons (de cinza) da miséria. *Rev Bras Clin Med São Paulo.* 2012;10(3):226-230.
- Marota I, Rollo F. Molecular paleontology. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(1):97-111.
- Marques C. *A História da Zona Portuária.* Rio de Janeiro: Ponto de Cultura; 2010.
- Mays S, Fysh E, Taylor GM. Investigation of the link between visceral surface rib lesions and tuberculosis in a Medieval skeletal series from England using ancient DNA. *Am J Phys Anthropol.* 2002;119(1):27-36.

- Medeiros JC. Germinal: Morte e sepultamento de pretos novos no Rio de Janeiro do século XIX. *Habitus*. 2012;10(2):173-185.
- Mehta PK, Raj A, Singh N, Khuller GK. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2012;66(1):20-36.
- Mendonça de Souza S, Cook DC, Bastos MQ, Santos RV. Cemitério dos Pretos Novos: Técnicas modernas ajudam a compreender questões da escravidão. *Ciência Hoje*. 2012;49(291):22-27.
- Mendonça de Souza A. *Dicionário de Arqueologia*. Rio de Janeiro: ADESA; 1997.
- Misner LM, Halvorson AC, Dreier JL, Ubelaker DH, Foran DR. The correlation between skeletal weathering and DNA quality and quantity. *J Forensic Sci*. 2009;54(4):822-828.
- Montenegro A, Araujo A, Eby M, Ferreira LF, Hetherington R, Weaver A. Parasites, Paleoclimate, and the Peopling of the Americas. *Curr Anthropol* 2006;47(1):193-200.
- Muller R, Roberts CA, Brown TA. Biomolecular identification of ancient *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in human remains from Britain and continental Europe. *Am J Phys Anthropol*. 2014;153(2):178-89.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51(Pt 1):263-273.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia médica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
- Namouchi A, Karboul A, Fabre M, Gutierrez MC, Mardassi H. Evolution of smooth tubercle Bacilli PE and PE\_PGRS genes: evidence for a prominent role of recombination and imprint of positive selection. *PLoS One*. 2013;8(5):e64718.
- Namouchi A, Didelot X, Schöck U, Gicquel B, Rocha EP. After the bottleneck: Genome-wide diversification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by mutation, recombination, and natural selection. *Genome Res*. 2012;22(4):721-734.

- Nerlich AG, Haas CJ, Zink A, Szeimies U, Hagedorn HG. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet*. 1997;350(9088):1404.
- Organização Mundial da Saúde. Global Tuberculosis Report. Geneva: WHO, 2013.
- Organização Mundial da Saúde. Global Tuberculosis Report. Geneva: WHO, 2012.
- Organização Mundial da Saúde. Soil-transmitted helminthiases: eliminating soil-transmitted helminthiases as a public health problem in children: progress report 2001-2010 and strategic plan 2011-2020. Geneva: WHO, 2012b.
- Organização Mundial da Saúde. Global tuberculosis control report. Geneva: WHO, 2011a.
- Organização Mundial da Saúde. Helminth control in school age children: a guide for managers of control programmes. Geneva: WHO, 2011b.
- Ortner DJ, Putschar WGJ. Identification of pathological conditions in human skeletal remains. Washington DC: Smithsonian Institution Press; 1981.
- Pääbo S, Poinar H, Serre D, Jaenicke-Despres V, Hebler J, Rohland N et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annu Rev Genet*. 2004;38:645-679.
- Pääbo S. Molecular Cloning of ancient Egyptian mummy DNA. *Nature*. 1985;314:644-645.
- Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:1939-1943.
- Perego UA, Achilli A, Angerhofer N, Accetturo M, Pala M, Olivieri A et al. Distinctive Paleo-Indian migration routes from Beringia marked by two rare mtDNA haplogroups. *Curr Biol*. 2009;19(1):1-8.
- Pereira JCMS. História dos Pretos Novos. Rio de Janeiro: Ponto de Cultura; 2010.
- Pereira JCMS. À flor da terra: o cemitério dos pretos novos no Rio de Janeiro. 1. ed. Rio de Janeiro: Garamond; 2007.
- Pilli E, Modi A, Serpico C, Achilli A, Lancioni H, Lippi B et al. Monitoring DNA contamination in handled vs. directly excavated ancient human skeletal remains. *PLoS One*. 2013;8(1):e52524.

- Plaza S, Salas A, Calafell F, Corte-Real F, Bertranpetit J, Carracedo A et al. Insights into the western Bantu dispersal: mtDNA lineage analysis in Angola. *Hum Genet.* 2004;115(5):439-447.
- Poinar HN, Schwarz C, Qi J, Shapiro B, Macphee RD, Buigues B et al. Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. *Science.* 2006;311(5759):392-394.
- Poinar H, Kuch M, McDonald G, Martin P, Pääbo S. Nuclear gene sequences from a late pleistocene sloth coprolite. *Curr Biol.* 2003;13(13):1150-1152.
- Quincey D, Carle G, Alunni V, Quatrehomme G. Difficulties of sex determination from forensic bone degraded DNA: A comparison of three methods. *Sci Justice.* 2013;53(3):253-260.
- Ray S, Talukdar A, Kundu S, Khanra D, Sonthalia N. Diagnosis and management of miliary tuberculosis: current state and future perspectives. *Ther Clin Risk Manag.* 2013;9:9-26.
- Reinhard KJ, Geibb PR, Callahan MM, Hevly RH. Discovery of Colon Contents in a Skeletonized Burial: Soil Sampling for Dietary Remains. *J Archaeol Sc.* 1992;19:697-705.
- Reinhard KJ, Confalonieri UE, Herrmann B, Ferreira LF, Araújo A. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo.* 1988;37:217-239.
- REGWG (Race, Ethnicity, and Genetics Working Group). The use of racial, ethnic, and ancestral categories in human genetics research. *Am J Hum Genet.* 2005;77(4):519-532.
- Requena A. Evidencia de tuberculosis en la América Precolombina. *Acta Venezolana* 1945;1:141-164.
- Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
- Richards M, Macaulay V, Hickey E, Vega E, Sykes B, Guida V et al. Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am J Hum Genet.* 2000;67(5):1251-1276.

- Richards M, Côté-Real H, Forster P, Macaulay V, Wilkinson-Herbots H, Demaine A et al. Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am J Hum Genet.* 1996;59(1):185-203.
- Rohland N, Siedel H, Hofreiter M. A rapid column-based ancient DNA extraction method for increased sample throughput. *Mol Ecol Resour.* 2010;10(4):677-683.
- Rollo F, Ermini L, Luciani S, Marota I, Olivieri C. The study of bacterial DNA in ancient human mummies. *J Anthropol Sci.* 2006;84:53-64.
- Rollo F, Ubaldi M, Ermini L, Marota I. Otzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(20):12594–12599.
- Rothschild BM, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal GK, Greenblatt C et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis.* 2001;33(3):305-311.
- Ruffer MA. Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the twentieth dynasty. *Br Med J.* 1910;1:16.
- Salas A, Amigo J. A reduced number of mtSNPs saturates mitochondrial DNA haplotype diversity of worldwide population groups. *PLoS One.* 2010;5(5):e10218.
- Salas A, Richards M, Lareu MV, Scozzari R, Coppa A, Torroni A et al. The African diaspora: mitochondrial DNA and the Atlantic slave trade. *Am J Hum Genet.* 2004;74(3):454-465.
- Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu MV, Sobrino B, Sánchez-Diz P et al. The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet.* 2002;71(5):1082-1111.
- Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(6):2091-2094.

- Santos RV, Fry PH, Monteiro S, Maio MC, Rodrigues JC, Bastos-Rodrigues L et al. Color, race, and genomic ancestry in Brazil: dialogues between anthropology and genetics. *Curr Anthropol*. 2009;50(6):787-819.
- Sawyer S, Krause J, Guschanski K, Savolainen V, Pääbo S. Temporal patterns of nucleotide misincorporations and DNA fragmentation in ancient DNA. *PLoS One*. 2012;7(3):e34131.
- Sheppard DS. A literatura médica brasileira sobre a peste branca: 1870-1940. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*. 2001;VIII(1):172-192.
- Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis - time for a game change. *N Engl J Med*. 2010;363(11):1070-1071.
- Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(7):537-544.
- Sotomayor H, Burgos J, Arango M. Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of *Mycobacterium tuberculosis* in a Colombian prehispanic mummy. *Biomedica*. 2004;24(Supp. 1):18–26.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(18):9869-9874.
- Starikovskaya YB, Sukernik RI, Schurr TG, Kogelnik AM, Wallace DC. mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: implications for the genetic history of Ancient Beringia and the peopling of the New World. *Am J Hum Genet*. 1998;63(5):1473-1491.
- Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(4):1267-1268.

- Stead WW. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med.* 1997;18(1):65-77.
- Stead WW. Tuberculosis in Africa. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2(10):791-792.
- Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ et al. Beringian standstill and spread of Native American founders. *PLoS One.* 2007;2(9):e829.
- Taylor GM, Crossey M, Saldanha J, Waldron T. DNA from *Mycobacterium tuberculosis* Identified in Mediaeval Human Skeletal Remains Using Polymerase Chain Reaction. *J Archaeol Sc.* 1996;23:789-798.
- Templeton AR. Human Races: A genetic and Evolutionary Perspective. *American Anthropologist.* 1998;100(3):632-650.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia.* 8. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- Tran ST, Renschler JP, Le HT, Dang HTT, Dao TM, Pham AN et al. Diagnostic Accuracy of Microscopic Observation Drug Susceptibility (MODS) Assay for Pediatric Tuberculosis in Hanoi, Vietnam. *PLoS ONE.* 2013;8(9):e72100.
- van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47(4):1236-1245.
- Verschoor JA, Baird MS, Grooten J. Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*. *Prog Lipid Res.* 2012;51(4):325-339.
- Walker PL, Miller KWP, Richman R. Time, temperature, and oxygen availability: an experimental study of the effects of environmental conditions on the color and organic content of cremated bone. In: Schmidt SS, editor. *The Analysis of Burned Human Remains.* Londres: Academic Press; 2008. p. 129-135.
- Walker PL, Miller K. Time, temperature, and oxygen availability: an experimental study of the effects of environmental conditions on the color and organic content of cremated bones. In: Annual Meeting of the American Association of Physical

Anthropologists; 2005; Milwaukee, EUA. Milwaukee: American Association of Physical Anthropologists; 2005.

Wilbur AK, Buikstra JE. Patterns of tuberculosis in the Americas: how can modern biomedicine inform the ancient past? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(Suppl 2):59-66.

Wilbur AK, Bouwman AS, Stone AC, Roberts CA, Pfister LA, Buikstra JE et al. Deficiencies and challenges in the study of ancient tuberculosis DNA. *J Archaeol Sc*. 2009;36:1990–1997.

Willerslev E, Cooper A. Ancient DNA. *Proc Biol Sci*. 2005;272(1558):3-16.

Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguec C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog*. 2008;4(9):e1000160.

Zink A, Haas CJ, Reischl U, Szeimies U, Nerlich AG. Molecular analysis of skeletal tuberculosis in an ancient Egyptian population. *J Med Microbiol*. 2001;50(4):355-366.

Zink AR, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNAs from Egyptian mummies by spoligotyping. *J Clin Microbiol*. 2003;41(1):359-367.

Zink AR, Grabner W, Nerlich AG. Molecular identification of human tuberculosis in recent and historic bone tissue samples: The role of molecular techniques for the study of historic tuberculosis. *Am J Phys Anthropol*. 2005;126(1):32-47.

Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF. Tuberculosis. *N Engl J Med*. 2013;368(8):745-755.