

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



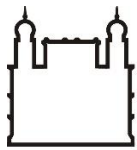
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Lucélia Guedes Ribeiro da Silva

**Estudo de doenças infecciosas no período colonial Brasileiro: abordagens
paleoparasitológicas e paleogenéticas**

Rio de Janeiro

2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Lucélia Guedes Ribeiro da Silva

Estudo de doenças infecciosas no período colonial Brasileiro: abordagens paleoparasitológicas e paleogenéticas

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Dra. Alena Mayo Iñiguez

Rio de Janeiro

2019

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

S586e Silva, Lucélia Guedes Ribeiro da.
Estudo de doenças infecciosas no período colonial brasileiro: abordagens paleoparasitológicas e paleogenéticas / Lucélia Guedes Ribeiro da Silva. -- 2019.
163 f. : il. color. ; tab.

Orientadora: Alena Mayo Iñiguez.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2019.

1. Tuberculose. 2. Sífilis. 3. Helmintos. 4. DNA Forma A. 5. Paleopatologia. 6. Parasitologia. 7. Ascaris. 8. Trichuris. 9. Brasil. I. Título.

CDD – 23.ed. – 616.960981

Lucélia Guedes Ribeiro da Silva

Estudo de doenças infecciosas no período colonial Brasileiro: abordagens paleoparasitológicas e paleogenéticas

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, como requisito parcial para obtenção de título de Doutora em Ciências.

Aprovada em 30/04/2019

Banca examinadora

Dra. Andrea de Lessa Pinto

Museu Nacional/ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Arqueologia

Dr. Harrison Magdinier Gomes

Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz

Dr. Sergio Augusto de Miranda Chaves

Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública

Dr. Paulo Cesar Basta

Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública

Dra. Alena Mayo Iñiguez (orientadora)

Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

À Deus e a minha família que são a base do meu caráter.

AGRADECIMENTOS

A Deus que é o meu TUDO. DEle vem a minha capacidade e força. Obrigada Deus por me presentear com esta dádiva.

À minha querida e amiga orientadora Dra. Alena Mayo Iñiguez. Foram 11 anos ao seu lado. A você minha eterna gratidão por ter formado a profissional que sou hoje. Obrigada por ter confiado a mim a realização deste trabalho.

À Dra. Ana Jansen por ter me recebido carinhosamente em seu laboratório.

A todos os amigos do LABTRIP. Muitos momentos bons vivi com vocês. Com certeza a amizade de vocês fez total diferença no fluir do trabalho.

À equipe de paleogenética, Victor Hugo, Mônica, Ludmila, Lorryne, Thaíla, Quézia, Marcelo e Laiz. Nossa unidade, amizade, risadas, ajudas, ficarão para sempre guardadas comigo. O nosso trabalho em equipe me fez crescer mais.

Ao Programa de pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ) pela concessão de bolsa de estudos, custos em congressos e oportunidade de desenvolver este trabalho.

À equipe do IAB, principalmente Jandira e Dr. Ondemar Dias, pelas colaborações com amostras, trocas de conhecimentos e por ter me ajudado financeiramente quando mais precisei.

Ao Museu Nacional (UFRJ) pela colaboração em amostras. Os resultados publicados 2 dias depois do triste acidente me deixaram consternada pela perda de grande parte do patrimônio histórico, mas ao mesmo tempo grata pela parceria e profissionalismo de seus arqueólogos.

Às instituições FAPERJ e CNPQ pelo apoio aos projetos de pesquisa.

Ao Instituto Oswaldo Cruz pelo apoio às publicações científicas.

À minha psicóloga Luzia Lecce por ter me ouvido e me fortalecido tantas vezes.

Aos meus pais Gevalder e Rose que me propuseram a oportunidade de estudar e sempre me apoiaram. Foram fundamentais as tantas vezes que ouvi: “Me orgulho de você”, “Você vai conseguir”! Pai e mãe, meus exemplos!

Aos meus irmãos Luciano e Luciane e cunhados Beatriz e Elias. Amo vocês. Obrigada por toda força e ajuda ao longo da caminhada acadêmica.

Aos meus lindos sobrinhos, Esther, Lucas, Gabriel, Nicholas e Bernardo.

Ao meu amado marido Eraldo Jr. que acreditava em mim quando me faltava confiança. Seu apoio foi essencial. Obrigada porque mesmo sem entender nada, ouvia minhas conversas científicas, mostrando-se interessado.

Aos meus sogros Eraldo e Regina, à minha cunhada Márcia e seu esposo Leandro por todo o carinho.

Aos meus amigos que sempre me motivaram e entenderam os momentos em que não estive presente.

A todos que de alguma forma me ajudaram e contribuíram com este estudo.

*Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda a escada.*

Apenas dê o primeiro passo.

Martin Luther King Jr.

RESUMO

A avaliação da presença de parasitoses em populações antigas, seja por meio de abordagens paleoparasitológicas ou paleogenéticas, permite o estudo da origem e dispersão de parasitos, assim como a determinação da epidemiologia molecular no passado. No trabalho apresentado foram estudadas questões específicas a tuberculose, sífilis e parasitoses intestinais no período Colonial Brasileiro. A tese está no formato “coletânea” e são apresentados 2 artigos publicados e 1 submetido a publicação. No primeiro artigo, foi abordada a presença da infecção pelo Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) em nativos da população Tenetehara-Guajajara, no Estado do Maranhão, que apresentavam lesões paleopatológicas sugestivas de tuberculose. A genotipagem das cepas de MTC identificadas, apontou para a influência de Africanos ou Europeus na disseminação da infecção no Brasil. Este é o primeiro registro da infecção em ameríndios nativos do período pós-contato. No segundo artigo foi reportado o sucesso na detecção de aDNA de *T. pallidum* em remanescentes humanos provenientes de 2 sítios arqueológicos do período histórico Brasileiro, Igreja Nossa Senhora do Carmo e cemitério Praça XV. O resultado foi atribuído aos critérios adotados baseados na fisiopatologia da *T. pallidum*, e nos dados epidemiológicos da população do estudo. aDNA de *T. pallidum* foi detectado em 2 indivíduos, e em um deles, o diagnóstico de sífilis foi sugerido. No terceiro artigo, a aplicação de análises paleoparasitológicas e paleogenéticas em remanescentes humanos do sítio arqueológico cemitério dos Pretos Novos (CPN), Rio de Janeiro, permitiu estudar a infecção por helmintos intestinais. Mesmo trabalhando com ossos submetidos à queima como procedimento do CPN e terem passado por processo de curadoria no Instituto de Arqueologia Brasileira, foi possível a detecção de *T. trichiura* e *Ascaris* sp. Considerando que o propósito do CPN era depositar corpos de Africanos escravizados que morriam assim que chegavam ao Brasil, se sugere que estas infecções foram trazidas da África para o Brasil durante o período Colonial.

Palavras-chave: tuberculose, sífilis, helmintos, aDNA, Brasil

ABSTRACT

The evaluation of the presence of parasites in ancient populations, either through paleoparasitological or paleogenetic approaches, allows the study of the origin and dispersion of parasites, as well as, the determination of molecular epidemiology in the past. In the present study, specific issues for tuberculosis, syphilis and intestinal parasites in the Brazilian Colonial period were studied. The thesis is in the format "collection" and are presented 2 published papers and 1 paper submitted to publication. In the first paper, the presence of the infection by the *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTC) in natives of the Tenetehara-Guajajara population, from State of Maranhão, who had paleopathological lesions suggestive of tuberculosis. The genotyping of the MTC strains pointed to the influence of Africans or Europeans on the dissemination of infection in Brazil. This is the first record of infection in Native Amerindians of the post-contact period. In the second paper, the success in the detection of aDNA of *T. pallidum* in human remains from 2 archaeological sites of Brazilian historical period, Nossa Senhora do Carmo Church and Praça XV Cemetery, was reported. The result was attributed to the criteria adopted based on the pathophysiology of *T. pallidum* and epidemiological data of the population studied. aDNA of *T. pallidum* was detected in 2 individuals, and in one of them, the diagnosis of syphilis was suggested. In the third paper, the application of paleoparasitological and paleogenetic analyses in human remains of the archaeological site of the *Pretos Novos* cemetery (CPN), Rio de Janeiro, allowed the study of intestinal helminths infection. Even working with bones, that were subjected to burning as a CPN procedure and having undergone a curatorship process at the Brazilian Archaeology Institute, it was possible to detect *T. trichiura* and *Ascaris* sp. Considering that the purpose of the CPN was to deposit bodies of African slaves who died as soon as they arrived in Brazil, it is suggested that these infections were brought from Africa to Brazil during the Colonial period.

Keywords: Tuberculosis, syphilis, helminths, aDNA, Brazil

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Coleta paleogenética realizada no sítio arqueológico Igreja Nossa Senhora do Carmo (século XVII).....	19
Figura 2: Esquema do cenário evolutivo do MTC proposto por Brosch e colaboradores (2002).....	23
Figura 3: Árvore filogenética de 39 genomas, mostrando a separação entre cepas de <i>Treponema pallidum</i>	36
Figura 4: Árvore de máxima verossimilhança com <i>bootstrap</i> para 39 cepas modernas e 3 cepas ancestrais.....	37
Figura 5: Ciclo biológico do <i>Ascaris</i> sp.....	48
Figura 6: Ovos e larvas de <i>Ascaris lumbricoides</i>	49
Figura 7: Ciclo biológico do <i>T. trichiura</i>	54
Figura 8: Ovo de <i>T. trichiura</i>	55
Figura 9: Forma adulto de <i>Trichuris trichiura</i>	56
Figura 10: Coleta paleogenética, remanescentes humanos e artefatos culturais encontrados nos sítios arqueológicos, Rio de Janeiro.....	72
Figura 11: Artefatos culturais encontrados durante a escavação arqueológica no cemitério dos Pretos Novos, Rio de Janeiro, Brasil.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise bioantropológica de indivíduos Tenetehara-Guajajara fornecidas pela Seção de Antropologia Biológica.....	65
Tabela 2: Alvos moleculares usados para amplificar aDNA de MTC em remanescentes humanos Tenetehara-Guajajaras no Estado do Maranhão, Brasil.....	66
Tabela 3: Dados bioantropológicos dos indivíduos do presente estudo.....	70
Tabela 4: Indivíduos do cemitério Pretos Novos analisados neste estudo e resultados paleoparasitológico e paleogenético.....	75

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

18S rDNA: 18S ribosomal DNA

AD: *Ano Domini*

aDNA: DNA antigo (*ancient DNA*)

AP: antes do presente

Arg: arginina

cox1: citocromo c oxidase subunidade 1

CPN: cemitério dos Pretos Novos

cytb: citocromo b

DR: *direct repeat*

EPIs: equipamentos de proteção individual

FTA-abs: anticorpo treponêmico fluorescente com absorção (*fluorescent treponemal antibody absorption*)

gyrA: DNA girase subunidade A

gyrB: DNA girase subunidade B

IAB: Instituto de Arqueologia Brasileira

INSC: Igreja Nossa Senhora do Carmo

ITS: *internal transcribed spacer*

katG: catalase peroxidase

Kb: *kilo* (quilo) pares de bases

Hab: habitantes

HIV: vírus da imunodeficiência humana

HVS-I: segmento hipervariável

LP: Laboratório de Paleogenética

Leu: leucina

leuB: 3-isopropylmalate dehydrogenase

µm: micrômetro

MA: milhões de anos

Min: minutos

MLSA: *Multilocus Sequence Analysis*

MLST: *Multilocus Sequence Typing*

MN/UFRJ: Museu Nacional / Universidade Federal do Rio de Janeiro

MTC: Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

mtDNA: DNA mitocondrial

nad1: NADH desidrogenase subunidade 1

NGS: *Next Generation Sequencing*

OMS: Organização Mundial de Saúde

oxyR: *Hydrogen peroxide*

RPR: reagina plasmática rápida

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

pPCR: produto de PCR

PR: polimerização reconstrutora

PRXV: cemitério Praça XV

Seg: segundos

SNP: polimorfismo de nucleotídeo simples (*single polymorphism nucleotide*)

TbD1: *Mycobacterium tuberculosis*-specific deletion 1

TEN: *T. p. subsp. endemicum*

Thr: treonina

TPA: *T. p. subsp. pallidum*

TPE: *T. p. subsp. pertenue*

TRE: treponematoses

TPPA: aglutinação de partículas de *Treponema pallidum* (*Treponema pallidum particle agglutination assay*)

TRUST: prova de toluidine vermelha em soro não aquecido (*toluidine red unheated serum test*)

UV: ultravioleta

VDRL: *venereal disease research laboratory*

WGA: *whole genome amplification*

SUMÁRIO

1- Introdução.....	15
Paleoparasitologia, paleoparasitologia molecular e paleogenética.....	15
2- Revisão da literatura.....	20
Agravos.....	20
Tuberculose.....	20
O complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , evolução e linhagens.....	20
A tuberculose no passado.....	24
A doença.....	26
Diagnóstico.....	27
Epidemiologia.....	29
Sífilis.....	30
<i>Treponema pallidum</i>	30
Treponematoses.....	31
Origem da sífilis.....	33
Paleogenética de treponematoses.....	34
Paleoepidemiologia e epidemiologia atual.....	37
Epidemiologia molecular.....	39
Diagnóstico.....	41
Parasitas intestinais.....	42
<i>Ascaris</i> sp.....	42
O parasito.....	42
Origem do parasito.....	43
<i>Ascaris</i> sp. no passado.....	46
A doença.....	47
Ciclo biológico.....	47
Morfologia: ovos e formas adultas.....	49
Diagnóstico.....	50
Epidemiologia.....	51
<i>Trichuris trichiura</i>	52
O parasito.....	52
Origem do parasito.....	52
<i>Trichuris trichiura</i> no passado no passado.....	52

A doença.....	53
Ciclo biológico.....	54
Morfologia: ovos e formas adultas.....	55
Diagnóstico.....	56
Epidemiologia.....	57
Associação <i>Ascaris</i> sp. e <i>T. trichiura</i>	58
3- Justificativa.....	59
4- Objetivos.....	61
5- Materiais e métodos.....	62
6- Resultados.....	78
Artigo 1.....	79
Artigo 2.....	96
Artigo 3.....	105
7- Considerações finais.....	128
8- Conclusões.....	130
9- Referências.....	132
Anexo: artigo publicado em co-autoria.....	157

1- INTRODUÇÃO

PALEOPARASITOLOGIA, PALEOPARASITOLOGIA MOLECULAR E PALEOGENÉTICA

Entende-se por parasito um organismo ou um fragmento genético capaz de se reproduzir e que encontra seu habitat em outro organismo ou sequência genética (ARAUJO et al., 2013). Segundo definição de Rey (2008a), o conceito ecológico de parasitismo refere-se à “toda relação ecológica, desenvolvida entre indivíduos de espécies diferentes, em que se observa, além de associação íntima e duradoura, uma dependência metabólica de grau variado”. Duas propostas emergiram para explicar a origem dos parasitos, a filogenética e a ecológica. A primeira refere-se ao compartilhamento de parasitos de um hospedeiro com outro filogeneticamente próximo, e a segunda, é a aquisição de parasitos a partir do ambiente, conforme os hominídeos evoluíram e conquistaram espaços (ARAÚJO et al., 2008). A paleoparasitologia surgiu como um ramo da parasitologia após o estudo de Ruffer (1910) que mostrou a recuperação de ovos de *Schistosoma haematobium* em tecido renal reidratado de uma múmia egípcia (3200 a 3050 AP). Ruffer abriu a possibilidade do estudo de agravos em populações no passado. A paleoparasitologia consiste no estudo de parasitos encontrados em material arqueológico ou paleontológico, com o objetivo de traçar a origem e evolução de parasitos e doenças infecciosas (ARAÚJO et al., 2014). O termo Paleoparasitologia foi criado durante o Congresso Brasileiro de Parasitologia, em 1979, pelo Dr. Luiz Fernando Ferreira (FERREIRA; ARAÚJO; CONFALONIERI, 1979), pesquisador emérito (*in memoriam*) da Fundação Oswaldo Cruz, que tinha grande interesse em saber se infecções parasitárias já estavam nas Américas antes do contato com Europeus ou se foram introduzidas por eles juntamente com seus escravos. Desde então, questões sobre a tríade parasito – hospedeiro – meio ambiente tem sido respondidas pela paleoparasitologia (ARAUJO et al., 2008; ARAÚJO; FERREIRA; CONFALONIERI, 1981; BELTRAME et al., 2019; BRUSCHI et al., 2006; CHO et al., 2017; DE SOUZA et al., 2017; FERREIRA; DE ARAÚJO; CONFALONIERI, 1983; SEO et al., 2018).

Amostras biológicas como tecidos, ossos e coprólitos (do grego *kopros* – fezes e *lithos* – pedra), que são fezes preservadas por dessecação ou mineralização, tanto de origem humana quanto animal, são excelentes fontes para o estudo da presença do parasito, porque podem conter formas parasitárias, vestígios moleculares e resíduos alimentares do hospedeiro. Além destes, destacam-se também sedimentos de latrinas, sedimentos associados à regiões pélvicas e

ao interior dos forames do sacro (FERREIRA; REINHARD; ARAÚJO, 2011b). Análises com base nestas fontes de estudo podem gerar informações sobre a origem e evolução dos parasitos, reconstrução de hábitos alimentares, modos de vida, condições de saúde e migrações (FERREIRA; REINHARD; ARAÚJO, 2011b). Os variados tipos de micro-resíduos encontrados em coprólitos, como amido, pólenes, fibras, e fragmentos de ossos, assim como a avaliação contextual do sítio arqueológico, contribuem com informações sobre dados culturais de povos antigos (GONÇALVES; ARAÚJO; FERREIRA, 2002).

Trabalhos clássicos contribuíram para o conhecimento sobre infecções no passado. Alguns estudos como o de Soper (1927) que observou a taxa de infecção de 100% e 59% por *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus*, respectivamente, em ameríndios nativos do Paraguai e que viviam em áreas afastadas do contato com Europeus. Os dados obtidos levaram ao autor a concluir que *A. duodenale* teria sido introduzido no continente junto com a migração dos primeiros homínídeos, vindos da Ásia ou Indonésia, pelo Oceano Pacífico ou pelo Estreito de Bering, caso as temperaturas desta região fossem mais altas. Enquanto que *N. americanus* também teria sido introduzido por uma dessas vias, mas após o contato com europeus. Dada esta relevante contribuição acerca do povoamento das Américas por meio do estudo desses parasitos, rotas alternativas de migração humana para o continente, foram consideradas como explicação para a presença de helmintos dependentes de condições ambientais para o desenvolvimento de formas parasitárias, como os ancilostomídeos, *Trichuris trichiura* e *Strongyloides stercoralis* (ARAÚJO et al., 2008; ARAÚJO; FERREIRA; CONFALONIERI, 1981). Como estes parasitam apenas humanos e são dependentes de clima temperado e temperatura do solo de 20–30°C (REY, 2008b), só poderiam terem entrado na América por meio da migração humana e não poderiam ter sobrevivido às baixas temperaturas durante a travessia pelo Estreito de Bering. Desta forma, apenas as rotas transpacífica (RIVET, 1928) e a costal (MONTENEGRO et al., 2006) poderiam explicar estes achados.

Em 2011 o livro Fundamentos da Paleoparasitologia foi publicado com contribuições de diversas áreas e abordagens, assim como os aportes dos grupos de pesquisa em paleoparasitologia de diferentes regiões do mundo (FERREIRA, 2011). Neste livro, um breve apanhado do histórico dos principais trabalhos na paleoparasitologia. Côté e Bailly (2018) apresentaram uma revisão dos estudos mais recentes de detecção de parasitos no passado por meio de abordagens moleculares.

A Paleoparasitologia molecular se refere à detecção, genotipagem e análise filogenética apenas de parasitos, e a Paleogenética aborda informações moleculares relacionadas a natureza

do hospedeiro (animal ou humano), ancestralidade matrilinear e/ou patrilinear, sexo, relações parentesco, dieta e flora intestinal, externa e/ou do ambiente (IÑIGUEZ, 2014). Estas ciências emergiram para responder questões sobre infecções do passado, por meio da recuperação de aDNA em material arqueológico, submetendo-o a técnicas de biologia molecular (IÑIGUEZ, 2011). O termo aDNA por definição refere-se a “qualquer vestígio ou traço de DNA proveniente de um organismo morto ou partes deste, assim como DNA extracorpóreo” (HERRMANN; HUMMEL, 1994). A primeira recuperação de aDNA foi em um espécime de museu de um animal Sul-Africano, *Equus quagga*, extinto em 1883 (HIGUCHI et al., 1984). A confirmação se deu pela clonagem e sequenciamento de um fragmento do mtDNA com tamanho de 229pb (HIGUCHI et al., 1984). No ano seguinte, Pääbo (1985) reportou o primeiro resultado de detecção de aDNA humano em uma múmia egípcia datada de 4550 anos AP. A análise após a clonagem molecular do fragmento, mostrou a presença de sequências da região de um membro da família *Alu*. Contudo, é importante destacar que estes resultados foram mais tarde apontados como provenientes de contaminação, consequência de metodologias que ainda não aplicavam critérios de autenticidade de aDNA (IÑIGUEZ, 2011). O início dos estudos paleogenéticos com Svante Pääbo, desde a década de 80, demonstraram a possibilidade da detecção de DNA em material arqueológico (PÄÄBO; GIFFORD; WILSON, 1988; PÄÄBO; IRWIN; WILSON, 1990; PÄÄBO; WILSON, 1988). Estudos relevantes utilizando diferentes fontes de materiais, contribuíram com uma variedade de tipos de informações. Uma das mais fascinantes descobertas do século, foi o homem do gelo, conhecido como Ötzi ou Tyrolean. O corpo, encontrado em 1991 nos Alpes entre a Áustria e Itália, foi datado de 5.350 a 5.100 anos atrás (BONANI et al., 1992). Em 1993, Cano e colaboradores (1993) demonstraram a extração de aDNA e confirmação por sequenciamento nucleotídico e análise filogenética de um inseto coleóptera preservado em âmbar e extinto há 120-135 MA. Em estudo com remanescente humano, a análise de mtDNA de um espécime de Neanderthal encontrado em 1856 na Alemanha, indicou que este não seria o ancestral direto do homem moderno como se presumia anteriormente (KRINGS, 1997). No final da década de 90, Poinar e colaboradores (1998) estudaram coprólitos de *Nothrotheriops shastensis*, uma espécie de preguiça extinta há 11.000 anos atrás e clonaram aDNA do hospedeiro complementando ainda com dados sobre sua dieta.

A recuperação de aDNA em amostras arqueológicas tem sido uma abordagem útil na investigação de origem, e dispersão de doenças em populações do passado, assim como no entendimento dos processos de povoamento (IÑIGUEZ, 2011). Contudo, o estudo genético em populações passadas apresenta muitas limitações que estão inerentes a recuperação e manuseio do aDNA. Em Iñiguez (2014) a autora explica que quando um organismo morre seu DNA entra

em um processo de degradação por ação de enzimas endógenas que já não estão mais restritas a compartimentos celulares, assim como o sistema de reparo do DNA que também não está mais atuando em sua preservação, além do ataque de insetos e bactérias que se alimentam e degradam macromoléculas. Para minimizar essas perdas, é de suma importância manter a integridade do aDNA desde a coleta do material até a aplicação de métodos moleculares para a sua detecção. Em 2007, Alena M. Iñiguez e colaboradores realizaram a primeira coleta de materiais arqueológicos dentro dos padrões necessários para a pesquisa com aDNA, momento em que foi denominado de “coleta paleogenética” (IÑIGUEZ, 2014; JAEGER et al., 2012). O acompanhamento do salvamento arqueológico de vestígios da população histórica do Rio de Janeiro junto ao IAB abriu uma oportunidade de introduzir uma metodologia que limitasse a deterioração do material genético e contaminação por DNA moderno proveniente do operador e equipe que acompanhou a escavação. O protocolo baseado no estudo de Pruvost e colaboradores (2007) leva em consideração a proteção da amostra da luz e o armazenamento em baixas temperaturas imediatamente após a escavação, além da utilização de materiais estéreis, descartáveis e EPIs (Fig 1). A aplicação destas medidas foi essencial para a preservação e detecção de aDNA autêntico, possibilitando a demonstração da infecção por MTC em mais de 50% da população estudada no Rio de Janeiro em período colonial, e a determinação do perfil haplotípico matrilinear realizado em 71,8% dos indivíduos (JAEGER et al., 2012b). Um *checklist* recentemente publicado mostrou medidas que devem obrigatoriamente serem seguidas para minimizar os riscos de contaminação com DNA moderno (FULTON; SHAPIRO, 2019). Sabe-se que amostras provenientes de solo *permafrost* ou de climas temperados oferecem melhores condições de preservação do aDNA, portanto, mais importante que a antiguidade da amostra, é o modo de preservação pós-escavação (PRUVOST et al., 2007). As excelentes condições de preservação já permitiram análises paleogenéticas de microbiota, dieta, parasitos, doenças crônicas, ancestralidade matrilinear e patrilinear, genoma completo, determinação fenotípica, grupo sanguíneo, metagenoma, entre outros (AMES et al., 2013; CANO et al., 2000; DICKSON et al., 2000; ERMINI et al., 2008; KELLER et al., 2012; MAIXNER et al., 2014, 2018; ROLLO et al., 2000, 2002, 2006; TITO et al., 2012; ZINK et al., 2014).

Metodologicamente, o NGS tem proporcionado um significativo aumento de informações genéticas em amostras arqueológicas. Permite um elevado número de leituras do material genético (até bilhões de fragmentos) de uma só vez (ILLUMINA, 2017). Os dados produzidos em uma única leitura e a análise da abundância relativa de aDNA endógeno em detrimento a contaminantes, faz com que esta tecnologia seja ideal para estudos de material

genético em amostras arqueológicas (KNAPP; HOFREITER, 2010). Poinar e colaboradores (2006) aplicaram a abordagem para análise de material genético de mamute extinto, permitindo uma leitura de 13 milhões de pb de genoma nuclear. Recomenda-se o uso da técnica para estudos de aDNA, uma vez que por sua condição e natureza de degradação, é difícil a detecção pelos métodos convencionais de biologia molecular. Estudos mais atuais mostram a aplicação da abordagem na determinação de parasitos intestinais (CÔTÉ et al., 2016), na quantificação de aDNA endógeno e íntegro (BASLER et al., 2017), na análise genômica de plantas históricas (GUTAKER; BURBANO, 2017) e na detecção de *Helicobacter pylori* em múmias Coreanas do século XVII (SHIN et al., 2018).



Fig 1: Coleta paleogenética realizada no sítio arqueológico Igreja Nossa Senhora do Carmo (século XVII). São demonstrados a utilização de Equipamentos de proteção individual (EPIs) e materiais descartáveis. Fonte: Iñiguez AM, 2007

2- REVISÃO DA LITERATURA

AGRAVOS:

TUBERCULOSE

O complexo *Mycobacterium tuberculosis*, evolução e linhagens

O gênero *Mycobacterium*, pertencente à família Mycobacteriaceae, compreende mais de 170 espécies reconhecidas (FORBES, 2017). Algumas são restritas a humanos enquanto outras são oportunistas ou não virulentas. O gênero é formado por bacilos aeróbios, imóveis, não esporulados, Gram-positivos, medem 0,2 a 0,6 x 1 a 10µm e apresentam alto conteúdo de G+C (61%-71%) (MURRAY, 2017). Possuem membrana celular rica em ácidos micólicos, o que as tornam resistentes a vários desinfetantes, algumas colorações de laboratórios e a antibióticos comuns, por isso denominadas acidorresistentes. Devido à complexidade da membrana, muitas micobactérias tem crescimento lento, cerca de 12-24 horas, sendo necessário 8 semanas para o cultivo em laboratório (MURRAY, 2017).

Oito distintas espécies compõem o MTC: *M. tuberculosis* sensu stricto, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* e *M. mungi*, sendo as três primeiras as que afetam principalmente humanos, embora, *M. microti* já tenha sido isolado em paciente imunosuprimido (ALEXANDER et al., 2010; GAGNEUX, 2012; VAN SOOLINGEN et al., 1998). *Mycobacterium africanum* foi descrito pela primeira vez em 1968 no Senegal, sendo classificado bioquimicamente como uma espécie intermediária entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* (CASTETS et al., 1968). *Mycobacterium canettii* (Georges Canetti, 1969) é um raro variante de *M. tuberculosis*, frequentemente isolado em habitantes ou viajantes da África (BROSCH et al., 2002). Difere em alguns aspectos de MTC, como polimorfismos em genes *housekeeping*, morfologias das colônias, número de cópias do alvo molecular IS1081 e conteúdo lipídico na membrana celular (PAPA et al., 1989; VAN SOOLINGEN et al., 1997). *Mycobacterium bovis* afeta gados, mas em alguns casos também pode infectar humanos, por meio do consumo de leite ou carne de gado contaminados, afetando o estômago, o trato intestinal, ou até mesmo o sistema respiratório (ÇAVUŞOĞLU; YILMAZ, 2017; DAVIDSON et al., 2017; LOMBARDI et al., 2017). *Mycobacterium bovis* resistente a antibióticos de primeira linha também tem sido descrito em casos de tuberculose em humanos (LAN; BASTOS; MENZIES, 2016; LOBUE; MOSER, 2005; VALLE et al., 2015). *Mycobacterium caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, e *M. mungi* infectam cabras e ovelhas, roedores, focas e leões marinhos, e mangustos,

respectivamente (ALEXANDER et al., 2010; GAGNEUX, 2012). Embora os membros do complexo, exceto *M. canettii*, apresentem alta identidade genética, com variação nucleotídica sinônima de 0,01% - 0,03% (GUTIERREZ et al., 2005) e mutações de apenas 1 SNP a cada 3Kb (COMAS et al., 2010), se diferenciam pelas características fenotípicas e tropismos nos hospedeiros (BÖDDINGHAUS et al., 1990; BROSCHE et al., 2002). A baixa variabilidade genética entre MTC pode ser reflexo da falta/raridade de transferência horizontal de genes e reprodução por clonalidade (BRITES; GAGNEUX, 2017)

Hipóteses têm sido propostas para explicar a evolução dos membros do MTC. Kapur, Whittam e Musser (1994) sugeriram que as espécies se separaram há 15-20.000 anos atrás, baseado na baixa frequência de mutações em genes *housekeeping*. Stead e colaboradores (1995) presumiram que *M. tuberculosis* poderia ter evoluído de *M. bovis* durante o Neolítico com a prática da domesticação de gado, há aproximadamente 10.000 anos atrás. Esta hipótese foi baseada na consideração de que *M. tuberculosis* é um parasito exclusivamente humano, enquanto *M. bovis* tem maior amplitude de preferências por hospedeiros. No entanto, o sequenciamento do genoma completo de *M. tuberculosis*, cepa H37Rv (COLE et al., 1998) comparada ao genoma de *M. bovis*, mostrou 7 regiões com deleções (RD4-RD10) apenas em *M. bovis* (GORDON et al., 1999). Mais tarde, Brosch e colaboradores (2002) analisando 20 regiões variáveis de mais de 100 cepas do MTC, observaram que *M. bovis* passou por diversas deleções de regiões RD além daquelas já observadas por Gordon e colaboradores (1999), indicando que o genoma desta espécie é menor que o de *M. tuberculosis* e que ocupa a posição de último membro na separação das linhagens de MTC. O esquema de evolução filogenética proposto pelos autores, e atualmente aceito, mostrou que a deleção da região Tbd1 diferenciou as cepas de *M. tuberculosis* “modernas” das “ancestrais”, bem como diversas deleções na região RD originaram *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis* (BROSCH et al., 2002) (Fig 2). Outro ponto também discutido pelos autores é que não parece plausível que as espécies que tiveram regiões deletadas ao longo do processo evolutivo, tenham se adaptado ao hospedeiro humano apenas em 15 – 20.000 anos atrás. Sendo assim, parece que cepas adaptadas a animais teriam surgido a partir de cepas adaptadas a humanos, e não o contrário. Um ancestral comum para MTC foi proposto, nomeado *M. prototuberculosis*, que teria surgido há 3 milhões de anos atrás, emergindo na África e acompanhando os hominídeos nas ondas de imigração para outras regiões, levando a um gargalo evolutivo, período que compreendeu entre 20.000-40.000 anos atrás (GUTIERREZ et al., 2005; SMITH et al., 2009; WIRTH et al., 2008). Comas e colaboradores (2013) analisaram genomas completos de cepas de MTC para reconstruir a

história evolutiva do complexo. Os autores sugeriram que a infecção já estava presente há pelo menos 70.000 anos em indivíduos da África (período muito anterior a domesticação de animais), e que foi se dispersando e aumentando a prevalência conforme a densidade populacional foi se elevando.

As relações filogenéticas entre a espécie *M. canettii* e os demais membros do MTC foi demonstrada por Van Embden e colaboradores (2000) que baseado na análise genética por *spoligotyping* observaram sequências únicas de DR somente em *M. canettii*. Regiões DR são curtos fragmentos nucleotídicos (36pb) que se repetem ao longo do genoma do MTC e se separam um do outro por espaços únicos que variam entre 35 a 41pb (BEGGS et al., 1996). Estas regiões são polimórficas em relação a presença ou ausência de segmentos espaçadores e adjacentes, podendo serem utilizadas em genotipagem de MTC (CAIMI; CATALDI, 2004). Brosch e colaboradores (2002) sugeriram que *M. canettii* teve origem a partir do ancestral comum do MTC por apresentar regiões DR que são deletadas em *M. tuberculosis*, assim como a ausência da região TbD1 presentes em cepas de *M. tuberculosis* chamadas de “modernas”. Mais estudos foram conduzidos a fim de contribuir com informações sobre a filogenia de MTC. Gutierrez e colaboradores (2005) além de ter sugerido o progenitor do MTC como mencionado acima, apontou que a evolução do complexo seguiu a partir de um evento de transferência horizontal de genes ocorrido em um *pool* de STB (*smooth tubercle bacilli*). Este grupo é membro do complexo MTC, incluindo *M. canettii*, mas não são transmissíveis e apresentam colônias diferenciadas em meios de cultura (ABOUBAKER OSMAN et al., 2016; SUPPLY et al., 2013). Mais tarde o mesmo grupo de pesquisa concluiu que o MTC teria adquirido virulência e mecanismos de persistência por meio da combinação de fatores como, perda de função de genes, provável aquisição de novos genes por transferência horizontal, recombinação de grupos de genes entre diferentes cepas e fixação de SNPs (SUPPLY et al., 2013).

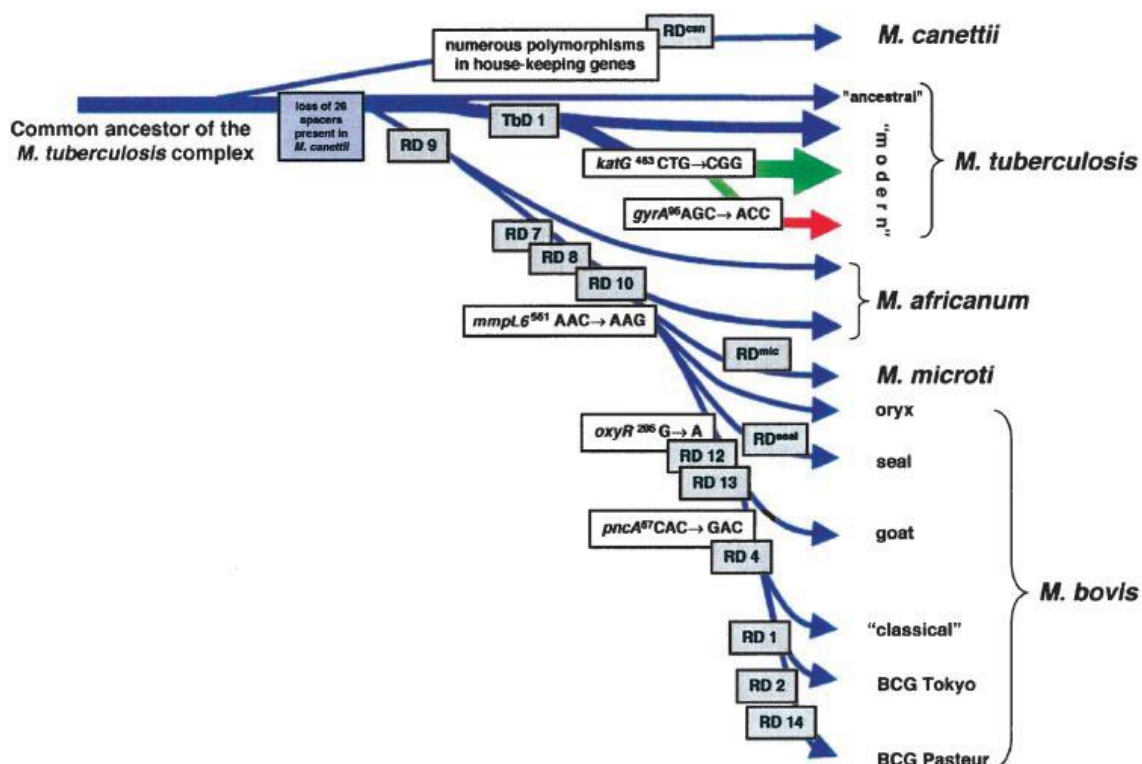


Fig 2: Esquema do cenário evolutivo do MTC proposto por Brosch e colaboradores (2002). A figura ilustra sucessivas perdas de DNA em certas linhagens (caixas cinzas). O esquema é baseado na presença ou ausência de regiões deletadas conservadas e em sequências de polimorfismos de cinco genes selecionados. Setas azuis indicam que cepas são caracterizadas por *katG*⁴⁶³ CTG (Leu), *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr), típicas para organismos do grupo 1. Seta verde indicam cepas pertencentes ao grupo 2 caracterizadas por *katG*⁴⁶³ CGG (Arg), *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr). Seta vermelha indica cepas do grupo 3, caracterizadas por *katG*⁴⁶³ CGG (Arg), *gyrA*⁹⁵ AGC (Ser), como definido por Sreevatsan e colaboradores (1997). (Fonte: Brosch e colaboradores (2002))

A classificação dos membros do MTC foi conduzida primeiramente por Sreevatsan e colaboradores (1997), classificando-os em três diferentes linhagens com base em SNPs que ocorrem em altas frequências nos genes *katG* e *gyrA*: grupo 1 – *katG*⁴⁶³ CTG (Leu), *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr); grupo 2 – *katG*⁴⁶³ CGG (Arg), *gyrA*⁹⁵ ACC (Thr); e grupo 3 - *katG*⁴⁶³ CGG (Arg), *gyrA*⁹⁵ AGC (Ser). De acordo com esta consideração o grupo 1, composto pelas espécies *M. microti*, *M. africanum*, *M. tuberculosis* e *M. bovis*, seria o mais ancestral, seguido do grupo 2 e posteriormente o 3, compostos de cepas *M. tuberculosis*. A hipótese foi sustentada devido a presença de mutações e número de cópias do gene IS1081 que são maiores no grupo 1. Desde 2012 são consideradas sete principais linhagens geograficamente estruturadas, que se originaram após eventos evolutivos (GAGNEUX, 2012). A linhagem 1, Indo-Oceânica, compreende as cepas “ancestrais”, que acompanhou a primeira migração humana para fora da África em direção ao Oceano Índico. Estas não apresentam a deleção da região genômica TbD1 (BROSCH et al., 2002). A linhagem 2, do Leste-Asiático, inclui entre outras cepas, as da família

Beijing (*M. tuberculosis*) (TSOLAKI et al., 2005). A linhagem 3 engloba cepas da Índia e Leste da África (GALAGAN, 2014). A linhagem 4, Euro-Americana, compreende as cepas inicialmente classificadas como grupo 2 e 3 (BAKER et al., 2004; MARMIESSE et al., 2004; SREEVATSAN et al., 1997). As linhagens 5 e 6, da África Ocidental 1 e África Ocidental 2, respectivamente, englobam a espécie *M. africanum* (MOSTOWY et al., 2004). A linhagem 7, identificada na Etiópia, compreende cepas de *M. tuberculosis*, que filogeneticamente localiza-se entre as linhagens 4 e 1 (FIRDESSA et al., 2013). Deve-se apontar ainda que as cepas associadas a animais já foram sugeridas como linhagem 8 (BORITSCH et al., 2014).

A tuberculose no passado

Mycobacterium tuberculosis é o parasito mais explorado em estudos paleogenéticos (IÑIGUEZ, 2014). Uma das indagações da comunidade científica era se a infecção já existia no continente Americano antes da chegada dos colonizadores Europeus. No Velho Mundo a tuberculose já foi reportada no Reino Unido, Hungria, Israel, Egito, Alemanha, entre outros, conforme a revisão mais atual proposta por Roberts (2015). Estas descrições demonstraram que a infecção já circulava fora das Américas em período pré-Colombiano. Entre os Nativos Americanos, um estudo já vinha apontando evidência de tuberculose (REQUENA, 1945). Em 1973, Allison e colaboradores sugeriram um caso de tuberculose em uma criança Peruana da cultura Nazca, com idade entre 8 e 10 anos, datada de 700 anos AD. Por meio de análises histológicas e radiografias, observaram entre outros sinais paleopatológicos, a doença de Pott, mas a evidência molecular ainda não tinha sido demonstrada. (ALLISON; MENDOZA; PEZZIA, 1973). Referente a primeira detecção de aDNA aponta-se o estudo de Spilgeman e Lemma (1993) que por PCR identificaram *M. tuberculosis* em ossos de remanescentes humanos também com evidências paleopatológicas da doença. Mas de fato a confirmação sobre a presença da infecção nas Américas antes da chegada dos Europeus foi dada com o trabalho de Salo e colaboradores (1994). A detecção molecular do bacilo (alvo IS6110) em uma múmia Peruana da cultura Chiribaya Alta, datada de 1000 anos atrás, sugestiva de tuberculose primária pulmonar, afirmou a circulação da infecção na América pré-Colombiana (SALO et al., 1994). Mais tarde, outros estudos também demonstraram a presença da tuberculose no Novo Mundo antes e pós contato por meio de abordagens moleculares, histológicas e paleopatológicas, (ARRIAZA et al., 1995; GERSZTEN; GERSZTEN; ALLISON, 2001; GUICHÓN et al., 2015; KLAUS et al., 2010; KONOMI et al., 2002). Gómez I Prat e De Souza (2003) sugeriram que europeus teriam trazido cepas menos virulentas, o que teria favorecido a disseminação entre

ameríndios até então vulneráveis. Também presume-se que o MTC acompanhou a primeira onda de migração para fora da África em direção ao Oceano Índico, que ocorreu há aproximadamente 70.000 anos atrás, e posteriormente, a segunda onda em direção a Eurásia, há 46.000 anos atrás (COMAS et al., 2013). Grupos vindos da Eurásia, teriam alcançado a América pelo Estreito de Bering, rota transpácífica ou costal (ARAÚJO et al., 2008; LIMA, 2006). Interessantemente, Bos e colaboradores (2014) revelaram cepas de MTC recuperadas em remanescentes do Peru (1.000 anos AD) que filogeneticamente se agrupavam mais próximas à cepas associadas a focas e leões marinhos. A hipótese desses mamíferos terem servido como porta de entrada para a infecção no continente também não pode ser descartada.

No Brasil, há ausência de evidências de tuberculose pré-Colombiana. Gómez I Prat e De Souza (2003) destacam a suscetibilidade para a infecção entre nativos ameríndios antes do contato com Europeus. É possível que diferentes cepas da bactéria, ausência de imunidade e determinantes socioculturais tenham influenciado na aquisição do agravo (GÓMEZ I PRAT; DE SOUZA, 2003). Jaeger e colaboradores (2012) demonstraram pela primeira vez a presença da infecção no Rio de Janeiro em período colonial. Os autores aplicaram alvos moleculares IS6110 e IS1081 para detecção de *M. tuberculosis* em amostras de indivíduos recuperados no sítio arqueológico Igreja Nossa Senhora do Carmo (séculos XVII ao XIX). A análise foi feita em ossos, dentes e sedimentos relacionados a órgãos frequentemente afetados por tuberculose pulmonar e óssea. A detecção da infecção em 53,1% (17/32) dos indivíduos sugere uma alta prevalência no Rio de Janeiro durante o período. A análise de haplótipos da região HVS-I do mtDNA mostrou que a maioria (91,3%) tinham ancestralidade Europeia, revelando a contribuição desses indivíduos na dispersão da tuberculose no Novo Mundo. Outro estudo também conduzido por Jaeger e colaboradores (2013) demonstraram a circulação de MTC em população escrava no sítio cemitério dos Pretos Novos, Rio de Janeiro, séculos XVIII-XIX. Este sítio foi composto de 95% de negros que nasceram na África e que morreram ao chegarem à América (PEREIRA, 2007). Mesmo com ossos submetidos a cremação, prática realizada após a descarnação, para liberação de mais espaços nos enterramentos, foi possível a identificação em 4/16 (25%) indivíduos por meio do alvo molecular IS6110 e em 3 desses houve a confirmação com o IS1081. A determinação de haplótipos mitocondriais mostrou 3 indivíduos com ancestralidade matrilinear Africana (L3e2, L3d1 e L1c2), o que corroborou com informação sobre a presença da infecção na África durante o período colonial (CUMMINS, 1929). Embora o estudo não tenha definido quais cepas estavam circulando entre os escravos,

se de origem Europeia ou Africana, foi possível afirmar que a infecção foi transportada para o Brasil juntamente com os escravos.

Sem dúvidas a tuberculose, ou tísica pulmonar, como referida por Sigaud, causou devastações tanto no Brasil como na Europa durante o século XVIII. Estatisticamente 65% dos pacientes que davam entrada no hospício de tísicos do Rio de Janeiro morriam ao longo de 6 meses. Entre os negros, a tísica pulmonar era uma das doenças que poderia ser colocada em primeiro lugar em termos de danos à saúde pública (SIGAUD, 2009a).

A doença

O estabelecimento da infecção é inicialmente resultante da presença de *M. tuberculosis* e da resposta imunológica do hospedeiro (COLLINS; KAUFMANN, 2001). A transmissão do bacilo ocorre por via aerógena, em que um indivíduo inala gotículas, também conhecidas como gotículas de Pflügge, contendo o microrganismo que é liberado pelo espirro, fala ou tosse de outro indivíduo na fase ativa da doença. As gotículas mais pesadas caem no solo e as mais leves podem permanecer em suspensão no ar por diversas horas, sejam por serem pequenas ou por evaporarem (LOPES et al., 2006). Alguns fatores são essenciais para a transmissão do bacilo, como presença de ventilação e luz solar, que são fatais para *M. tuberculosis*, bem como o tempo de exposição, sendo necessário 100 – 200 horas para uma infecção bem sucedida (LOPES et al., 2006). Aquelas gotículas com diâmetro de até 5µm e com 1 ou 2 bacilos podem atingir as vias aéreas respiratórias do hospedeiro, que dependendo de seu estado imunológico, pode progredir para diferentes cenários clínicos: cura espontânea, doença, infecção latente, reativação ou reinfeção (revisado por GODREUIL; TAZI; BAULS, 2007). A evolução para a tuberculose primária, que ocorre em 5-10% dos infectados, usualmente aparece de 1-2 anos após a infecção inicial, ocasionando lesões no pulmão, tosse e sangramento respiratório, caracterizando a tuberculose pulmonar (CAMPOS, 2006; SMITH et al., 2009). Embora *M. tuberculosis* possa atingir qualquer órgão, esta forma é a presente na maioria dos casos. A forma extrapulmonar ou miliar ocorre em 15-20% dos casos adultos e caracteriza-se pela disseminação da bactéria em outros tecidos do hospedeiro (DONOGHUE, 2009). A apresentação dos sintomas dependerá do órgão afetado (CAMPOS, 2006). A forma esquelética da doença ocorre quando o bacilo invade o osso via circulação sanguínea. Corresponde em até 3% do total dos casos, sendo que metade apresentam envolvimento da coluna vertebral, caracterizando a doença de Pott, mas também outras partes ósseas podem ser afetadas, como

costelas e crânio (BICK, 1976; TULI, 2002). A presença dessas lesões ósseas pode sugerir evidências da presença do bacilo, mas não são sinais patogênicos para diagnóstico paleopatológico. A infecção por *M. tuberculosis* leva a desmineralização do osso, destruição, mudanças reativas e impedimento da regeneração do tecido (PANUEL et al., 1999).

Diagnóstico

Até o final da década de 1830 o diagnóstico para tuberculose era impreciso, devido principalmente, a falta de padronização no reconhecimento da causa da morte (WILBUR et al., 2008). Métodos moleculares têm sido utilizados na identificação da micobactéria em amostras arqueológicas (COOPER et al., 2016; DONOGHUE, 2017; DONOGHUE et al., 2005; MÜLLER; ROBERTS; BROWN, 2014). Contudo, fatores inerentes ao trabalho com aDNA trazem limitações quanto ao diagnóstico da infecção, como o estado de preservação, por exemplo, que influencia drasticamente na conservação do material genético (HANDT et al., 1994). Além disso, a presença de MBNT (micobactérias não-tuberculosas) em sítios arqueológicos podem tornar o diagnóstico específico mais difícil. Entretanto, abordagens utilizando como alvos moleculares sequências de inserção, como o IS6110 e o IS1081, tem fornecido identificação pelo menos a nível de MTC (BOUWMAN et al., 2012; DABERNAT et al., 2014), e outros alvos ainda permitem a genotipagem do complexo, como principalmente, *gyrA*, *gyrB*, *katG*, *oxyR*, *rpoB* (*beta subunit of RNA polymerase*), *leuB*, *TbD1*, *pncA*, *mtp40*, (DABERNAT et al., 2014; FLETCHER, 2003; MÜLLER; ROBERTS; BROWN, 2014; TAYLOR et al., 1996).

Sem o conhecimento de dado clínico, bioquímico, histológico e bacteriológico, o diagnóstico paleopatológico para tuberculose pode ser difícil (PANUEL et al., 1999). As lesões ósseas estão presentes apenas em uma parcela da população, sendo manifestas em apenas 3% dos casos, como já mencionado, e por isso não representam a prevalência da doença em uma população (HOLLOWAY et al., 2011). São frequentemente típicas mas não específicas, ou seja, não podem ser consideradas como sinais para diagnóstico de tuberculose, por aparecerem também em outras doenças infecciosas (WILBUR et al., 2009). Por exemplo, de 1-4 vértebras lombares e/ou torácicas são usualmente afetadas pelo *M. tuberculosis*, potencialmente levando a fusão destas, como na doença de Pott, mas brucelose, infecções fúngicas, artrite séptica, doenças neoplásicas e osteoporoses, podem também apresentar estas condições, complicando o diagnóstico diferencial (WILBUR et al., 2009). Contudo, Rothschild e Rothschild (1999)

descreveram que o envolvimento vertebral associado a formação óssea reativa, seria um sinal altamente específico para tuberculose. Outras discussões acerca do diagnóstico paleopatológico diferencial para tuberculose também tem sido apresentadas (BAKER, 1999; LAGIER et al., 1999; PANUEL et al., 1999). Ortner (2003) discorre que a distribuição das lesões em diferentes partes do esqueleto pode variar de acordo com a idade.

Diagnósticos atuais para *M. tuberculosis* podem ser realizados em uma variedade de tipos de amostras, como escarros, líquido pleural, urina, biópsias, medula espinhal, entre outros (MACHADO; COUTO; VIVEIROS, 2018). Os métodos para diagnosticar a infecção podem ser imunológicos, histopatológicos, moleculares, bacteriológicos ou radiológicos (CAMPOS, 2006). Nos bacteriológicos, os mais frequentemente utilizados em rotina, o bacilo pode ser identificado diretamente por meio de coloração de Ziehl-Neelsen e visualizado ao microscópio óptico, sendo este um método simples, rápido e de baixo custo. A sensibilidade é de 20-80% e a positividade se dá quando o indivíduo apresenta pelo menos 5.000 bacilos/ml (MACHADO; COUTO; VIVEIROS, 2018). Outra forma de detecção da bactéria é por cultura celular, que é considerado o padrão-ouro por ser mais sensível e específico, principalmente quando comparado às técnicas moleculares, e ainda, é possível testar susceptibilidade a antibióticos e diferenciar a partir das MBNT (MACHADO; COUTO; VIVEIROS, 2018). No entanto, este requer maior estrutura laboratorial e pelo menos 40 dias para liberação de resultado, devido ao lento crescimento do bacilo (CAMPOS, 2006). Avanços na biologia molecular, como por exemplo, novos reagentes e ferramentas, além do sequenciamento do genoma completo (COLE et al., 1998), tem proporcionado a identificação de mutações em genes relacionados a resistências a drogas (HAMEED et al., 2018). Dentre os métodos moleculares, a PCR tem sido empregada na rotina de muitos laboratórios seja a partir de culturas ou de espécimes (MACHADO; COUTO; VIVEIROS, 2018). Foi utilizada pela primeira vez na detecção e identificação do *M. tuberculosis* em 1989 (HANCE et al., 1989). Os principais genes usados na detecção do bacilo e identificação de mutações associadas à resistências a antibióticos são *rpoB*, *pncA*, *embA* (arabinosiltransferase A), *embB* (arabinosiltransferase B), *embC* (arabinosiltransferase C), ITS, *katG*, conforme revisado por Brossier e colaboradores (2017).

Devido aos sinais clínicos da doença geralmente não serem específicos (NORBIS et al., 2013), o diagnóstico pode ser demorado, resultando em um prolongado estado infectivo. A vacina utilizada atualmente foi desenvolvida por Calmette e Guérin em 1920 após 230 passagens *in vitro* de *M. bovis* até que encontrassem o equilíbrio entre a redução da virulência e a preservação da imunogenicidade (CALMETTE; GUERIN, 1920). Entretanto, o impacto da

proteção por meio da vacina é limitado, uma vez que confere imunidade apenas a recém-nascidos contra meningite e tuberculose disseminada. A OMS aponta para a complexidade que é verificada entre a interação do bacilo com o hospedeiro, fato que ainda não é muito entendido (WHO, 2019a). Contudo, esforços vêm sendo realizados na área de imunologia e genética a fim de que novas vacinas sejam desenvolvidas (WHO, 2019a).

Epidemiologia

Mundialmente, a tuberculose está entre uma das 10 principais causas de mortes (WHO, 2018), o que é um reflexo da desigualdade social, principalmente entre países com piores condições socioeconômicas, como nível de escolaridade, renda e quantidade de moradores por domicílio. Estas variáveis afetam entre outros aspectos, o acesso à informação e serviços de saúde (HIJJAR; CAMPOS; FEITOSA, 2013; SANTOS et al., 2007) A Organização Pan Americana de Saúde reportou, que embora menos pessoas tenham adoecido e morrido por tuberculose em 2017, ainda não são suficientes os esforços globais para alcançar a erradicação até 2030 (PAHO, 2018). Estima-se que 23% da população mundial tenha a infecção na forma latente estando sob o risco de desenvolver a forma ativa durante a vida. Dados estatísticos mostraram que em 2017 cerca de 1.3 milhões de pessoas morreram por tuberculose e 10 milhões desenvolveram a doença, sendo 3% presente nas Américas (WHO, 2018). As regiões com maior incidência foram a Índia, China, Indonésia, Filipinas, Paquistão, Nigéria, Bangladesh e África do Sul. Ainda que em última posição, o Brasil está entre os 30 países que mais concentram casos da doença no mundo. Em 2017, foram notificados 44/100.000 hab. de casos novos (WHO, 2018).

Desde 2015 iniciativas vem sendo tomadas para o cumprimento do plano conhecido como *The end TB Strategy*, que propôs estratégias globais para a prevenção, cuidado e controle da tuberculose (WHO, 2015). O objetivo principal é a erradicação da tuberculose epidêmica, e para isso, metas de redução da mortalidade em 75% e diminuição em 50% da incidência até 2025 foram traçadas (WHO, 2015).

A RR-TB (tuberculose resistente a rifampicina) e a MDR-TB (tuberculose multirresistente) são preocupações constantes. Globalmente em 2017, 558 mil pessoas desenvolveram RR-TB e desses, 82% teve MDR-TB (WHO, 2018a). A Índia, China e a Rússia concentraram o maior número de casos de RR-TB Outras populações são apontadas como mais vulneráveis à infecção, como pessoas soropositivas para o HIV, moradores de rua, presidiários,

usuários de álcool e drogas, residentes de ambientes com alta densidade populacional, renda e escolaridade baixas (FURLAN et al., 2017; MURRAY, 2017; SIMOU; BRITTON; LEONARDI-BEE, 2018). Estudos tem apontado diferenças na distribuição da tuberculose em diversas etnias, condições socioeconômicas e acesso a serviços de saúde (CASTRO et al., 2016; DOU et al., 2015; KASTIEN-HILKA et al., 2016; MENDES et al., 2016). A disseminação da infecção para outros indivíduos é facilmente propagada, tornando a erradicação mais difícil, devendo-se considerar ainda o estado imunológico do hospedeiro, resistência a antibióticos e acesso a serviços de saúde (MURRAY, 2017; PRADIPTA et al., 2018).

SÍFILIS

Treponema pallidum

A ordem Spirochaetales se subdivide em 4 famílias e 14 gêneros, sendo 3 responsáveis por doenças humanas, *Treponema* e *Borrelia*, pertencentes à família Spirochaetaceae, e *Leptospira*, pertencente à família Leptospiraceae (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). A espécie *Treponema pallidum* engloba três subespécies de importância médica: *T. p.* subsp. *pallidum*, *T. p.* subsp. *endemicum* e *T. p.* subsp. *pertenue*, agentes causadores da sífilis venérea e congênita, sífilis endêmica ou bejel, e boubá, respectivamente. Uma segunda espécie, *Treponema carateum*, causadora da pinta, compõe junto com estas subespécies o grupo das treponematoses, que são doenças distintas mas com notáveis semelhanças e que afetam humanos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; POWELL; COOK, 2005). *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* foi isolada pela primeira vez em 1912 e os dados foram publicados em 1914 (NICHOLS, 1914). A cepa, que recebeu o nome do cientista Henry Nichols, amplamente utilizada em estudos atualmente (ARORA et al., 2016; ČEJKOVÁ et al., 2012; KUMAR JAISWAL et al., 2017; VAULET et al., 2017), foi isolada a partir do sistema nervoso de um paciente em Washington, e em seguida, propagada em coelhos. Na época referida como *Spirochaeta pallida*, foi sequenciada completamente em 1998 (FRASER et al., 1998) e em 2013 Pětrošová e colaboradores repararam, por meio de NGS, erros anteriormente publicados (PĚTROŠOVÁ et al., 2013). Morfologicamente, *T. pallidum* é classificada como uma Gram-negativa muito fina e espiralada, com medidas variando entre 0,1 a 0,2 x 6 a 20µm, e de extremidades muito afiladas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017). Estas *Treponemas* exibem similaridades bioquímicas, morfológicas, histológicas, microbiológicas, genética e

antigênica (ANTAL; LUKEHART; MEHEUS, 2002; NORRIS, 1993; ŠMAJS; STROUHAL; KNAUF, 2018).

Treponematoses

Para indivíduos infectados e não-tratados, as TRE evoluem progressivamente para outros estágios (POWELL; COOK, 2005). Comum as quatro infecções, os estágios iniciais compreendem as fases primária e secundária, e o estágio tardio, que englobam as fases latente e terciária. A fase secundária é altamente infectiva, devido ao grande número de espiroquetas circulantes. Antes da evolução para a fase terciária, há uma fase de latência, em que há regressão dos sinais clínicos devido a resposta imunológica do hospedeiro. Esta etapa pode ter duração de pelo menos 20 anos, contudo, apenas 1/3 dos indivíduos não-tratados seguirão para a fase seguinte, que é mais agressiva para o hospedeiro. Para o tratamento, doses de penicilina em estágios iniciais são recomendadas, desde a sua primeira administração terapêutica na década de 1940 (HOOK; PEELING, 2004). Em casos de alergia, outros antibióticos podem ser utilizados, como azitromicina, por exemplo (RIEDNER et al., 2005).

A sífilis é o tipo de TRE mais severa e de maior impacto para a saúde pública. Pode ser transmitida sexualmente (sífilis venérea ou adquirida) ou da mãe infectada para o filho (sífilis congênita) por meio da placenta ou canal do parto. Pode afetar diferentes órgãos e tecidos, inclusive o sistema nervoso, levando ao óbito do indivíduo em casos de ausência de tratamento. Cerca de 3 semanas após a exposição, surge uma lesão (cancro) ou múltiplas lesões no órgão genital ou outro sítio envolvido na relação sexual. Se não tratada, a bactéria se dissemina via circulação sanguínea e sistema linfático, e após 6 – 8 semanas se inicia a fase secundária, com lesões dispersas pelo corpo, principalmente, palmas das mãos e sola dos pés, além de febres e dores de cabeça. Em aproximadamente 1 ou 2 anos após a exposição, começa a fase de latência, em que há ausência de sintomas e a infecção é detectada apenas por testes sorológicos. Este período pode durar anos. Cerca de 15-40% dos infectados não tratados evoluem para a sífilis terciária (PEELING et al., 2017). Nesta fase, a TPA pode afetar ossos, sistema nervoso central (neurosífilis), coração ou lesões em outras vísceras. Entre estes sinais, as lesões craniais (*caries sicca*) e o alargamento da tibia (tibia em sabre) são os mais comuns, mas todo o esqueleto pode ser afetado (POWELL; COOK, 2005). A transmissão da infecção da mãe para a criança pode ocorrer durante os primeiros 4 anos após a exposição. Praticamente toda mulher infectada em fase primária ou secundária pode transmitir a TPA para o feto, e o resultado varia desde o

nascimento de uma criança saudável até uma criança com sinais clínicos de sífilis congênita (MA; GIACANI; CENTURIÓN-LARA, 2015). Os sinais patológicos da sífilis congênita podem ser divididos em iniciais (até 4 anos de idade) ou tardios (de 5 a 15 anos de idade). Frequentemente, aparecem deformidades ósseas odontológicas, com dentes curtos e estreitos, sendo denominados “dentes de Hutchinson” (POWELL; COOK, 2005).

Bejel, boubá e pinta constituem as chamadas TRE não venéreas ou endêmicas (ANTAL; LUKEHART; MEHEUS, 2002). Em TEN a transmissão ainda não foi completamente elucidada, mas geralmente ocorre por meio do contato com secreções das lesões ou compartilhamento de objetos de uso pessoal e não transmitida sexualmente (GIACANI; LUKEHART, 2014). As lesões primárias são indolores, imperceptíveis ou pequenas, e aparecem frequentemente na cavidade oral. Na fase secundária, as lesões aparecem na região orofaríngea e lábios (GIACANI; LUKEHART, 2014).

A boubá é uma doença não-venérea que afeta comumente crianças por meio do contato com lesões cutâneas. O envolvimento de vetores atuando na transmissão ainda não está bem esclarecido como apontado por Powell e Cook (2005) e Giacani e Lukeart (2014). Na fase primária, cerca de 5 a 8 semanas após a exposição aparece uma lesão isolada geralmente nas pernas, que é indolor mas purulenta (POWELL; COOK, 2005). E alguns casos, lesões nas nádegas, braços, mãos ou rosto também podem ser observadas. Na maioria dos casos, a infecção prossegue para a cura espontânea, para então dar início a fase secundária, aproximadamente de 1 a 2 anos após a exposição. Envolvimento ósseo pode aparecer em alguns indivíduos já nesta fase. Seguindo um período de latência que pode durar anos, inicia-se a fase terciária, em 10% dos indivíduos não tratados. Esta caracteriza-se pela presença de nódulos subcutâneos, tibia em sabre, envolvimento da região nasal, entre outros (GIACANI; LUKEHART, 2014).

A terminologia pinta pode variar de acordo com cada país. No México e Cuba é conhecida como “mal de pinto”, “enfermedad azul” no Chile e Peru, e “carate” ou “crute” na Venezuela e Colômbia. *Treponema carateum* não é capaz de causar lesões ósseas, apenas manifestações cutâneas, apresentando-se sob a forma de lesões despigmentadas que podem perdurar por anos. Possivelmente, o principal modo de transmissão se dá pelo contato pele a pele. Até o momento não há relatos de envolvimento do sistema nervoso central e nem de transmissão vertical (GIACANI; LUKEHART, 2014). Pouco se conhece sobre este microrganismo, talvez pela restrição de modelos animais para estudo, visto que experimentalmente, é capaz de infectar apenas primatas não-humanos. Outro aspecto é a ausência do sequenciamento de seu genoma completo, o que impede maiores comparações com

as subespécies de *T. pallidum* e a classifica como uma espécie (GIACANI; LUKEHART, 2014).

Origem da sífilis

A origem da sífilis é controversa. Três hipóteses foram propostas para explicar a emergência da doença: a Pré-Colombiana (I), que sugere que a sífilis e outras TRE existiram por todo o Velho Mundo antes do período da grande epidemia, mas foram erroneamente diagnosticadas com outras doenças, principalmente com a hanseníase (HACKETT, 1963); a Colombiana (II), que sugere que a doença emergiu nas Américas e, posteriormente, levada à Europa pelos exploradores europeus (CROSBY, 1969). A falta de imunidade contra a infecção teria facilitado a dispersão entre os europeus. Registros etnográficos suportam o uso de plantas medicinais para o tratamento da sífilis no Novo Mundo (ANTAL; LUKEHART; MEHEUS, 2002; SANTOS; GARDNER; ALLSWORTH-JONES, 2013). Por último, a Unitária (III), que sugere a existência de uma única TRE que se manifesta de acordo com diferentes condições climáticas e geográficas, e também com diferentes estágios de desenvolvimento cultural de cada população (HUDSON, 1965). Assim, as TRE sempre estariam distribuídas por todo o mundo de maneira uniforme (HUDSON, 1965).

A proposta clássica de Hackett (1963) sugere que a origem da *T. carateum* teria sido na Afro-Ásia há 16.950 anos AP e posteriormente se dispersou pelo mundo. Finalmente, teria se restringido apenas ao continente Americano. Ainda propõe que mutações teriam ocorrido na espécie causadora da pinta, dando origem a TEN, há 11.950 anos AP, na África e Ásia, espalhando-se para Austrália e Ilhas do Pacífico, mas não atingindo à América. O clima árido e quente nestas regiões teria favorecido o aparecimento da TPE, há 8.950 anos AP. Seguindo o curso da evolução, há 4.950 anos AP teria ocorrido o surgimento da TPA no Sudeste da Ásia, seguindo para o Norte da África e Europa. A dispersão para o restante do mundo teria sido intensificada a partir do século XVI com a colonização Europeia, o que também poderia ter contribuído para a disseminação da boubas nas Américas e na Ásia.

De Melo (2010) reuniram dados paleopatológicos de evidências de TRE pré-Colombiana em todo o mundo e informações moleculares de 21 regiões de genomas de TPA, TPE e TEN, para serem aplicados à abordagem de relógio molecular para estimarem a idade do ancestral comum mais recente. Foram testados três diferentes cenários para exploração das hipóteses de origem da sífilis: (I) TRE seguiram com a evolução humana estando presente desde

o *Homo erectus*; (II) Sífilis venérea surgiu de uma cepa menos virulenta há 500 anos atrás no Velho Mundo, e (III) Sífilis venérea emergiu nas Américas entre 16.500 – 5.000 anos AP, períodos referentes a entrada do homem no continente e a evidência mais antiga da doença da América, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que a taxa evolutiva é mais compatível com a emergência da infecção nas Américas, corroborando para a hipótese Colombiana, e nenhuma evidência de cepas europeias antes da pandemia de sífilis foi detectada (ARORA et al., 2016). Contudo, os prováveis casos fora do continente não podem ser explicados (ARORA et al., 2016; DE MELO et al., 2010).

Paleogenética de treponematoses

Estudos paleogenéticos das TRE são uma excelente oportunidade para responder questões sobre a origem e dispersão dos agravos. Entretanto, a impossibilidade de detecção de aDNA de *T. pallidum* em remanescentes humanos já foi reportada. Bouwman e Brown (2005) foram capazes de recuperar mtDNA em 25/46 amostras de ossos de indivíduos de sítios arqueológicos ingleses datados entre os séculos IX e XIX. A maior parte dos indivíduos apresentava evidências paleopatológicas de TRE. Este resultado indica que os ossos analisados estavam em condições de preservação que permitiram a extração de aDNA humano amplificável. Entretanto, o mesmo não foi verificado na análise do DNA de *T. pallidum*, pois após aplicarem sete diferentes alvos moleculares da bactéria, foram observados somente resultados negativos. Os autores concluíram que aDNA de *T. pallidum* não é preservado em ossos humanos e, portanto, não pode ser utilizado no diagnóstico da sífilis venérea. Características fisiológicas da bactéria não contribuem para a preservação do material genético após a morte do indivíduo. *Treponema pallidum* possui uma membrana pobre ou escassa em fosfolipídios, que age como uma barreira física impedindo a ação de enzimas endógenas que degradam o DNA. Barnes I e Thomas MG (2006) estudaram a detecção de *T. pallidum* em remanescentes humanos com modificações osteológicas características de sífilis, provenientes dos EUA e Inglaterra e datadas dos séculos XVIII e XX. Foi discutido que a não recuperação de DNA de *T. pallidum* pode ser explicada por diversas razões. Os autores citam a ausência de bactéria no osso, a baixa carga bacteriana ou a ausência de integração do DNA do parasito ao osso do hospedeiro. Von Hunnius e colaboradores (2007) justificam a falha na detecção do material genético da bactéria devido à baixa preservação do aDNA, dada a ausência de lipopolissacarídeos nas membranas de *Treponema pallidum*. Em contrapartida, outros autores demonstraram sucesso em identificar o material genético da bactéria. Kolman C e

colaboradores (1999) utilizaram o marcador molecular *tpp15* para detectar *T. pallidum* em material arqueológico de um indivíduo datado de 240 ± 50 AP, recuperado na Ilha de Páscoa, Chile, com lesões características de sífilis. A detecção molecular confirmou o diagnóstico e mostrou o primeiro estudo de recuperação do aDNA da bactéria. Em 2012, Montiel R e colaboradores apresentaram resultados de recuperação de aDNA de TPA em amostras ósseas de remanescentes neonatos recuperados a partir da cripta de "La Ermita de la Soledad" (séculos XVI-XVII), na Espanha. A detecção de aDNA foi realizada por meio da aplicação de PCR utilizando diferentes alvos moleculares. Segundo os autores, o principal fator para o sucesso da detecção foi o estudo de indivíduos neonatos com sinais de sífilis congênita como fonte de pesquisa para aDNA. Quanto mais jovem for o indivíduo, mais fácil será a recuperação de aDNA amplificável, devido ao alto número de espiroquetas disseminadas pelo corpo, o que facilitaria a detecção, discutiram os autores. Gogarten e colaboradores (2016) reforçaram que em estágio primário da doença, quando não há a presença de lesões, a carga bacteriana é maior. Geralmente as lesões ósseas aparecem no estágio terciário e acometem principalmente adultos e, portanto, a análise genética de indivíduos jovens e sem manifestações ósseas, possibilita o estudo molecular. Embasados neste conceito, os autores testaram amostras ósseas não lesionadas de primatas não-humanos, para verificarem a possibilidade de detecção molecular de TPA. A análise das leituras obtidas após o NGS revelou a presença de *T. pallidum* em todas as amostras estudadas, que tinham sido previamente negativas por PCR. O estudo além de ter contribuído com novas sequências de aDNA de *T. pallidum* detectadas em primatas não-humanos, mostrou que estes animais agem como reservatórios potenciais para *T. pallidum*. Portanto, a metodologia pode ser aplicada em análise genética de TRE (GOGARTEN et al., 2016).

Em amostras arqueológicas, o aumento das chances na detecção de aDNA de *Treponema* sp. tem sido viabilizado pelo uso do NGS. Em Arora e colaboradores (2016), a aplicação de NGS pela primeira vez em cepas provenientes de pacientes com sífilis mostrou a separação de dois *clusters* de TPA correspondentes a dois períodos distintos, antes e após o tratamento com antibióticos (Fig 3). Se sugere que um dos grupos teve provável origem na segunda metade do século XX, período em que a incidência de sífilis foi reduzida devido à introdução de antibióticos, estaria relacionado à resistência à medicamentos, especialmente azitromicina.

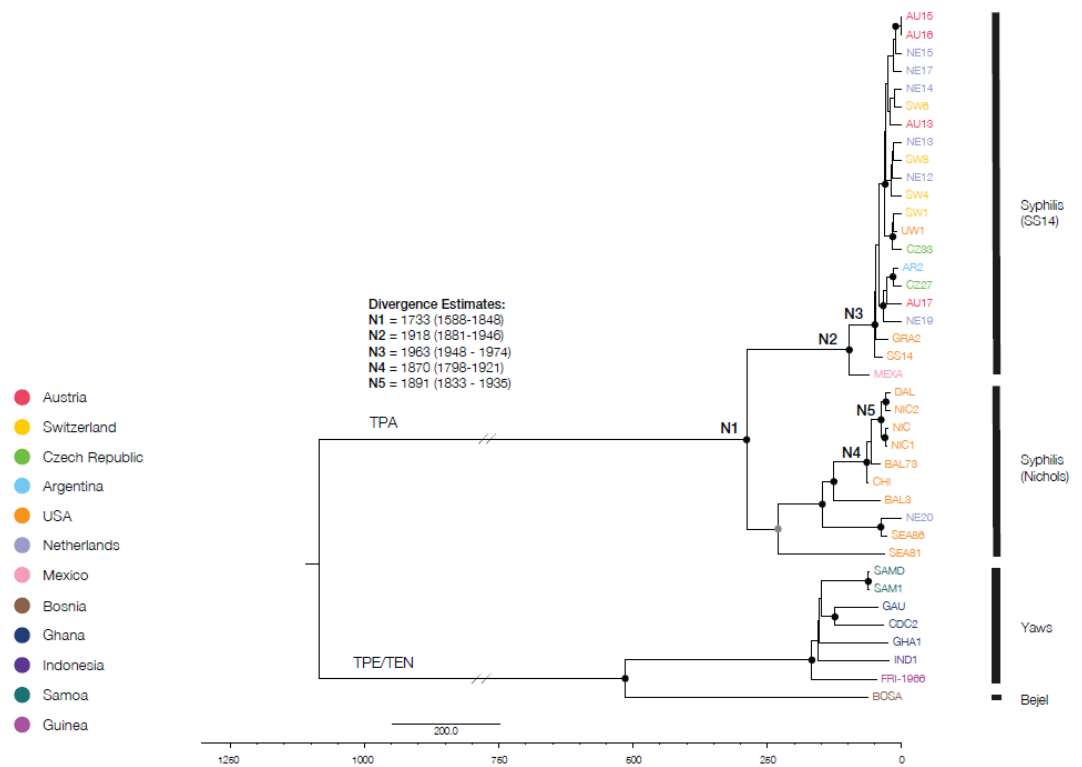


Fig 3: Árvore filogenética de 39 genomas, mostrando a separação entre cepas de *Treponema pallidum*. Círculos pretos indicam $\geq 99\%$ de robustez e círculo em cinza indica 82% (modificado de Arora e colaboradores (2016)).

Mais recentemente, Schuenemann e colaboradores (2018) reportaram no México, por meio de NGS e análises filogenéticas, os achados de TPA e TPE em indivíduo em idade perinatal e crianças, com evidências paleopatológicas, datados entre os séculos XVII ao XIX (Fig 4). A surpreendente detecção de TPE em um indivíduo de aproximadamente 6 meses de idade, apontou; a possível existência de boubá congênita.

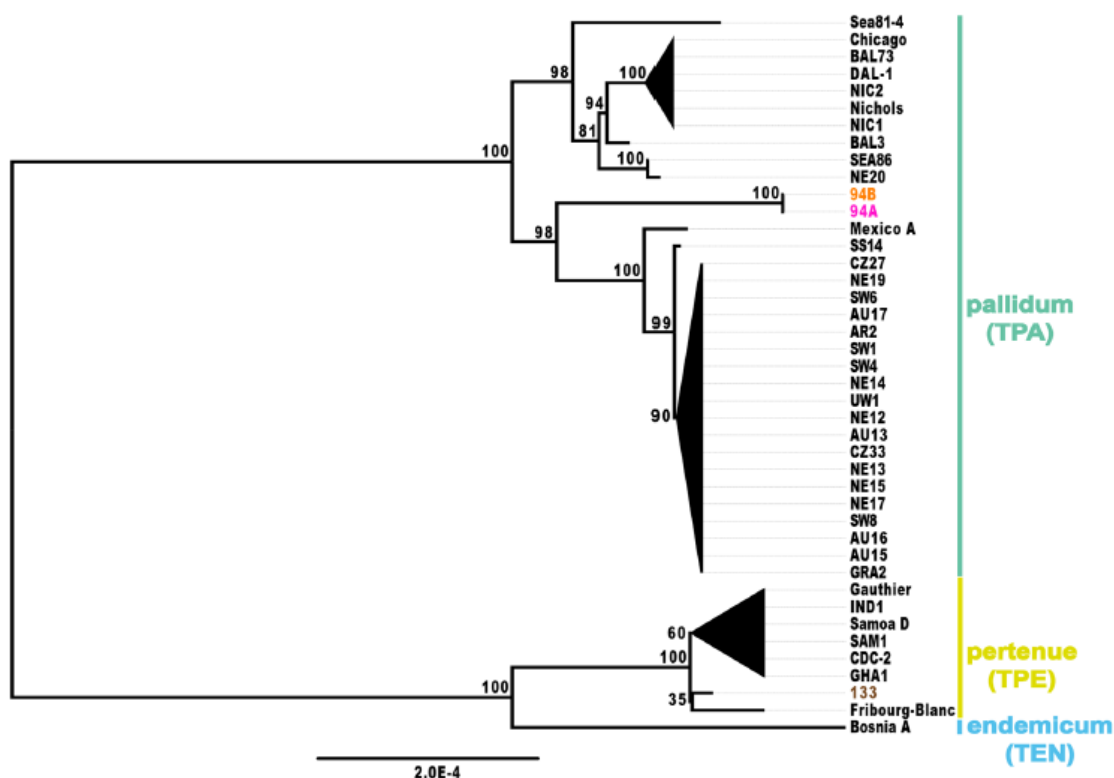


Fig 4: Árvore de máxima verossimilhança com *bootstrap* para 39 cepas modernas e 3 cepas ancestrais. A cepa 94A e 94B agruparam com o clado TPA enquanto a cepa 133 agrupou com o clado TPE (SCHUENEMANN et al., 2018).

Paleoepidemiologia e epidemiologia atual

A sífilis foi epidemiologicamente relatada pela primeira vez em 1495 na Europa (POWELL; COOK, 2005). Mas de acordo com Sigaud (2009b) a sífilis já circulava entre indígenas que nunca tinham tido contato com Europeus. Em meados do século XIX, a doença já seria predominante no Brasil, segundo menção de Sigaud, que acompanhou e tratou diversos pacientes no país (CARRARA, 1996). “O Brasil parecia ser a morada ideal da sífilis”, “pois há brasileiro que não tenha sua tara sífilítica?”, frases como estas eram comumente ditas por médicos e familiares que viviam em meio a grave situação de epidemia no Rio de Janeiro (CARRARA, 1996). A boubia teria sido introduzida juntamente com os Africanos, que após disseminação pelo país, manteve altos níveis de endemicidade (SIGAUD, 2009c). Em Sigaud (2009d) pode ser consultado detalhadamente o tratamento com ervas aplicadas às vítimas. Durante o período colonial estas eram as únicas TRE de maior circulação no Rio de Janeiro. Bejel não é endêmica no continente Americano. Apenas um caso reportado recentemente em Cuba (NODA et al., 2018). E pinta, no Brasil, foi relatada apenas em comunidades indígenas da Amazônia (GIACANI; LUKEHART, 2014; GUIMARÃES et al., 1948).

Mesmo com o avanço de métodos de diagnóstico e tratamento eficazes contra a sífilis, nos últimos 5 anos foi observado um constante aumento no número de casos de sífilis no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A sífilis tem ampla distribuição geográfica com mais de 25% dos novos casos presentes nas Américas (CHESSON; MAYAUD; ARAL, 2017). Cerca de 6 milhões de novos casos ocorrem em adultos de 15 a 49 anos de idade em todo o mundo (WHO, 2016). No Brasil, elevada incidência de sífilis em gestantes, congênita e adquirida tem sido observada, sendo notificados só no ano de 2016 aproximadamente 38.000, 20.000 e 88.000 casos, respectivamente, sendo a maior proporção na Região Sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). A incidência de sífilis congênita e a detecção em gestantes por mil nascidos vivos teve um aumento de 3 vezes entre 2010-2016, e em relação a sífilis adquirida, a taxa de aumento foi de 2 casos/100.000 hab. em 2010 para 42,5 casos/100.000 hab. em 2016, de acordo com o último boletim do ministério da saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Estas taxas de aumento podem ser devido à redução do uso de preservativos e a falta de medicamentos básicos, como penicilina. Adicionalmente, aponta-se também a uma maior cobertura de triagem, com a ampliação do uso de testes rápidos, e o aprimoramento do sistema de vigilância (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Estes recentes dados epidemiológicos apontam para a importância da educação da população e controle da disseminação da infecção.

Desde 2009, iniciativas como, o fortalecimento dos sistemas de saúde, detecção e tratamento precoces da sífilis, que foram publicadas pela OPAS e adotadas por alguns países, têm contribuído para a diminuição da taxa de transmissão de sífilis de mãe para o feto (PAHO, 2009). A Organização Mundial de Saúde objetiva reduzir em 90% a incidência de sífilis até 2030 (WHO, 2016). De acordo com revisão de PEELING et al., (2017) os esforços aplicados até o momento foram responsáveis pela diminuição do número global de sífilis em gestantes e congênita, com reduções de 38% e 39%, respectivamente. Embora muitos países tenham contribuído para a diminuição da prevalência da sífilis neste conjunto populacional, o continente Africano ainda continua estável nas taxas de prevalência (PEELING et al., 2017).

Sífilis endêmica ou bejel foi previamente detectada no Norte da Europa, Rússia, Mongólia, Oriente Médio, Leste do Mediterrâneo e África (GIACANI; LUKEHART, 2014). Entretanto, investimentos em áreas sociais e econômicas, resultaram na diminuição do número de casos (GIACANI; LUKEHART, 2014). Mas focos ainda têm sido observados no Oriente Médio e na África (PEELING et al., 2017). Recentemente, casos previamente diagnosticados como sífilis venérea em Cuba foram posteriormente confirmados como TPE pelo diagnóstico molecular (NODA et al., 2018). A doença está presente em áreas de climas temperados e secos;

circula tipicamente em crianças de até 15 anos de idade, habitantes de áreas rurais, onde os cuidados médicos são escassos e padrões de higiene são pobres (POWELL; COOK, 2005).

Bouba ou framboesia afeta a crianças de até 15 anos de idade que vivem em comunidades pobres com fornecimento de água limitado, de climas frios, úmidos e áreas de florestas tropicais da África, América, Ásia e Ilhas do Pacífico (WHO, 2019b). Como revisado por Giacani e Lukehart (2014), entre os anos de 2010 e 2011, Vanuatu, Papua-Nova Guiné e Ilhas Salomão reportaram aproximadamente 2.000, 35.000, 21.000 casos, respectivamente. A notificação à OMS não é compulsória, o que pode resultar em subestimação dos casos (WHO, 2019b). Não existem dados epidemiológicos da doença nas Américas, portanto, não representa um problema de saúde pública no continente (GIACANI; LUKEHART, 2014). Após o conhecimento do eficaz tratamento com doses de azitromicina, descoberto em 2012, a OMS traçou estratégias para a erradicação de bouba até o ano de 2020 (WHO, 2012).

Pinta é geograficamente distribuída na América Central e Sul, em regiões quentes (semiárido). Jovens menores de 15 anos de idade são os principais hospedeiros de *T. carateum*, (GIACANI; LUKEHART, 2014).

Epidemiologia molecular

Em razão de que *T. pallidum* não pode ser cultivada *in vitro*, o isolamento de cepas só é possível após propagação em animais de laboratório, entretanto, mutações podem ocorrer ao longo das passagens (MA; GIACANI; CENTURIÓN-LARA, 2015). Métodos de tipagem molecular são importantes para caracterização epidêmica, controle de infecções e identificação de cepas resistentes a antibióticos (HO; LUKEHART, 2011). Pillay e colaboradores (1998) desenvolveram o primeiro método de genotipagem de subespécies de *T. pallidum*, conhecido como *CDC Typing*, que é baseado na detecção de sequências repetitivas de 60pb do gene *arp* e genes de múltiplas cópias, da família *tpr*, subfamília II (*tprE* (tp0313), *tprG* (tp0317) e *tprJ* (tp0621)). O método mostrou de 2 a 21 repetições do gene *arp* e 7 perfis de *tpr* baseado em RFLP, designados pelas letras “a” ao “g”. Em 2010 foi proposto um método mais expansivo, englobando além daqueles do *CDC Typing*, mais 3 alvos moleculares, inclusive o alvo tp0548, que tem sido o mais eficaz em genotipagem de TPA (MARRA et al., 2010). Um estudo de diferentes tipos de amostras isoladas de pacientes de regiões geográficas e períodos variados, demonstrou uma distribuição espacial e reinfecções com diferentes subtipos ao longo do tempo (MARRA et al., 2010). Foi observada uma associação do genótipo 14d/f a neurosífilis, visto que estava presente em 50% dos pacientes que tinham este sintoma. Em um dos indivíduos que portava este genótipo, foi detectada uma reinfecção com cepa diferente, 14d/g, anos após a

primeira coleta de sua amostra (MARRA et al., 2010). Em revisões de Ho e Lukehart (2011) e Peng e colaboradores (2011) é possível encontrar um mapeamento de todos os subtipos de TPA globalmente distribuídos. Em 2012, uma metodologia de genotipagem baseada nos genes tp0136, tp0548 e 23S rDNA, descreveu novos genótipos de TPA e mutações associadas à resistências a antibióticos (FLASAROVÁ et al., 2012). Os métodos de tipagem molecular tem permitido detectar reinfecções com a mesma cepa e circulação de genótipos entre populações (MA; GIACANI; CENTURIÓN-LARA, 2015). Apesar da alta identidade genética entre subespécies de *Treponema* (99,8%) (ČEJKOVÁ et al., 2012), a genotipagem molecular tem mostrado SNPs específicos para TPA e variabilidade intraespecífica (ARORA et al., 2016). Análises realizadas com base no gene tp0548 mostraram a separação de dois *clusters* principais em TPA, SS14 e Nichols (Fig 3) (ARORA et al., 2016; MARRA et al., 2010; NECHVÁTAL et al., 2014). Em soros de coelhos infectados experimentalmente com cepas provenientes de humanos da China, Sun e colaboradores (2016) caracterizaram por NGS a diversidade genética de *Treponema* sp. A variabilidade conferida a TPA, mostrou a separação de três linhagens independentes, revelando um padrão distinto entre cepas desta subespécie. Entretanto, como apontado por Ma, Giacani e Centurión-Lara (2015) muitos dos estudos de genotipagem de *T. pallidum*, deveriam ser analisados novamente com cepas provenientes de diversas regiões geográficas e que não fossem obtidas a partir de passagens em coelhos, para que o resultado seja confirmado.

Diagnósticos por meio de MLSA e MLST têm sido utilizados ultimamente. Em Noda e colaboradores (2018), a técnica de MLSA foi essencial para a detecção de TPE em 6/9 pacientes que tinham sido diagnosticados com sífilis venérea, o que mostrou os primeiros casos clínicos de bejel na América. Uma abordagem de MLST específica para detecção/discriminação de *Treponema* sp. e identificação de diferentes clados de TPA, foi desenvolvida por Grillová e colaboradores (2018) com base em 3 loci de alto poder discriminatório: tp0136, tp0548 e tp0705, juntamente com o gene 23S rDNA para análise de resistência a antibióticos. Em 2019, o grupo de pesquisa desenvolveu uma base de dados *PubMLST* como repositório de informações genéticas e assinaturas em sequências de *Treponema* sp., sugerindo à comunidade científica a utilização universal desta ferramenta em estudos de tipagem molecular de *Treponema* sp. (GRILLOVA et al., 2019).

Diagnóstico

Em razão da *T. pallidum* não crescer em culturas sem células, cepas das bactérias são obtidas por meio de passagens em animais de laboratório (ČEJKOVÁ et al., 2015; LUKEHART; BAKER-ZANDER; SELL, 1980; SALAZAR et al., 2007). Contudo, o tempo de replicação é lento, cerca de 30 horas, e pode ser mantido apenas por algumas gerações (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2017).

O diagnóstico diferencial entre TRE tem sido baseado em níveis de incidência, idade de aquisição, distribuição geográfica, principal modo de transmissão, manifestações clínicas, capacidade de invasão no sistema nervoso central e placenta, e gravidade no estágio tardio da doença (PEELING et al., 2017; ROTHSCILD, 2003, 2005; TURNER; HOLLANDER, 1957). No entanto, em regiões onde a endemicidade é baixa e os casos de TRE são esporádicos, métodos de diagnósticos são essenciais para a determinação das infecção circulante (ANTAL; LUKEHART; MEHEUS, 2002).

A detecção da infecção pode ser realizada por microscopia ou sorologia. A microscopia de campo escuro é rápida e é baseada na detecção da espiroqueta em secreções de lesões. Porém, são necessários profissionais bem capacitados e experientes para diferenciarem a bactéria a partir de outras espiraladas e não-patogênicas (ANTAL; LUKEHART; MEHEUS, 2002). Testes sorológicos são mais comumente utilizados, mas não distinguem entre subespécies de *Treponema* (PEELING et al., 2017). Existem 2 tipos de testes de diagnóstico para TRE: os não-treponêmicos e os treponêmicos, estes últimos utilizados como confirmatórios para a infecção. Entre os treponêmicos estão o FTA-abs e o TPPA, que quantificam anticorpos IgM e IgG contra *T. pallidum*, e os não-treponêmicos, RPR, TRUST e VDRL, que quantificam anticorpos IgM e IgG contra o composto antigênico formado de cardiolipina, lectina e colesterol, que possui semelhança imunológica a *T. pallidum* (MARRA, 2018). Os testes sorológicos são úteis tanto para o diagnóstico, quanto para verificação da eficácia do tratamento, quando diferenças nas titulações de um portador são observadas ao longo do tempo.

O diagnóstico molecular tem possibilitado a detecção da infecção em diferentes fontes de amostras (KOUZNETSOV; PRINZ, 2002; NODA et al., 2018; PINILLA et al., 2018). No entanto, quando se refere a PCR, não é recomendada a sua aplicação a amostras de sangue e líquido cérebro espinhal por terem baixa carga bacteriana (PEELING et al., 2017). Em 2015, Gayet-Ageron e colaboradores (2015) mostraram por meio de um estudo prospectivo observacional que a PCR foi mais acurada na detecção de sífilis primária quando comparada à

microscopia de campo escuro. Para o diagnóstico de neurosífilis, não existe um método de diagnóstico padrão-ouro por isso sintomas clínicos e anormalidades no sistema nervoso central, como alterações na contagem de células, glicose e proteínas, podem indicar a presença da infecção (MARRA, 2018). Em uma revisão sistemática, Marks e colaboradores (2018) reportaram 40-70% e 60-100% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, na utilização de PCR para detectar neurosífilis.

Na paleopatologia, a diferenciação entre TRE é um desafio. As lesões ósseas das TRE se assemelham entre si e também podem ser confundidas com outros agravos, como hanseníase, por exemplo. Somente no estágio terciário da doença é que as manifestações ósseas aparecem, o que pode ser um fator limitante para o diagnóstico, levando a subestimação dos casos (ORTNER, 2003a; WOOD et al., 1992). Estudos têm proposto pontos de diferenciação entre TRE, tais como, média do número de ossos envolvidos, idade dos indivíduos e pés e mãos afetados (ROTHSCHILD, 2005; ROTHSCHILD; ROTHSCHILD, 1996; WALKER et al., 2015).

PARASITOS INTESTINAIS

***ASCARIS* sp.**

O parasito

Ascaris sp., pertence ao filo Nematoda, classe Secernentea, ordem Ascaridida, família Ascarididae, gênero *Ascaris* (MYERS et al., 2019). A espécie *Ascaris lumbricoides* Linnaeus 1758 parasita humanos e a espécie *Ascaris suum* Goeze 1782 infecta suínos (*Sus scrofa*). A primeira é popularmente conhecida como lombriga ou bicha e é a causadora da ascaridíase (REY, 2008b). É o maior nematoide capaz de infectar o intestino humano (CDC, 2018a). *Ascaris suum*, responsável por grandes perdas econômicas, devido ao abate precoce o que reduz a eficiência da produção de suínos. Além disso, deve-se considerar que protocolos de vermifugação aplicados a suínos, são administrados de forma errônea, como mostrado no estudo de Dias, Tanuere e Manhães (2011). Estudos experimentais também demonstraram o sucesso da infecção de ambas espécies em roedores, cachorros e primatas não-humanos, como revisado por Crompton (2001), além de infecções em primatas não-humanos vivendo em condições naturais (ADRUS et al., 2019; XIE et al., 2013). No entanto, se a ocorrência dessas

infecções naturais se dá por *A. lumbricoides*, *A. suum* ou por uma espécie/cepa diferente, ainda não está esclarecido (LI et al., 2012; XIE et al., 2013).

Origem do parasito

Discussões foram levantadas ao longo do tempo sobre a origem de *A. lumbricoides* em humanos. Presumia-se que a infecção pudesse ser de origem zoonótica, em que suínos teriam transmitido o parasito a humanos após a domesticação animal. Esta hipótese, já discutida desde 1927 por Cameron, sustenta que a forma de *A. lumbricoides* encontrada em humanos era mais próxima a forma encontrada em animais herbívoros (CAMERON, 1927). A domesticação de suínos data de 10.000 anos AP (ALBARELLA, 2007). Em revisão realizada por Gonçalves, Araújo e Ferreira (2003), são apontados sítios pré-Colombianos localizados no Peru, Brasil e Estados Unidos que datam de 4.227 ± 181 a 840 ± 40 anos AP. A domesticação de suínos no Velho Mundo, provavelmente ocorreu há 7.000 anos atrás (FERREIRA; REINHARD; ARAÚJO, 2011a). Embora haja controvérsia, no Velho Mundo, o achado mais antigo de *Ascaris* sp. refere-se ao trabalho de Bouchet e colaboradores (1996), que mostrou que há pelo menos 30.000 anos AP a infecção já estava presente em humanos. Neste estudo foram realizadas análises paleoparasitológicas em amostras de sedimentos retirados em uma caverna na França, revelando ovos de *A. lumbricoides*, que segundo os autores não poderiam ser de *A. suum* porque não havia circulação de suínos na região. Entretanto, não explicaram o fato do local também ter sido habitado por humanos modernos. No mesmo ano, Evans e colaboradores (1996) reportaram ovos de *Ascaris* sp. em coprólitos de origem humana ou animal na África Subsaariana, 10.000 – 7.000 anos AP. Os dados do período de domesticação de suínos no Velho Mundo e a introdução deste hospedeiro no Novo Mundo são inconsistentes com o aparecimento do parasito em humanos, portanto, a hipótese da origem de *A. lumbricoides* a partir de *A. suum* não se sustenta (FERREIRA; REINHARD; ARAÚJO, 2011a).

Estudos experimentais já demonstraram que *A. lumbricoides* pode infectar suínos e *A. suum* pode infectar humanos (GALVIN, 1968; TAKATA, 1951), bem como a ocorrência natural de infecção cruzada em ambos os hospedeiros (ANDERSON, 1995; BETSON et al., 2014; ZHOU et al., 2012, 2018). Em Leles e colaboradores (2012) são discutidos quatro cenários para explicar a origem das espécies nesses hospedeiros: (1) *Ascaris lumbricoides* e *A. suum* são espécies válidas; (2) *Ascaris suum* é o ancestral de *A. lumbricoides*; (3) *Ascaris*

lumbricoides é o ancestral de *A. suum*; (4) *Ascaris lumbricoides* e *A. suum* são a mesma espécie. Esta última hipótese é sustentada pela pouca divergência morfológica e genética entre ambas.

As relações filogenéticas entre *A. lumbricoides* e *A. suum* ainda não estão claras. A distância genética entre as espécies, 1,9% com base em análise de genoma mitocondrial completo (LIU et al., 2012), suporta a hipótese de se tratar de uma única espécie. Estudos que objetivaram a diferenciação molecular entre as espécies têm sido conduzido desde o trabalho de Anderson, Romero-Abal e Jaenike (1993). A análise dos genomas mitocondriais de *Ascaris* spp. de suínos e humanos da Guatemala mostrou dois grupos distintos que compartilhavam haplótipos presentes em ambos os hospedeiros (ANDERSON; ROMERO-ABAL; JAENIKE, 1993). Ainda na década de 90, outros estudos continuaram suas análises com base em genes nucleares e mitocondriais, para observarem diferenças genéticas entre *Ascaris* spp. (ANDERSON, 1995; PENG et al., 1998; ZHU et al., 1999). Loreille e colaboradores (2001) propuseram o primeiro diagnóstico paleoparasitológico molecular com base nos genes 18S rDNA e *cytb* em coprólitos do século XIV recuperados na Bélgica. A análise não permitiu a diferenciação entre as espécies, mas indicou a presença do parasito em amostras humanas. Peng e colaboradores (2003) descreveram diferentes genótipos para o alvo molecular ITS1 (G1-G5) de *Ascaris* sp. em suínos e humanos da China. O genótipo G1 foi encontrado frequentemente em humanos e o G3 em suínos, enquanto que os outros foram compartilhados entre ambos os hospedeiros. Dois anos depois, o mesmo grupo encontrou diferentes haplótipos nos genes *cox1* e *nad1* em amostras de suínos e humanos de seis províncias da China (PENG et al., 2005). Para o gene *cox1* foram identificados 10 haplótipos em humanos (H1-H10) e 10 em suínos (P1-P10). Um haplótipo foi comum em ambos os hospedeiros (H9P9). Para *nad1* 11 haplótipos foram observados em humanos (H1-H11) e 15 em suínos (P1-P15). Embora Peng e colaboradores (2003, 2005) tenham proporcionado relevantes resultados sobre a caracterização genética de *Ascaris* spp., ambos os estudos foram baseados em análises de larvas ou formas adultas, que nem sempre estão disponíveis. Em razão disto, Leles e colaboradores (2009) testaram protocolos para diagnóstico molecular de ovos de *Ascaris* sp. em fezes humanas. Os resultados positivos do estudo foram devido ao método de extração utilizado e a sensibilidade da PCR em detectar ovos de *Ascaris* sp. com base nas regiões *cytb* e ITS1. O primeiro alvo não permitiu verificar a separação entre as espécies, já o segundo, revelou um novo genótipo (G6), demonstrado pela primeira vez em amostras brasileiras. Leles e colaboradores (2010) verificaram a variabilidade intra-indivíduo de ITS1 de *Ascaris* sp. de humanos. A abordagem revelou que além dos genótipos G1 e G6, também foram encontrados 13 novos haplótipos (H1-

H13). A região ITS1 revelou de 2 a 4 genótipos/haplótipos em cada amostra, assim, de acordo com os autores este marcador deveria ser reconsiderado devido sua alta variabilidade dentro do mesmo indivíduo e, portanto, não se aplicaria para ser utilizado como marcador de separação entre *A. lumbricoides* e *A. suum*. Iñiguez e colaboradores (2012) realizaram a primeira análise molecular mitocondrial, *cox1* e *nad1*, no Brasil. A análise mostrou haplótipos de *Ascaris* sp. presentes tanto em suínos quanto humanos que circulavam em diversas regiões endêmicas, formando dois *clusters* (A e B) e ainda, a descoberta de um novo haplótipo compartilhado entre os hospedeiros humanos e suínos (H12P17), que estava em maior prevalência. Devido à falta de evidências que possam mostrar a separação entre as espécies, Leles e colaboradores (2012) concluíram que *A. lumbricoides* e *A. suum* representam a mesma espécie. Cavallero e colaboradores (2013) e Betson e colaboradores (2014), ao estudarem marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, descreveram um terceiro *cluster* além dos dois já descritos por Iñiguez e colaboradores (2012), composto de haplótipos presentes majoritariamente em suínos. Betson e colaboradores (2014) identificaram 43 novos haplótipos de *cox1*, que estavam compartilhados tanto por suínos quanto por humanos, exceto um único haplótipo (H64) presente apenas em suínos. Por meio da aplicação de marcadores de microssatélites em isolados adultos de *Ascaris* sp. provenientes de humanos e suínos em países da Europa, África, Ásia e da Guatemala, o estudo também afirmou ter encontrado diferenças genéticas em *Ascaris* spp., levando os autores a indicarem que são espécies diferentes. Sete dos haplótipos de *Ascaris* sp. reportados em Betson e colaboradores (2014) foram verificados em amostras de solo de população viking, na Dinamarca, identificados como haplótipos do *cluster* B. Além dos genótipos já descritos e apresentados acima, oito novas variantes foram observados em *Ascaris* sp. de humanos, na Índia, denominados IND1 ao IND8, caracterizados pelo gene ITS1 (DAS; CHOWDHURY; GANGULY, 2015). Curiosamente, quando aplicada as análises filogenéticas, algumas amostras que tinham estes genótipos formaram um grupo isolado com alto valor estatístico, que segundo os autores, pode ser proveniente de eventos de recombinação gênica. A discussão de *A. lumbricoides* e *A. suum* como espécies diferentes ainda continua em evidência (ALVES; CONCEIÇÃO; LELES, 2016; BETSON; STOTHARD, 2016), mas até o momento não há dados genéticos que sustentem definitivamente a existência de duas espécies. Recentemente, Zhou e colaboradores (2018) utilizaram a abordagem de microssatélite em isolados de *Ascaris* sp. de humanos e suínos, mostrando a presença de híbridos, principalmente em humanos.

***Ascaris* sp. no passado**

No Velho Mundo, Gonçalves, Araújo e Ferreira (2003) revisaram mais de 30 estudos que reportaram achados de *Ascaris lumbricoides* com datações que variaram desde 30.000 anos AP a 150 anos atrás, incluindo novas descrições. No Brasil, a infecção já circulava há pelo menos 3.000 anos AP. (GONÇALVES; ARAÚJO; FERREIRA, 2003). Contudo, os achados pré-Colombianos no Novo Mundo são raros, especialmente na América do Sul. Considerando a problemática, Leles e colaboradores (2008, 2009) desenvolveram uma metodologia de diagnóstico molecular de *Ascaris* sp. a partir de coprólitos sem evidências de ovos do parasito mas com positividade para *Trichuris trichiura*. Os autores levaram em consideração a frequente associação destes geo-helminthos no mesmo indivíduo, uma das maiores associações parasitárias encontradas (CHAN et al., 1994; LELES et al., 2010b; SALDIVA et al., 1999), o que poderia desta forma aumentar a chance de detecção de *Ascaris* sp. O sucesso da abordagem permitiu concluir que o parasito já circulava na América do Sul há pelo menos 8.800 anos AP nas populações do Brasil e Chile, e desenharam assim uma nova paleodistribuição do parasito no Novo Mundo. Além da ausência de resultados positivos para *Ascaris* sp. no Novo Mundo pré-Colombiano, Leles (2010) ponderou outros pontos de extrema importância, como a suscetibilidade do *Ascaris* sp. a plantas usadas como anti-helmínticos, presença de fungos nematofágicos, alteração no número de ovos liberados, bem como a fragmentação destes. Outros estudos paleogenéticos e paleoparasitológicos foram posteriormente apresentados, na Espanha (século XVIII) (GIJÓN BOTELLA et al., 2010) e na Coreia do Sul (dinastia Joseon – 1392-1910 anos AD) (OH et al., 2010a). No período colonial Brasileiro, Jaeger e colaboradores (2013a) mostraram por análise paleoparasitológica a presença de *Ascaris* sp. em sedimento pélvico de remanescente humano recuperado no sítio arqueológico cemitério Praça XV, localizando-se na zona portuária do Rio de Janeiro, onde corpos da população geral mas com forte componente de Africanos escravizados, eram enterrados. Juntamente com o achado de outras parasitoses, discutiu-se o grande problema de saúde pública que pairava sobre a população após a chegada dos Europeus e Africanos escravizados. No mesmo ano, Jaeger e colaboradores (2013c) revelaram que a infecção também estava presente em indivíduos com ancestralidade matrilinear Europeia que foram enterrados no interior da antiga Sé ou INSC, durante os séculos XVII-XIX também no Rio de Janeiro. Complementando as análises realizadas em Jaeger e colaboradores (2013a), o grupo de pesquisa aplicou a técnica de hibridização DNA-DNA em amostras que foram negativas para helmintos na pesquisa paleoparasitológica, e encontrou prevalência de 40% de infecção por *Ascaris* sp. e *T. trichiura*

(JAEGER; IÑIGUEZ, 2014). Ressaltou-se a importância da aplicação de uma abordagem interdisciplinar para confirmar e complementar o diagnóstico em amostras arqueológicas.

Diante da necessidade de mais conhecimentos sobre a paleodistribuição de *Ascaris* sp. pelo mundo, estudos têm reportado a presença da infecção em regiões que hoje correspondem à Dinamarca, era viking, 1018 – 1030 AD (SØE et al., 2015), a Espanha, 1200AD, 750 cal AP (JAEGER et al., 2016), a Coreia do Sul, séculos XV ao XVIII (HONG et al., 2017; OH et al., 2015), a Turquia, séculos II ao V (WILLIAMS et al., 2017), Europa e Oriente Médio, 2.450AP a 1700AD (SØE et al., 2018).

A doença

Geralmente pessoas infectadas não exibem sintomas. Estatisticamente 1 em cada 6 indivíduos apresentam alguma manifestação clínica, devido ao pequeno número de parasitos presente na maioria dos casos (REY, 2008b). Quando há uma maior carga parasitária e dependendo da fase do ciclo de vida do parasito, estes podem ocasionar desconforto abdominal, pneumonia (síndrome de Loeffler), obstrução intestinal, diarreia, perda de apetite e astenia (perda ou diminuição da força física), em razão da migração da larva no pulmão ou pela presença da forma adulta no intestino (JOURDAN et al., 2018; PARIJA; CHIDAMBARAM; MANDAL, 2017). O estado nutricional e a composição da microbiota podem ser alterados pela presença do parasito (JOURDAN et al., 2018).

Ciclo biológico

Ascaris sp. é um geohelminto cujo ciclo de vida é direto, ou seja, não há presença de hospedeiro intermediário. O indivíduo elimina os ovos do parasito junto com as fezes, que podem estar embrionados ou não (ver morfologia: ovos e formas adultas). O desenvolvimento do embrião ocorre no meio exterior em até duas semanas (Fig 5), onde a presença de oxigênio, é necessária para reposição das reservas lipídicas do parasito, já que são queimadas durante essa fase. Outros fatores como solo úmido, temperatura entorno de 20 e 30°C e sombreamento também são de extrema importância para o desenvolvimento dos ovos (CDC, 2018a). Após a eclosão da primeira larva (L1), ocorre o desenvolvimento para o segundo estágio (L2), que dura aproximadamente 1 semana, atingindo medida de 0,2 a 0,3 mm. Experimentalmente, comprovou-se que ela pode permanecer sob esta condição por até sete anos no solo (REY,

2008b). Nesta fase a larva já tem a capacidade infectiva, podendo iniciar o quadro infeccioso quando um indivíduo ingere o ovo por meio de água ou alimentos contaminados. A L2 eclode e invade a mucosa intestinal, sendo levada até os pulmões depois de 4 a 5 dias, por meio da circulação sanguínea. Após atingirem a maturidade (10-14 dias) (L3), o sexo já é reconhecível. Evoluem para o quarto estágio (L4), medindo de 1 a 2 mm, e então, percorrem os bronquíolos, traqueia e laringe, onde são engolidas com as secreções brônquicas. Em seguida, alcançam o estômago e o intestino, onde neste último, ocorre a última muda larval (L5) com 3 a 6mm, 20 a 30 dias após a infecção, e posteriormente, originando adultos jovens, que continua a crescer progressivamente. Todo o desenvolvimento sexual dura aproximadamente dois a três meses, seguindo para a oviposição pela fêmea adulta (REY, 2008b).

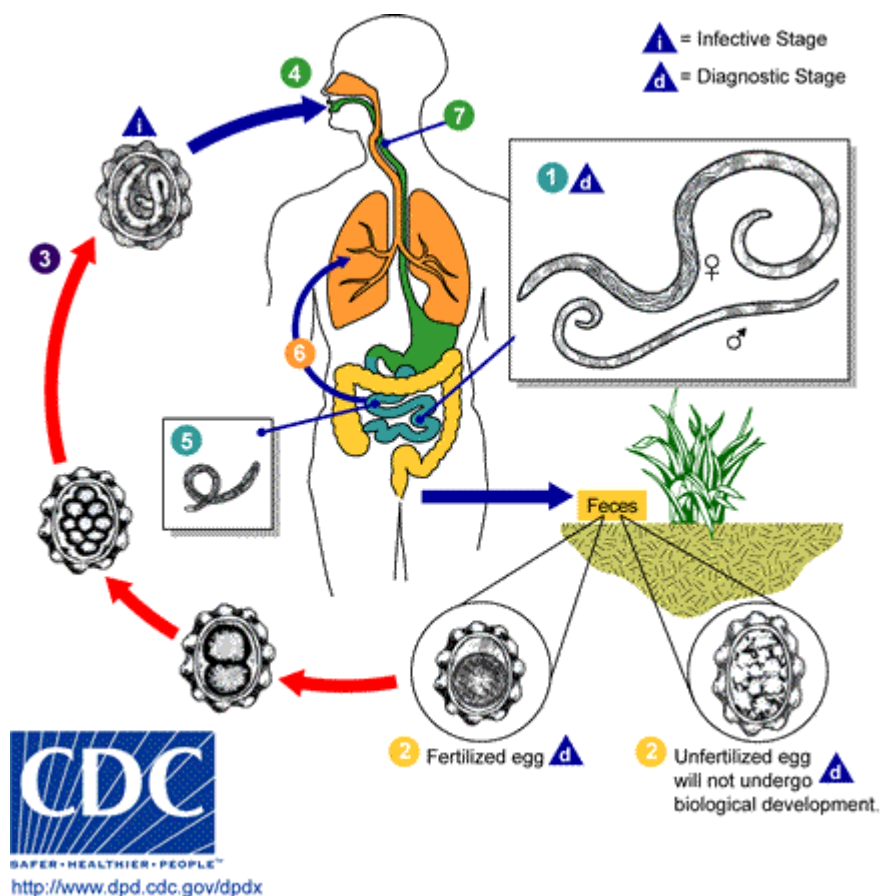


Fig 5: Ciclo biológico do *Ascaris* sp. 1- Vermes adultos localizados no intestino. 2- A fêmea produz ovos eliminados nas fezes. Ovos inférteis não se desenvolvem no solo e assim não são infectivos. 3- Ovos férteis embrionados tornam-se infectantes em no mínimo 18 dias. 4- Ingestão do ovo infectante e eclosão das larvas. 5- Invasão da mucosa intestinal e transporte via circulação sanguínea até os pulmões. 6- Maturação das larvas nos pulmões até chegarem aos brônquios. 7- Ascensão pela traqueia e laringe, e deglutição. Ao atingirem o intestino adquirem a forma adulta. São necessários 2 – 3 meses desde a ingestão de ovos infectantes até oviposição pelas fêmeas adultas. Formas adultas podem viver entre 1 – 2 anos. (Fonte: Modificado de CDC: <https://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>)

Morfologia: ovos e formas adultas

Em média as fêmeas fecundadas liberam 200.000 ovos por dia (REY, 2008b). Os ovos férteis podem ter formas ovais ou quase esféricas, com medidas de 60 X 45 μ m, variando de 45 a 70 μ m no maior diâmetro (Fig 6). São muito resistentes ao meio externo por serem compostos de quatro camadas, a mais interna (I), muito delgada, formada por lipídios e impermeável a água, a camada média (II), espessa, formada por uma substância composta de quitina ligada a proteínas, uma camada vitelínica (III), e por fim, a externa (IV), um revestimento quase impermeável, que foi adquirido pela parede uterina da fêmea, que pode ser de forma grossa, irregular e mamilonada. Algumas vezes é delgada ou até mesmo ausente (QUILÈS; BALANDIER; CAPIZZI-BANAS, 2006; REY, 2008b). As fêmeas não-fecundadas liberam ovos inférteis que não evoluem. Estes apresentam morfologia diferenciada do anterior, são mais alongados com comprimento de 80 - 90 μ m, membrana mamilonada mais delgada, irregular e as vezes ausente (Fig 6C). Os ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum* são morfologicamente indistinguíveis (REY, 2008b), sendo esta uma das limitações para a diferenciação entre as espécies.

O comprimento da forma adulta pode variar entre 20-35 cm para fêmeas e 15-30 cm para machos (CDC, 2018a). A longevidade média do parasito pode chegar até 2 anos (O'LORCAIN; HOLLAND, 2000).

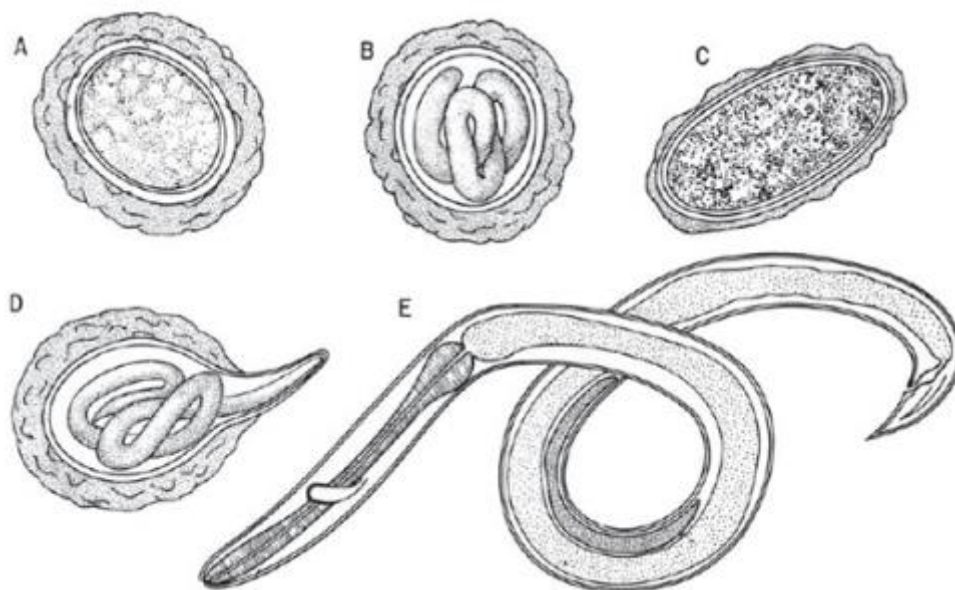


Fig 6: Ovos e larvas de *Ascaris lumbricoides*. A: Ovo recém-eliminado. B: Ovo embrionado no meio exterior. C: Ovo infértil. D: Eclosão da larva infestante no tubo digestivo do hospedeiro. E: Larva isolada no pulmão. (Fonte: Rey (2008a))

Diagnóstico

A detecção da parasitose envolve o conhecimento do helminto, sua distribuição geográfica e a apresentação clínica (JOURDAN et al., 2018), sendo este último, um desafio, pois a ascariíase não se distingue de outras verminoses. A detecção do agravo se dá, em muitas vezes, após a eliminação da forma adulta do parasito pelo ânus ou boca (REY, 2008b). Dada a suspeita clínica de helmintíase devido a algum sintoma como, desconforto abdominal ou tosse, o exame parasitológico direto pode detectar a presença de ovos do parasito nas fezes do paciente, que é eficaz em 90% dos casos. A técnica de sedimentação espontânea é ainda mais eficaz, com sensibilidade de 100% (REY, 2008b). Portanto, a microscopia óptica é a principal forma de diagnóstico utilizado que permite a detecção e quantificação parasitária (JOURDAN et al., 2018). Quando há a necessidade do diagnóstico em campo, a técnica de Kato-Katz pode ser aplicada. Desenvolvida por Kato e Miura (1954) e modificada por Katz e colaboradores (1972), esta técnica simples, rápida e de baixo custo, permite a detecção direta e quantificação do número de ovos de helmintos por gramas de fezes. Recentemente, Monteiro e colaboradores (2018) mostraram a aplicação de PCR e sequenciamento nucleotídico de DNA extraído de lâminas de amostras de fezes frescas submetidas ao Kato-Katz e positivas para *Ascaris* sp. O estudo revelou a possibilidade da aplicação de uma abordagem molecular neste tipo de amostra, com sucesso de detecção em 84% dos casos.

As ferramentas moleculares têm mostrado alta sensibilidade e especificidade, na detecção de DNA em ovos ou formas adultas do parasito (LELES et al., 2008; LOREILLE et al., 2001; MATIONG et al., 2017). Os alvos moleculares ITS1, ITS2, 18S rDNA, 5.8S rDNA, *cox1*, *nad1* e *cytb* têm sido aplicados em diferentes técnicas, principalmente PCR convencional, PCR em tempo real e PCR multiplex, (CARLSGART; ROEPSTORFF; NEJSUM, 2009; GIJÓN BOTELLA et al., 2010; LELES et al., 2008; MONTEIRO et al., 2018; PECSON et al., 2006; SADAOW et al., 2018; SATO et al., 2019). Análises de microssatélite também têm sido utilizadas (CRISCIONE et al., 2007; ZHOU et al., 2018). Contudo, uma das limitações na utilização de técnicas moleculares de fezes é a presença de inibidores de reações de PCR, como por exemplo, ácidos biliares (IÑIGUEZ et al., 2003a). Medidas podem ser aplicadas às amostras a fim de que esse efeito seja minimizado, como o passo de sedimentação ou flutuação antes da extração de DNA (LELES et al., 2008) ou purificação de DNA (IÑIGUEZ et al., 2006). O desenvolvimento de kits comerciais utilizados atualmente já tem levado em consideração essa limitação e proporcionam reagentes que contêm componentes que garantem a total remoção de inibidores (QIAGEN, 2019a, 2019b). O diagnóstico molecular tem sido aplicado mais

frequentemente para finalidades de pesquisa, em razão do alto custo, mas a sua utilização em programas de controle tem sido considerada (LAMBERTON; JOURDAN, 2015).

Embora ainda não esteja padronizado, ensaios imunológicos também podem ser aplicados (JOURDAN et al., 2018). Em uma revisão de 2015, Lamberton e Jourdan apontaram que a dificuldade para obter a padronização nesta abordagem, dá-se em razão das diferentes respostas humorais imunes que o *Ascaris* sp. pode exibir, diferenciando-se de acordo com a intensidade e exposição a infecção, principalmente em áreas de endemicidade. Os títulos de anticorpos liberados pelo sistema imune do hospedeiro, irão variar de acordo com a carga parasitária, além disso há falta de imunoglobulina específica para detecção de *Ascaris* sp., e reações cruzadas com antígenos de outros helmintos são comuns (LAMBERTON; JOURDAN, 2015). Estudos têm sido realizados para identificar produções de marcadores sorológicos específicos para a infecção (VLAMINCK et al., 2016; YOSHIDA et al., 2016).

Investimentos financeiros na pesquisa são necessários para o desenvolvimento de ferramentas simples e acessíveis, seja para o diagnóstico de *Ascaris* sp., ou para outras helmintíases (LAMBERTON; JOURDAN, 2015).

Epidemiologia

Ascaris sp. é um dos parasitos cosmopolitas mais comuns, e mais presente em áreas de climas tropicais e subtropicais. Estima-se que aproximadamente 807 milhões – 1,2 bilhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo (CDC, 2018b). Circulam em áreas onde há ausência de saneamento básico, abastecimento de água adequado, e onde fezes são utilizadas como fertilizantes (CDC, 2018c). No Brasil, estudos têm apontado uma diminuição dos índices de prevalência após melhoras das condições de saneamento básico, de habitação assim como, depois da prática de atividades educacionais e informativas desenvolvidas nas escolas (BARRETO et al., 2007; BARRETO MAURICIO L. et al., 2010; BASSO et al., 2008). Os índices de prevalência e a distribuição geográfica de helmintos intestinais na região metropolitana do Rio de Janeiro foram analisados por Faria e colaboradores (2017), que observaram que as ocorrências foram influenciadas por condições socioeconômicas.

Um estudo realizado recentemente, revisou sistematicamente fatores associados a pré-disposição para o desenvolvimento de infecções por helmintos e foi observado que crianças e mulheres têm maior pré-disposição para a infecção por *A. lumbricoides* (WRIGHT et al., 2018).

De acordo com a OMS a cobertura do tratamento da infecção por geo-helmintos oferecido a crianças vem crescendo progressivamente desde 2003, e até 2020 o objetivo é abranger pelo menos 75% deste grupo populacional (WHO, 2018b).

TRICHURIS TRICHIURA

O parasito

Pertencente ao filo Nematoda, classe Adenophorea, a ordem Trichocephalida, família Trichuridae, a espécie *Trichuris trichiura* (grego *thrix*, *trikhos*, cabelo, e *oura*, cauda), significa cauda capilar (MYERS et al., 2019; REY, 2008c). *Trichuris trichiura* infecta humanos e primatas não humanos (LEVECKE et al., 2007), mas diversas espécies do gênero infectam animais domésticos, como *T. suis* em suínos e *T. vulpis* em caninos (BUNDY; COOPER; BROOKER, 2013).

Origem do parasito

Confalonieri (1988) revisou duas hipóteses sobre a origem do parasito: 1) espécie originada a partir de *T. suis*, que teria parasitado humanos após a domesticação de suínos; 2) espécie passada de primatas não-humanos para humanos. A primeira hipótese supôs que as duas espécies eram espécies-irmãs, com características morfológicas muito semelhantes. Entretanto, a morfologia detalhada e infecção por *T. suis* em suínos e *T. trichiura* em homínídeos, suportam que são espécies diferentes. Os estudos paleoparasitológicos evidenciaram a presença de *T. trichiura* em humanos antes do período de domesticação de suínos (EVANS et al., 1996; FERREIRA; REINHARD; ARAÚJO, 2008). Sendo assim, admite-se que este parasito tenha origem filogenética, tendo sido adquirido pelo contato com primatas não-humanos, devido a sua existência nestes hospedeiros desde o seu aparecimento. Acompanharam as migrações humanas e se estabeleceram desde então (FERREIRA et al., 2011).

***Trichuris trichiura* no passado**

A descrição paleoparasitológica mais antiga de *T. trichiura* refere-se ao achado descrito por Evans e colaboradores (1996), que fizeram referência a um coprólito datado 10.000 – 7.000 anos AP, na África do Sul. Dentre as pesquisas realizadas na múmia Ötzi (5.350 a 5.100 anos

atrás), a análise de conteúdo intestinal mostrou que *T. trichiura* foi o único helminto descrito neste indivíduo (DICKSON et al., 2000).

A distribuição da parasitose já foi descrita tanto no Velho quanto Novo Mundo, desde o período neolítico (GONÇALVES; ARAÚJO; FERREIRA, 2003; ROCHA; SERRA-FREIRE, 2009). Na América pré-Colombiana as descrições de *T. trichiura* são comuns, diferente do cenário observado para *Ascaris* sp., que são raros (GONÇALVES; ARAÚJO; FERREIRA, 2003). Algumas justificativas são discutidas por Leles e colaboradores (2010) como mencionado anteriormente (tópico *Ascaris* sp. no passado). Na América do Sul, Gonçalves e colaboradores (2003) descreveram o achado mais antigo, 8.000- 7.000 anos AP, no sítio arqueológico Lapa Pequena, em Minas Gerais. Em Ferreira, Reinhard e Araújo (2011b) é possível encontrar uma revisão para os achados da infecção em todo o mundo. No Brasil, a presença da infecção tanto em indivíduos da população geral (JAEGER et al., 2013a; JAEGER; IÑIGUEZ, 2014) quanto aqueles com ancestralidade matrilinear Europeia (JAEGER et al., 2013c), ambos provenientes de sítios arqueológicos do Rio de Janeiro, período colonial, sugeriu que a infecção circulava em todas as classes sociais. Desde o ano de 2013, a circulação de *T. trichiura* foi descrita no Oriente Médio, 2500 – 1500 anos AP (NEZAMABADI et al., 2013) e diversos reportes na Coreia do Sul, com datações desde o século VI ao XIX AD (CHO et al., 2017; KIM et al., 2013; SEO et al., 2018; SHIN et al., 2014).

A doença

A transmissão da infecção ocorre por meio de água, alimentos ou mãos contaminados com ovos de *T. trichiura* (CDC, 2013a). Apenas 10% dos infectados exibem sintomas (DE SILVA; COOPER, 2011). Os sinais clínicos da tricuriase geralmente são diarreia, falta de apetite, perda de peso, dor abdominal, tenesmo, sangue nas fezes, anemia e prolapso retal (em algumas infecções) (LINDQUIST; CROSS, 2017; REY, 2008c).

O combate a infecção por *T. trichiura* é um dos mais difíceis comparados a outras helmintíases. Doses de mebendazol, ivermectina, albendazol ou pamoato de oxantel, ou combinação entre estes, podem ser administradas, mas um tratamento eficaz ainda está sendo estabelecido (BUNDY; COOPER; BROOKER, 2013).

Ciclo biológico

O ciclo do *T. trichiura* é semelhante ao de *Ascaris* sp., mas se difere pelo ciclo interno no hospedeiro. Os ovos iniciam o embrionamento quando atingem o meio externo (Fig 7). Em função de condições ideais de temperatura (10 – 35°C), umidade, textura e consistência do solo, chuva, raios solares, entre outros fatores ambientais (SILVA; MARZOCHI; SANTOS, 1991), a célula-ovo alcança a fase larval em 10 – 14 dias. Quando ingeridos por meio de água ou alimentos contaminados, as larvas eclodem por um dos polos do ovo, no ceco e migram para a mucosa intestinal. Após o completo desenvolvimento, a forma adulta se fixa na mucosa e iniciam a oviposição, completando o ciclo com a liberação de ovos nas fezes do hospedeiro. As formas adultas podem persistir por anos, cerca de 6 – 8 anos (BUNDY; COOPER; BROOKER, 2013; REY, 2008c).

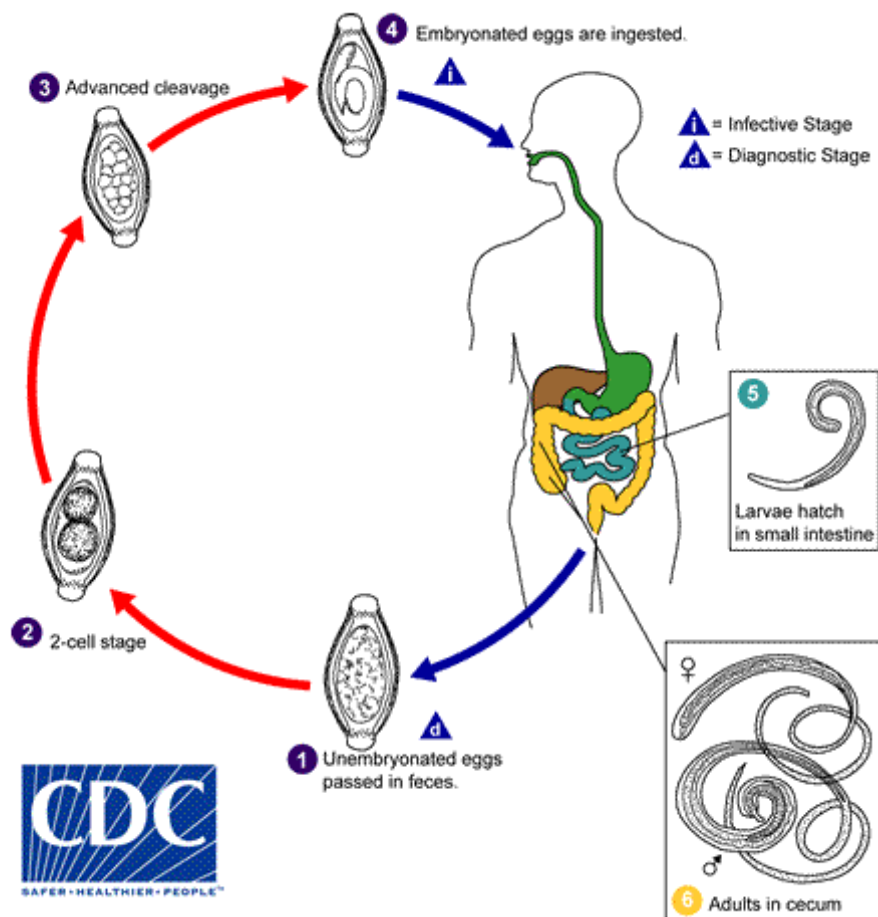


Fig 7: Ciclo biológico do *T. trichiura*. 1- Os ovos não embrionados são eliminados nas fezes. 2- No solo os ovos se desenvolvem em um segundo estágio. 3- Atingem o estágio avançado da segmentação. 4- Ovos larvados; fase infectiva. Após a ingestão, as larvas eclodem no intestino delgado. 5- As larvas atingem a maturidade e alcançam a forma adulta no cólon. 6- Os adultos se fixam na mucosa por meio da parte anterior. As fêmeas fazem oviposição de 60-70 dias após infecção.

Morfologia: ovos e formas adultas

Uma fêmea é capaz de eliminar de 3.000 – 7.000 ovos por dia (REY, 2008c). Os ovos apresentam medidas de 50 - 55µm de comprimento e 22 - 23 µm de largura, com morfologia de “barril alongado”, com *plugs* polares protuberantes (Fig 8). Os ovos são compostos de 3 camadas: a externa, que é espessa, amarronzada e limitada pelos 2 polos e as outras 2 camadas são internas e mais claras (REY, 2008c).



Fig 8: Ovo de *T. trichiura*, ainda não embrionado, onde se reconhecem as diversas camadas da casca e *plugs* polares (Fonte: Rey, 2008c)

Os vermes adultos podem medir de 3 a 5 cm de comprimento. A parte anterior é mais afilada e mais longa em relação a posterior, e apresenta-se em forma de chicote, por isso chamado de *whipworms* (*whip*, chicote) no inglês. Na Figura 9 detalhes das estruturas podem ser visualizados. A longevidade do parasito pode chegar até 8 anos, embora a maioria seja eliminada em 3 anos (REY, 2008c).

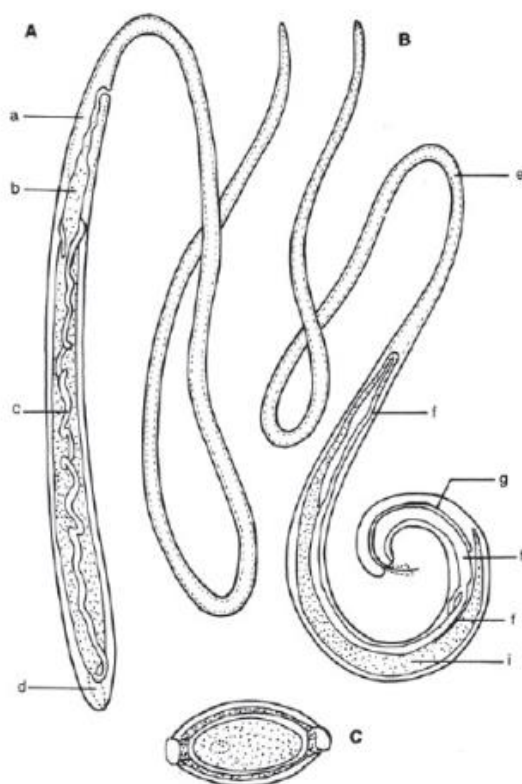


Fig 9: Forma adulta de *Trichuris trichiura*. A: Fêmea. B: Macho. C: Ovo, com dupla casca e as rolhas polares; a: Intestino, b: Útero, c: Ovário, d: Reto e Ânus, e: Faringe filiforme contida na porção delgada do corpo, f: Canal deferente, g: Espiculo, h: Cloaca, i: Testículo (Fonte: Rey, 2008c).

A discriminação de espécies de *Trichuris*, especialmente *T. trichiura* e *T. suis*, por morfologia dos ovos é difícil, e em adultos diferenciações por parâmetros morfológicos e determinações biométricas já foram testadas (CUTILLAS et al., 2009), mas de fato a distinção é realizada por abordagem molecular. Estudos suportam que os marcadores moleculares ITS1, ITS2, 5.8S rDNA e 18S rDNA são capazes de separarem *T. trichiura* e *T. suis*, ao contrário do que é observado para *A. lumbricoides* e *A. suum*, (CUTILLAS et al., 2009; LIU et al., 2014; MEEKUMS et al., 2015).

Diagnóstico

Amostras de fezes devem ser coletadas para serem submetidas a qualquer técnica parasitológica, que são simples de serem realizadas e exigem pouca estrutura laboratorial, contudo o resultado depende da experiência do operador. A abordagem pode ser aplicada para visualização direta dos ovos ou submetidas às técnicas de concentração, dependendo da carga

parasitária. A técnica quantitativa Kato-Katz é a mais comumente utilizada (KHURANA; SETHI, 2017).

Como alternativa ou complementariedade à microscopia, abordagens moleculares têm sido aplicadas (KAISAR et al., 2017; O'CONNELL; NUTMAN, 2016; PHOSUK et al., 2018). O diagnóstico baseado no DNA, segundo Verweij (2014), mostrou na última década, superar os resultados obtidos pela microscopia. De acordo com O'Connell e Nutman (2016) a sensibilidade da abordagem microscópica é de 88% enquanto que para o diagnóstico molecular é de 100%. No entanto, algumas desvantagens estão relacionadas aos métodos moleculares, como a presença de inibidores de reações presentes nas fezes, e a resistência dos ovos quanto a quebra para liberação do DNA. Contudo, kits comerciais para extração/purificação de DNA são desenvolvidos para solucionar esses problemas (KHURANA; SETHI, 2017)

Epidemiologia

Trichuris trichiura é o terceiro parasito intestinal mais comumente encontrado mundialmente, estando presente em áreas de climas tropicais e com pobres condições sanitárias, geralmente onde fezes são usadas como adubo ou onde indivíduos tem o costume de defecarem no solo (CDC, 2013a). Estima-se que cerca de 800 milhões de pessoas estejam infectadas mundialmente (CDC, 2017). Geralmente parasitos intestinais são mais frequentes em áreas rurais que urbanas. Entretanto, Kattula e colaboradores (2014) mostraram na Índia uma maior prevalência de *T. trichiura* em crianças da área urbana (2,2%), quando comparada à da área rural (0,3%). Segundo os autores, pode estar relacionado a situação socioeconômica precária, falta de abastecimento de água e pobres condições de saneamento.

Assim como para outras helmintíases, crianças representam um grupo de grande interesse epidemiológico dada a susceptibilidade à infecção e por serem grandes disseminadores de ovos pelas fezes, condição que ainda é agravada quando expostas a falta de higiene e saneamento básico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). O Ministério da Saúde do Brasil preconiza que melhorias nas condições de saneamento básico são uma das medidas de controle para geo-helmintíases (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Associação *Ascaris* sp. e *T. trichiura*

Associação entre estes parasitos já foi observada desde tempos pré-históricos (ROCHA; SERRA-FREIRE, 2009). Devido ao compartilhamento de características semelhantes e/ou idênticas, estes parasitos formam uma das associações parasitárias mais comuns encontradas mundialmente. Segundo Rey (2008c) estas propriedades consistem no idêntico modo de transmissão, grande fertilidade dos helmintos e semelhança na resistência dos ovos quanto às condições do meio exterior, sendo que os ovos de *T. trichiura* são mais resistentes aos processos tafonômicos em relação a *Ascaris* sp.

3- JUSTIFICATIVA

A paleoparasitologia e paleogenética podem fornecer importantes informações para o conhecimento das doenças infecciosas que circulavam no passado e ainda, traçar cenários comparativos com o que se observa atualmente (FERREIRA; REINHARD; ARAÚJO, 2011b). A relação parasito-hospedeiro ultrapassa a visão da presença do “patógeno” causador de doença. Tomando este pressuposto em consideração, as análises multidisciplinares permitidas por estas ciências já responderam a inúmeras questões que vão desde a origem do parasito a hábitos culturais de povos antigos (ARAÚJO; REINHARD; FERREIRA, 2008; FERREIRA; REINHARD; ARAÚJO, 2011b). Muitas espécies de parasitos acompanharam as migrações humanas, mudanças de hábitos comportamentais e transições epidemiológicas ao longo do tempo (ARAÚJO et al., 2008; LE BAILLY; ARAÚJO, 2016; REINHARD et al., 2013). Portanto, a detecção de infecções parasitárias em populações antigas, pode fornecer uma variedade de informações que permitem tanto o conhecimento da distribuição de agravos quanto a influência destes na relação com o hospedeiro e ambiente.

Durante o período colonial Brasileiro, diversas epidemias foram responsáveis por elevados índices de mortalidade, especificamente no Rio de Janeiro, capital de grande fluxo de pessoas, principalmente vindas da África, que eram depositados preferencialmente nos mercados de escravos (SIGAUD, 2009e). Segundo Sigaud, além dos Africanos, comunidades indígenas também eram flageladas por doenças infecciosas, devido ao modo de vida pelo qual os Nativos que tinham, como alimentação, nudez, e vivência nas florestas, que favorecia a disseminação de parasitos (SIGAUD, 2009b). Considerando a amplitude de informações que podem ser extraídas e a necessidade de maiores conhecimentos relacionados a doenças infecciosas no passado, este trabalho apresentou questões específicas à tuberculose, sífilis e parasitos intestinais no período colonial Brasileiro.

Estudos paleogenéticos já evidenciaram a presença de tuberculose nas Américas antes e após o contato com Europeus (ARRIAZA et al., 1995; GERSZTEN; GERSZTEN; ALLISON, 2001; GUICHÓN et al., 2015; JAEGER et al., 2012, 2013b; KLAUS et al., 2010; SALO et al., 1994). Entre comunidades indígenas do período Colombiano a tuberculose foi um dos agravos apontados (GÓMEZ I PRAT; DE SOUZA, 2003). Contudo, a informação genética sobre as cepas circulantes no período colonial ainda é ausente. O presente estudo propôs verificar a presença da infecção e cepas circulantes em indivíduos da etnia Guajajaras-Tenetebara, habitantes do Estado do Maranhão (210 ± 40 anos atrás), que tinham lesões sugestivas de TB. Haplogrupos Africanos já foram observados nestes ameríndios (LEITE et al., 2014), além da

composição Europeia reportada historicamente, o que pode auxiliar no entendimento e diversidade de perfis genéticos de MTC, para determinar a epidemiologia molecular de TB em ameríndios.

A alta incidência de sífilis no Brasil já vinha sendo apontada desde o século XVIII. A infecção que afetava todos os níveis sociais, ocupava as primeiras posições entre doenças venéreas em pessoas que davam entrada nos hospitais (CARRARA, 1996). O estudo de indivíduos do período colonial Brasileiro é uma excelente oportunidade para verificar a presença da infecção neste período e genotipar as cepas circulantes. Embora estudos tenham indicado que TPA não pode ser detectada em material arqueológico, como mencionado anteriormente, devido a características inerentes à bactéria que não permitem a preservação do aDNA (BARNES; THOMAS, 2006; BOUWMAN; BROWN, 2005; VON HUNNIUS et al., 2007), outros autores mostraram sucesso (GOGARTEN et al., 2016; KOLMAN et al., 1999; MONTIEL et al., 2012). Duas premissas estão intimamente relacionadas a uma maior carga bacteriana em amostras ósseas e conseqüentemente, à maior chance de detecção de TPA em remanescentes humanos: 1) indivíduos jovens e 2) ausência de lesões paleopatológicas (GOGARTEN et al., 2016). Assim, indivíduos que apresentam tais características podem possibilitar o diagnóstico de sífilis no passado.

O estudo de parasitos intestinais em populações remanescentes é uma fascinante abordagem interdisciplinar que permite amplas discussões históricas, antropológicas, epidemiológicas, e várias outras vertentes que auxiliam na construção do passado (FERREIRA, 2011). Condições insalubres e falta de higiene são os principais fatores para o desenvolvimento de geo-helintos (CDC, 2013b). No Brasil colonial, as verminoses ocupavam um lugar de destaque entre as doenças tropicais (SIGAUD, 2009f). A população, principalmente de Africanos escravizados, estava submetida às condições de insalubridade e ausência de assistência médica (NADALIN, 2003). Considerando que o CPN era destinado ao depósito de corpos de indivíduos que morriam logo após a chegada ao território Brasileiro, possivelmente o único local de enterramentos de Africanos escravizados na América, (PEREIRA, 2007), a pesquisa por helmintos intestinais pode evidenciar a frequência de parasitoses circulantes na África.

4- OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil paleoparasitológico e paleogenético de doenças infecciosas em populações do período histórico Brasileiro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Detectar e genotipar cepas de MTC circulantes em ameríndios Guajajara-Tenetehara, provenientes do período pós-contato, no Estado do Maranhão.
- 2- Verificar a presença de sífilis e outras treponematoses em indivíduos recuperados nos sítios arqueológicos Igreja Nossa Senhora do Carmo (séculos XVII ao XIX) e cemitério Praça XV (séculos XVIII ao XIX), Rio de Janeiro.
- 3- Avaliar a presença de helmintos intestinais em população de Africanos escravizados enterrados no sítio arqueológico cemitério dos Pretos Novos (1769 – 1830), Rio de Janeiro.

5- MATERIAIS E MÉTODOS

A tese apresentada está no formato “coletânea”, composta de 3 artigos científicos intitulados: “Tuberculosis in post-contact Native Americans of Brazil: Paleopathological and paleogenetic evidence from the Tenetehara-Guajajara”, “First Paleogenetic Evidence of Probable Syphilis and Treponematoses Cases in the Brazilian Colonial Period” e “African helminth infections out of Africa: Paleoparasitological and paleogenetic investigations in *Pretos Novos* cemetery, Rio de Janeiro, Brazil (1769-1830)”. Abaixo estão descritas as metodologias aplicadas a cada estudo, específicas a cada produção científica.

ARTIGO 1: “Tuberculosis in post-contact Native Americans of Brazil: Paleopathological and paleogenetic evidence from the Tenetehara-Guajajara”

Declarações éticas

Os remanescentes humanos pertencem a coleção da Seção de Antropologia Biológica (Setor de Antropologia Biológica – SABMN) do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro – MN/UFRJ). Amostras de costelas (n=17), SABMN00699 – SABMN00707, SABMN00709-SABMN00711, SABMN00713 – SABMN00715, e SABMN00717 – SABMN00718, foram fornecidas pelo SABMN/MN/UFRJ para análises no LP (LABTRIP/IOC/Fiocruz). Todas as permissões necessárias foram obtidas para o estudo, que cumpriu todos os regulamentos.

Indígenas Tenetehara-Guajajara

Tenetehara-Guajajara é uma comunidade Brasileira de indígenas Nativos de língua Tupi, um dos primeiros a terem contato com Europeus durante o período colonial. Tenetehara significa “ser intacto” (RIBEIRO, 2009). Atualmente, a população de 24.428 (IBGE, 2013) está distribuída em vilas na base do rio Pindaré-Gurupi, no Estado do Maranhão, Amazônia Brasileira. Sua economia foi tradicionalmente baseada no plantio de milho e mandioca, complementada com caça e pesca. Suas principais culturas cerimoniais eram festivais de mel e milho, que acompanhavam a época da colheita (MELATTI, 2011). Eles foram os primeiros a encontrarem os exploradores franceses em 1612, e em 1616, expedições portuguesas em busca do ouro, iniciaram um período de guerras e escravidão (VARGA, 2008). Em 1653, a catequese dos Tenetehara pelos jesuítas iniciou o período de coexistência com Europeus (SOARES DINIZ, 1983). Suas histórias de conflitos, escravidão e dominação duraram mais de 4 séculos,

mas alguns pequenos grupos escaparam para acampamentos distantes da base do rio Pindará-Gurupi, onde eles viveram por décadas (GOMES, 2002; WAGLEY; GALVÃO, 1949). Em 1945, quando o grupo isolado não existia mais, o Dr. Pedro Lima viajou para as vilas do rio Pindará-Gurupi para estudar a bioantropologia e saúde da comunidade (LIMA, 1946). Durante seu trabalho de campo, ele exumou esqueletos dos cemitérios localizados nas vilas Kamirang e Januária, com o consentimento dos líderes Tenetehara. Vinte e um esqueletos completos de adultos e crianças foram recuperados e estudados no MN/UFRJ. Análises recentes revelaram que os indivíduos viveram durante o fim do período colonial e início do império Brasileiro. A amostra designada como SABMN00718 data de 210 ± 40 anos AP (GEOCHRON MA GX31824-AMS C^{13} corrigido) e SABMN00717 data de 140 ± 30 anos AP (BETA 291774-AMS, C^{13} corrigido) (LEITE et al., 2014).

Revisão das características esqueléticas e dentárias

A série dos remanescentes tem numeração original a partir do SABMN00699 ao SABMN00719 no livro da Seção de Antropologia Biológica (MN/UFRJ). As observações dos esqueletos consistiram em 1) descrição das características gerais (BUIKSTRA; UBELAKER, 1994); 2) identificação/confirmação de sinais de possíveis doenças infecciosas (BUIKSTRA; COOK, 1992; ORTNER, 1984); 3) fornecimento de dados contextuais para interpretação de paleo-epidemiológica; e 4) seleção de ossos para análise paleogenética. A maioria dos ossos estava disponível para o estudo, embora ossos pequenos e esponjosos foram perdidos devido a processos tafonômicos em locais úmidos tropicais do cemitério. Os dentes ainda estavam articulados e foram examinados *in situ*. Costelas foram escolhidas para análise devido a sua associação direta com a doença pulmonar e o aceitável estado de preservação. Os critérios para as amostras ósseas serem submetidas a análise de DNA foram: 1) amostras de costelas apenas de adultos/subadultos de ambos os sexos; 2) somente uma costela por indivíduo, direita ou esquerda; e 3) espécimes com sinais patológicos não foram usados nas análises paleogenéticas.

Análise paleogenética

Precauções para evitar contaminação. Precauções foram tomadas para evitar contaminação por DNA moderno e contaminação cruzada, por meio do uso de EPIs, instrumentos e equipamentos estéreis. Implementamos também procedimentos padrões para o manuseio com aDNA, afim de evitar a sua degradação durante a análise paleogenética como descrito em

Iñiguez (2003, 2006, 2011). A preparação das amostras, extração de aDNA e PCR foram realizadas no LP (Labtrip/IOC/Fiocruz), que é um ambiente isolado, exclusivamente dedicado à pesquisa com aDNA. Ensaio de hibridização, controles positivos para construção de sondas de DNA, eletroforeses, sequenciamento de DNA e análises de sequências foram conduzidas no laboratório principal (Labtrip/IOC/Fiocruz). Esses laboratórios são separados por 500m de distância. Todas as superfícies e equipamentos foram limpos com hipoclorito de sódio a 1% e irradiados com luz UV. Todos os reagentes foram separados em alíquotas de uso. Controles negativos das extrações foram processados em paralelo com as amostras (1 controle para cada 6 amostras), e controles negativos das PCRs foram sempre incluídos. O critério de autenticidade incluiu a ausência de pPCR em sedimentos removidos a partir da superfície dos ossos (controles do sítio arqueológico), controles negativos das extrações e PCRs, e pré-tratamento por PR e WGA (Repli-g, Qiagen). Controles positivos das reações de PCR não foram incluídos no LP e foram somente aplicados no laboratório principal (Labtrip/IOC/Fiocruz) como requerimento técnico para a construção de sondas de MTC. Dois e seis alvos moleculares foram usados para hibridização de aDNA de MTC e detecção/genotipagem, respectivamente. DNA humano foi analisado em paralelo com a detecção de aDNA de MTC.

Extração de aDNA. Dezessete amostras de costelas foram fornecidas pela Seção de Antropologia Biológica (MN/UFRJ) para análise paleogenética (Tabela 1). DNA exógeno foi removido das amostras por exposição das superfícies de todos os lados em luz UV por 15 min e posteriormente a camada em contato com o solo foi removida (IÑIGUEZ et al., 2003b). Os ossos foram submetidos a trituração em moinho analítico com nitrogênio líquido. Cerca de 200 mg de pó de osso foram usados para extração de aDNA com o kit QIAmp DNA Investigator (Qiagen) de acordo com instruções do fabricante com modificações: a digestão foi realizada pela adição de 30µl de proteinase K (Invitrogen) a 20mg/ml, o período de incubação foi aumentado para 10 min a temperatura ambiente e a centrifugação final a 17.000 x g por 2 min. As concentrações de aDNA foram estimadas em absorbância de 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop™ 1000. Amostras de sedimentos removidas a partir da primeira limpeza dos ossos foram usadas como controles do sítio arqueológico e submetidas aos procedimentos paleogenéticos de MTC.

Tabela 1: Análise bioantropológica de indivíduos Tenetehara-Guajajara fornecidas pela Seção de Antropologia Biológica

Aldeia	Indivíduos	Sexo ^a	Idade	Tipo de amostra
Kamirang	SABMN00699	M	Adulto	Costela direita
	SABMN00700	F	Jovem	Costela direita
	SABMN00701	F	Adulto	Costela direita
	SABMN00702	M	Adulto	Costela direita
	SABMN00703	M	Adulto	Costela esquerda
	SABMN00704	M	Adulto	Costela esquerda
	SABMN00705	I	Criança	Costela esquerda
Januária	SABMN00706	F	Adulto	Costela esquerda
	SABMN00707	M	Jovem	Costela esquerda
	SABMN00709	F	Adulto	Costela direita
	SABMN00710	M	Adulto	Costela direita
	SABMN00711	M	Adulto	Costela direita
	SABMN00713	I	Criança	Costela direita
	SABMN00714	I	Criança	Costela direita
	SABMN00715	F	Adulto	Costela direita
	SABMN00717	F	Adulto	Costela esquerda
	SABMN00718	M	Adulto	Costela esquerda

^a De acordo com Buikstra e Ubelaker (1994). Adultos > 20 anos; Jovem 14-20 anos; criança 6-13 anos. Abreviações: M, masculino; F, feminino; I, indeterminado

Hibridização de aDNA de MTC. Procedimentos de hibridização Dotblot e aDNA foram conduzidos como descrito em Jaeger e colaboradores (2012). DNA humano foi usado como controle negativo. Sondas de DNA de 93 e 113pb, correspondendo aos alvos moleculares IS6110 e IS1081, respectivamente (TAYLOR; YOUNG; MAYS, 2005; TAYLOR et al., 1996), foram preparadas por PCR. DNA a partir de 4 cepas de MTC foram usadas como controles positivos para as sondas IS6110 e IS1081: *M. tuberculosis* T92 (ATCC27294^T), *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294^T), *M. bovis* BCG (ATCC19210^T) e *M. africanum* T85 (ATCC25420^T). Os pPCRs foram purificados com o kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE Healthcare) e sequenciados usando o kit BigDye Terminator kit (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante, com análises em ambas as direções, em um sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems). BioEdit V.7.0.4 (Departamento de Microbiologia, Universidade do Estado da Carolina do Norte, USA) e Lasergene SeqMan V.7.0.0 (DNASTAR,

Madison, WI, USA) foram usados para edição e análise das sequências. O sequenciamento e análise das sequências foram realizados para confirmar os alvos moleculares para MTC. As sondas foram marcadas por quimioluminescência usando Gene Images Alkphos Direct Labeling e Detection Systems (Amersham) como descrito em Jaeger e colaboradores (2012).

Amplificação de aDNA de MTC. Para confirmar a infecção por MTC e excluir resultados falso positivos ou contaminação por bactéria ambiental, PCRs usando os alvos IS6110 e IS1081 foram conduzidas nas amostras arqueológicas, seguindo condições e iniciadores descritos em Taylor, Young e Mays (2005) e Taylor (1996), e uso de Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Marcadores moleculares para genotipagem adicional de MTC foram aplicados como descrito (Tabela 2). Esses marcadores são amplamente utilizados em estudos de aDNA para determinar espécies ou linhagens de MTC envolvidas na infecção. Nos casos de resultados negativos na PCR, aDNA foi submetido a PR (GOLENBERG; BICKEL; WEIHS, 1996), utilizando Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) e WGA. O pré-tratamento com PR tem sido utilizado para reconstrução de aDNA total (JAEGER et al., 2012), e em relação ao WGA que também foi conduzido, o DNA é amplificado baseado em sequências de iniciadores curtos e randômicos, evitando vieses de amplificação preferencial de algumas regiões em detrimento de outras (SUZUKI et al., 2014). Os pPCRs foram visualizados por eletroforese em gel de agarose e visualizados em luz UV. Devido a fracas bandas obtidas, os pPCRs foram purificados com MiniElute Gel extraction kit (Qiagen1-T). Os resultados das PCRs foram repetidos por pelo menos 2 vezes. Os produtos amplificados foram clonados usando os kits pGEM e pGEM1-T Easy Vector Systems (Promega) seguindo as instruções dos fabricantes, com pelo menos 3 clones produzidos. O sequenciamento e análise das sequências foram realizadas como descrito acima. As sequências de MTC foram submetidas ao GenBank.

Tabela 2: Alvos moleculares usados para amplificar aDNA de MTC em remanescentes humanos Tenetehara-Guajajaras no Estado do Maranhão, Brasil.

Alvo	pPCR (pb)	Polimorfismo TB	Referências
<i>oxyR</i>	110/94	<i>oxyR</i> 285	(TAYLOR et al., 1996)
<i>katG</i>	142	<i>katG</i> 203	(FLETCHER, 2003)
<i>mtp40</i>	152	<i>mtp40</i>	
<i>pncA</i>	117/96	<i>pncA</i> 57	(TAYLOR et al., 1996)

Amplificação de mtDNA humano e sequenciamento. A Região Hipervariável Segmento I (HVS-I) de mtDNA foi utilizada para determinar a ancestralidade humana. Quatro pares de primers foram usados: L16070/H16259 (JAEGER et al., 2012), L16209/H16410 (HANDT et

al., 1996), L16268/H16498 (JAEGER et al., 2016) e L16234: 5'-CACATCAACTGCAACTCCAAA-3'; H16422: 5'-ATTGATTTACGGAGGATGG-3' desenhados para esse estudo usando PRIMER3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). Os procedimentos para PCR, usando Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), foram repetidos pelo menos 2 vezes e os pPCRs foram sequenciados e/ou clonados. Clonagem, sequenciamento e análise das sequências foram realizados como descrito acima. *Cambridge Reference Sequence* (CRS, GenBank: NC12920, (ANDREWS et al., 1999), foi usada para identificar haplótipos de mtDNA e as sequências obtidas foram comparadas com a base de dados de mtDNA da equipe do LP para identificar e descartar sequências contaminadas. As sequências de mtDNA dos indivíduos Tenetehara-Guajararas foram submetidas ao GenBank.

ARTIGO 2: “First Paleogenetic Evidence of Probable Syphilis and Treponematoses Cases in the Brazilian Colonial Period”

Declarações éticas.

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública (Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP) (AMI1) (número do Cep 12/2013). Os materiais ósseos são propriedade da coleção de paleogenética do Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (Labtrip/IOC/Fiocruz) sob supervisão da Dra. Alena Mayo Iñiguez, em colaboração com o Instituto de Arqueologia Brasileira (IAB).

Sítio arqueológico Igreja Nossa Senhora do Carmo

A igreja Nossa Senhora do Carmo, ou Antiga Sé, está localizada na Cidade do Rio de Janeiro, Brasil. A igreja se tornou a capela real após a chegada da família real portuguesa em 1808. No mesmo ano, foi designada como catedral do Rio de Janeiro até 1976. Em 2007, como parte da celebração do bicentenário de sua chegada, a igreja passou por restaurações (DIAS, 2008). Durante a escavação, diversos sepultamentos foram descobertos sob o piso da igreja, compreendendo enterramentos cristãos que ocorreram até a metade do século XIX (RODRIGUES, 1997). A escavação arqueológica foi conduzida pelo IAB em colaboração com pesquisadores do IOC (Fiocruz), Brasil. Artigos relacionados ao catolicismo (crucifixos) foram encontrados próximos ou associados aos corpos enterrados na área da nave e alguns poucos objetos de cultura Africana foram encontrados na área da capela (DIAS, 2008). Análises

bioantropológicas dos esqueletos *in situ* e coleção paleogenética dos remanescentes humanos foram conduzidas por antropólogos e geneticistas, respectivamente (Fig 10A). Análises bioantropológicas (n=32) mostraram que 13 dos indivíduos foram adultos <35 anos, 6 foram adultos maduros >35 anos, 5 foram jovens <20 anos e 2 foram crianças <10 anos (IAB e LP/Labtrip) (JAEGER et al., 2012). A idade foi indeterminada em 6 remanescentes. Oito indivíduos foram identificados como masculinos e 8 como femininos. O sexo foi indeterminado em 16 indivíduos. A ancestralidade matrilinear determinada em 23/32 dos indivíduos mostrou que haplótipos Europeus foram predominantes (21/23) (JAEGER et al., 2012).

Os procedimentos para a coleta paleogenética foram realizados de tal forma a evitar contaminação, durante a escavação, e contaminação cruzada com DNA moderno (IÑIGUEZ, 2014) (Fig 10A). Além de estacionar a degradação de aDNA a partir do momento em que as amostras são removidas de seu microambiente no sítio arqueológico até a aplicação dos procedimentos moleculares realizados no LP/Labtrip (IÑIGUEZ, 2014; IÑIGUEZ et al., 2006). Medidas foram tomadas durante a escavação incluindo o uso de EPIs e instrumentos estéreis (IÑIGUEZ et al., 2003a; IÑIGUEZ, 2014) (Fig 10A). Amostras foram coletadas em baixa intensidade de luz e estocadas a 4°C protegidas em caixas estéreis livre de luminosidade. Elas permaneceram mantidas em refrigeração até o transporte ao laboratório, onde foram armazenadas a -20°C até as análises paleogenéticas serem realizadas (IÑIGUEZ, 2014).

Amostras do enterramento 31, compreendendo 14 crânios e 1 dente (15 indivíduos), foram selecionadas para o estudo. Os dados bioantropológicos disponíveis para este estudo estão na Tabela 3. Baseado na fisiopatologia da infecção por *Treponema* sp., os critérios para seleção de amostras foram indivíduos jovens (BOUWMAN; BROWN, 2005) e que não mostrassem nenhuma evidência de TRE no material ósseo disponível. Lesões compatíveis com TRE consideradas neste estudo foram periostite extensiva (engrossada ou espiculada), de tipo simétrico, principalmente nas diáfises das partes inferiores, especialmente nas tíbias. Também procuramos por porosidades nos crânios, associadas ou não com reações hipertróficas ósseas confluentes, como *caries sicca*, seguindo (ROTHSCHILD, 2005; ROTHSCHILD; ROTHSCHILD, 1996; WALKER et al., 2015). Esses critérios foram baseados nas seguintes premissas: 1) a fase secundária da infecção, que é altamente infectiva, geralmente ocorre em jovens adultos, aumentando a probabilidade de DNA detectável, devido ao número de espiroquetas circulantes ser maior nesta fase da infecção (BOUWMAN; BROWN, 2005) e 2) quando lesões ósseas típicas são visíveis durante a fase terciária, a carga bacteriana é baixa. A falta de lesões ósseas aumenta a chance de detecção de DNA (WOOD et al., 1992). Fragmentos

de crânios foram usados como outro critério de seleção, com base na disponibilidade imediata e tropismo para infecção por *Treponema* sp. (POWELL; COOK, 2005). Na ausência deste tipo de fragmento em um indivíduo, 1 dente foi escolhido por ser uma fonte de material genético bem preservado (OOTA et al., 1995). Três subadultos <18 anos e 3 subadultos <12 anos pertencentes ao enterramento 31, onde a maioria foram de jovens adultos (n=9), foram também incluídos na análise (Tabela 3).

Tabela 3: Dados bioantropológicos dos indivíduos do presente estudo.

Amostra	Idade do grupo	Sexo
INSC1a	Adulto jovem	Feminino
INSC2a	Adulto jovem	Feminino
INSC3a	Adulto jovem	Feminino
INSC4a	12-15 anos	Indeterminado
INSC5a	30 anos	Masculino
INSC6a	<18 anos	Feminino
INSC7a	18-20 anos	Feminino
INSC8f*	<25 anos	Feminino
INSC10	<25 anos	Feminino
INSC11	18-25 anos	Feminino
INSC12a	10-12 anos	Indeterminado
INSC13a	criança	Indeterminado
INSC16	18-20 anos	Feminino
INSC17	<18 anos	Indeterminado
INSC18	10-12 anos	Indeterminado
CPXV6a	15-20 anos	Indeterminado
CPXV8a	<17 anos	Feminino
CPXV9b	<15 anos	Indeterminado
CPXV10a	25-30 anos	Masculino
CPXV12a	23-25 anos	Feminino
CPXV15b	25 anos	Masculino
CPXV16a	25-30 anos	Masculino
CPXV17a	25 anos	Masculino
CPXV20a	22-23 anos	Masculino
CPXV28a	25-35 anos	Masculino

* Um dente foi usado na ausência de fragmento de crânio. Criança: <12 anos; Adulto jovem: <30 anos seguindo o protocolo do IAB

Sítio arqueológico cemitério Praça XV

O cemitério Praça XV foi descoberto e escavado em 1996 durante a construção de um túnel no porto do Rio de Janeiro. O cemitério era conhecido por ter recebido corpos da população geral que morreram nas grandes epidemias, com um importante componente de Africanos escravizados (JAEGER et al., 2013a).

Trinta e sete esqueletos humanos foram recuperados em enterramentos secundários datados do século XVIII. Durante a escavação, conduzida pelo IAB, conjuntos de esqueletos não foram identificados devido ao alto grau de desarticulação anatômica dos indivíduos. Assim, uma série de tipos de ossos, como crânios (Fig 10C) e mandíbulas foram coletados (JAEGER; IÑIGUEZ, 2014). Após a escavação, as amostras foram mantidas em temperatura ambiente, protegidas da luz e passaram por processo de curadoria, com escovação da superfície, sem adição de compostos químicos, para remover a camada de contato com o solo. De acordo com a análise bioantropológica (n=37), 22 dos indivíduos foram adultos jovens <30 anos, 10 adultos maduros >40 anos, 4 adolescentes <17 anos e 1 criança <10 anos (IAB e LP/Labtrip). Dezesete foram masculinos, 14 femininos e 6 indeterminados (JAEGER et al., 2013a). Nove de vinte e dois indivíduos que tinham amostras de dentes disponíveis, mostraram modificações dentárias (Fig 10B) consistentes com práticas étnicas Africanas, mas que foram também descritas em grupos Ameríndios (LIRYO; SOUZA; COOK, 2011). Adicionalmente, ainda foram encontrados objetos de origem Africana ao redor do sítio (Fig 10D) (IAB/LP). Haplogrupos de origem Africana, Ameríndia e Europeia foram verificados em 25% dos indivíduos CPXV (JAEGER et al., 2013b). Para o presente estudo, fragmentos de crânio, correspondendo a 10 indivíduos, foram obtidos do IAB, baseado no critério de seleção descrito acima. Nenhuma evidência de TRE foi observada no material ósseo disponível. Dados bioantropológicos disponíveis para este estudo estão na tabela 3. Oito indivíduos foram adultos jovens <30 anos e 2 subadultos <17 anos.



Fig 10: Coleta paleogenética, remanescentes humanos e artefatos culturais encontrados nos sítios arqueológicos, Rio de Janeiro. (a) Procedimento de coleta paleogenética de amostras ósseas no sítio arqueológico INSC realizado por arqueólogo do IAB, usando equipamentos de proteção individual para preservar a integridade dos remanescentes arqueológicos; (b) Dentes de um indivíduo do sítio CPXV, incluindo modificações dentárias; (c) um crânio humano do sítio arqueológico CPXV; e (d) artefatos de cultura Africana do sítio arqueológico CPXV.

Mantendo a integridade do aDNA

Rigorosas precauções foram tomadas para prevenir a degradação do aDNA e contaminação por DNA moderno durante o processo de coleta e análise no LP/Labtrip, onde ocorreu a preparação das amostras, extração de aDNA, PCR e controles positivos da PCR. Procedimentos pós-PCR incluindo eletroforese e sequenciamento foram conduzidos no Laboratório Central (Labtrip/IOC/Fiocruz), que está localizado a 500m de distância do LP/Labtrip (IÑIGUEZ, 2014). Foram realizadas repetições dos experimentos; controles negativos das extrações foram processados em paralelo com as amostras e controles negativos das reações de PCR foram sempre incluídos. O critério de autenticidade consistiu na ausência de pPCR detectável em sedimentos removidos da área do sacro (controles do sítio

arqueológico), nos controles negativos das extrações e das PCRs. Controles positivos nunca estiveram presentes no LP.

Extração de aDNA

Antes da extração de aDNA as amostras foram descontaminadas: As camadas das amostras que estavam em contato com o solo foram removidas e realizou-se limpeza com hipoclorito de sódio a 1%. Posteriormente, as amostras foram irradiadas em luz UV com 254 nm por 15 min a uma distância de 15 cm (IÑIGUEZ et al., 2006). Após a irradiação, os ossos foram pulverizados em um moinho analítico usando nitrogênio líquido. Aproximadamente 200 mg de pó de osso foi usado para a extração de aDNA com proteinase K como descrito por Iñiguez e colaboradores (2006). Sedimentos (200mg) do sacro dos indivíduos de ambos os sítios, foram usados como controles do ambiente, sendo igualmente submetidos a extração de aDNA. Para a extração, 1 controle negativo foi incluído em cada 6 amostras. O kit DNA IQ System (Promega) foi usado conforme instruções do fabricante para extração de ossos com modificação na temperatura de incubação para 56°C por 2 horas e adição de 20µl de EDTA (0,2M) e 10µl de proteinase K (20mg/ml) com leve agitação. Alternativamente, o kit QIAamp DNA Investigator (Qiagen) foi usado conforme o fabricante, com modificações: ao invés da solução de proteinase K fornecida pelo kit, 30µl de proteinase K (Invitrogen) a 20mg/ml foi usado; o tempo de incubação com TAE foi aumentado para 10 min à temperatura ambiente; e a centrifugação final foi 17.000 x g por 2 min. As concentrações de aDNA foram estimadas em absorbância de 260 nm em um espectrofotômetro Pico200 (Picodrop).

PCR e sequenciamento nucleotídico

Três alvos moleculares foram aplicados correspondendo aos genes *tpp47*, *polA* e *tpp15* de *T. pallidum* usando primers e condições descritas para cada marcador (BEHRHOF et al., 2008; KOLMAN et al., 1999; WENHAI; JIANZHONG; CAO, 2004). Os alvos permitem o diagnóstico de sífilis e treponematoses endêmicas, mas não discrimina entre espécies e subespécies de *Treponema*, com exceção do alvo *tpp15*, que diferencia TPA das outras subespécies (KOLMAN et al., 1999). As PCRs foram realizadas em volume total de 25µl, usando Platinum *Taq Polymerase* (Invitrogen, USA) em um termociclador Eppendorf Mastercycler - PCR Cycler (Eppendorf, Germany). As reações foram analisadas por eletroforese em 1,5 – 2% de gel de agarose *low melt* (Sigma, USA) e visualizadas sob luz UV, após coloração com GelRed Nucleic Acid Gel (Biotium, USA). Todos os controles positivos

incluindo aqueles de tamanhos não esperados foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico. Os pPCRs foram sequenciados usando o kit BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) em um sequenciador de DNA automático 3100 como recomendado pelo fabricante. Os programas Pairwise/Blast/NCBI and BioEdit v. 7.0.1 foram usados para análise das sequências de aDNA. Os resultados obtidos foram submetidos ao GenBank com os números de acesso KU892169-70.

ARTIGO 3: “African helminth infections out of Africa: Paleoparasitological and paleogenetic investigations in *Pretos Novos* cemetery, Rio de Janeiro, Brazil (1769-1830)”

Amostras do estudo

Amostras de sedimentos de indivíduos do sítio arqueológico CPN (n=5), além de amostras controle do sítio (n=7) foram analisadas. As amostras utilizadas no presente trabalho foram obtidas pelo IAB e mantidas na coleção do LP (Labtrip/IOC/Fiocruz) sob responsabilidade da Dra. Alena Mayo Iñiguez. As amostras foram submetidas a processos de curadoria por arqueólogos do IAB, uma prática que envolveu lavagem e escovação do material, mas sem adição de produtos químicos.

Durante a escavação arqueológica, devido ao alto grau de desagregação de partes anatômicas dos corpos dos indivíduos, diversos tipos de ossos, como crânios e ossos longos, foram coletados e estocados em temperatura ambiente na coleção museológica do IAB. Dentes com modificações intencionais, características de Africanos (Liryo et al 2011), miçangas (Fig 11A) e cachimbo (Fig 11B) foram também encontrados (IÑIGUEZ, 2014). Apenas quatro amostras de sacro e 1 de íleo, correspondendo a 5 indivíduos do CPN, estavam disponíveis para pesquisa de parasitos intestinais. Amostras de sedimentos de forames dos sacros e de uma crista ilíaca foram coletados para o estudo. Adicionalmente, sedimentos associados sítios de infecções não específicas ou ossos, como crânios, foram usados como controles do ambiente (Tabela 4). As amostras (n=12) foram coletadas seguindo as condições do protocolo de coleta paleogenética (IÑIGUEZ, 2014), protegidas da luz, preservadas e transportadas sob refrigeração até o LP/Labtrip.

Tabela 4: Indivíduos do cemitério Pretos Novos analisados neste estudo e resultados paleoparasitológico e paleogenético

ID	ID IAB	Tipo de amostra	Sexo	Idade (anos)	Resultados paleoparasitológicos**	Resultados paleogenéticos***
CPN01	Setor B2:B1	Sedimento ambiental	NA	NA	Ácaro	
CPN02	B3	Sedimento ambiental	NA	NA	Ovo não identificado/Monolete	
CPN03	B3	Sedimento de úmero	-	-	<i>Ascaris</i> sp.	
CPN04	B3	Sedimento de crânio	-	-	Negativo	
CPN05	B3	Sedimento de sacro	-	-	Negativo	<i>Ascaris</i> sp. (<i>cytb</i>)
CPN06	Setor B3:B1	Sedimento de sacro	PI	Criança (<2)	Ovo fragmentado de <i>T. trichiura</i>	
CPN07	B4:PN44	Sedimento de crânio	M	Adulto (>30)	Esporos de fungos/Larva de vida livre	
CPN08	B4:PN38	Sedimento de crânio	PI	Adulto jovem (<20)	Negativo	
CPN09	B4:PN36	Sedimento de crânio	PI	PI	Palinomorfo	
CPN10	Setor B6*:B1/2 PN26	Sedimento de íleo	F	Adulto (>20)	Palinomorfo/esporos de fungos	
CPN11	B7	Sedimento de sacro	-	-	Ovo fragmentado de <i>Ascaris</i> sp.	
CPN12	B8	Sedimento de sacro	-	-	Negativo	

ID: identificação do laboratório de paleogenética; ID IAB: identificação do Instituto de Arqueologia Brasileira; NA: não aplicável; -: informação não disponível; M: masculino; F: feminino; PI: parâmetro indeterminado; *ossos queimados; **resultados obtidos pela técnica de sedimentação espontânea, exceto esporos de fungos encontrados na amostra CPN10 que foi pela técnica de centrifugo-flutuação em sulfato de zinco. ***Diagnóstico paleoparasitológico para *Ascaris* sp. e *T. trichiura*.

Análise paleoparasitológica

Para aumentar as chances de encontrar parasitos em amostras de remanescentes do sítio CPN, 3 técnicas parasitológicas foram empregadas: sedimentação espontânea (LUTZ, 1919), centrifugo-flutuação em solução de sacarose modificada (gravidade específica - $g_e = 1300$) (HUBBER; BONFIM; GOMES, 2003) e centrifugo-flutuação em sulfato de zinco a 33% ($g_e = 1180$) (FAUST et al., 1939). As amostras foram reidratadas com solução aquosa de fosfato trissódico a 0,5% (Na_3PO_4) (CALLEN; CAMERON, 1960) durante 24 horas e então submetidas à técnica de sedimentação espontânea (LUTZ, 1919). Duzentos microlitros de cada

amostra foram usados para preparar 10 lâminas que foram analisadas em microscópio de luz Nikon Eclipse E200 em objetiva de 100X. As fotos foram obtidas em aumento de 400X. Alíquotas de 1ml de sedimentos obtidas a partir da sedimentação espontânea foram utilizadas para realizar cada técnica de centrifugo-flutuação. Uma lâmina de cada amostra foi preparada e analisada nas mesmas condições descritas acima.



Fig 11: Artefatos culturais encontrados durante a escavação arqueológica no cemitério dos Pretos Novos, Rio de Janeiro, Brasil. (A) Miçangas Africanas; (B) Fragmento de um cachimbo. Fonte: Iñiguez, coleção AM – IAB.

Considerando os diversos processos tafonômicos envolvendo o cemitério e precauções para evitar contaminação com DNA moderno, esforços metodológicos foram tomados, envolvendo a coleta da amostra, armazenamento, transporte ao laboratório e uso de técnicas parasitológicas (IÑIGUEZ, 2014). As análises paleogenéticas foram conduzidas no LP (Labtrip/IOC/Fiocruz) usando procedimentos padrões para evitar a contaminação do aDNA, degradação e contaminação cruzada, como descrito em Iñiguez (2011, 2014) e Iñiguez e colaboradores (2006b). Duzentos microlitros de cada amostra de sedimento reidratado foram

usados para extração de aDNA com prévio congelamento em nitrogênio líquido. QIAamp® DNA Investigator Kit (QIAGEN) foi usado de acordo com instruções do fabricante, com modificações, incluindo na digestão proteinase K (Invitrogen) a 20mg/ml com tampão ATL a 56°C durante 72 horas (JAEGER et al., 2013b). As concentrações foram estimadas em absorbância de 260nm em um espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000). Whole Genome Amplification (Repli-g/Qiagen) foi aplicado às amostras para aumentar a concentração de aDNA. A PCR foi aplicada usando 4 alvos moleculares para diagnóstico de *Ascaris* sp.: 18S rDNA e *cytb* (LOREILLE et al., 2001), *nad1* e *cox1* (GIJÓN BOTELLA et al., 2010). As modificações para o alvo 18S rDNA foram em volume de 25µl contendo 2,5mM de MgCl₂, 200ng de cada primer, 2,5 unidades de Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen). As condições de ciclagem da PCR foram: um passo de desnaturação a 94°C por 2 min, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg, 44°C de anelamento por 30 seg, polimerização de 72°C por 30 seg e extensão a 72°C por 5 min. Controles negativos das extrações e PCR foram incluídos. Controles positivos não foram aplicados. Para o alvo *cytb* foram seguidas as mesmas condições descritas anteriormente, com exceção do anelamento a 52°C. Para o alvo *nad1*, 25pmol de cada primer e as condições de ciclagem que consistiram em um passo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 seg, anelamento a 45 °C por 40 seg, polimerização a 72°C por 50 seg e extensão a 72°C por 7 min. Para o alvo *cox1*, aplicou-se 100ng de cada primer, seguindo um ciclo de desnaturação a 96°C por 5 min, 40 ciclos de desnaturação a 96°C por 40 seg, anelamento a 45°C por 50 seg, polimerização a 72°C por 50 seg e extensão a 72°C por 5 min. Para o diagnóstico de *T. trichiura* o alvo molecular 18S rDNA foi utilizado de acordo com Oh e colaboradores (2010b). Os pPCRs foram visualizados em gel de agarose *low melt* a 3% corado com GelRed Nucleic Acid Gel (Biotium, USA). A reação de sequenciamento foi realizada usando o kit Big Dye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems) em um sequenciador automático (ABI3730 Applied Biosystems) da plataforma de sequenciamento RPT01A/IOC – Fiocruz. As análises das sequências foram realizadas usando os programas Lasergene Seqman V.7.0.0 (DNASTAR, Madison, Wisconsin) and Bio Edit v. 7.0.4 (Department of Microbiology, North Carolina State University, Raleigh, North Carolina). A ferramenta BLAST/NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) foi utilizada para identificação e obtenção de sequências de DNA até 02/2019.

6- RESULTADOS

A seguir os resultados são apresentados no formato de tese “coletânea”, sendo compostos de 3 artigos científicos publicados ou submetidos a periódicos.

ARTIGO 1: “Tuberculosis in post-contact Native Americans of Brazil: Paleopathological and paleogenetic evidence from the Tenetehara-Guajajara”

Periódico: PlosOne

Status: publicado. PLoS ONE 13(9): e0202394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394>

ARTIGO 2: “First Paleogenetic Evidence of Probable Syphilis and Treponematoses Cases in the Brazilian Colonial Period”

Periódico: BioMed Research International

Status: publicado. Volume 2018, Article ID 8304129, 8 pages

<https://doi.org/10.1155/2018/8304129>

ARTIGO 3: “African helminth infections out of Africa: Paleoparasitological and paleogenetic investigations in *Pretos Novos* cemetery, Rio de Janeiro, Brazil (1769-1830)”.

Periódico: Acta Tropica

Status: submetido

RESEARCH ARTICLE

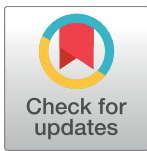
Tuberculosis in post-contact Native Americans of Brazil: Paleopathological and paleogenetic evidence from the Tenetehara-Guajajara

Lucélia Guedes^{1,2}*, Lauren Hubert Jaeger¹*, Andersen Liryo^{3,4}, Claudia Rodrigues-Carvalho^{3,4}, Sheila Mendonça de Souza⁵, Alena Mayo Iñiguez¹*

1 Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, **2** Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, **3** Programa de Pós-graduação em Arqueologia, Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, **4** Setor de Antropologia Biológica, Departamento de Antropologia, Museu Nacional/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, **5** Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

* These authors contributed equally to this work.

* alenainiguez@gmail.com, alena@ioc.fiocruz.br



OPEN ACCESS

Citation: Guedes L, Jaeger LH, Liryo A, Rodrigues-Carvalho C, Mendonça de Souza S, Iñiguez AM (2018) Tuberculosis in post-contact Native Americans of Brazil: Paleopathological and paleogenetic evidence from the Tenetehara-Guajajara. PLoS ONE 13(9): e0202394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394>

Editor: Dan Mishmar, Ben-Gurion University of the Negev, ISRAEL

Received: February 20, 2017

Accepted: August 2, 2018

Published: September 5, 2018

Copyright: © 2018 Guedes et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All sequences files are available from the GenBank database (accession numbers KM066101, KM066102, KM066103, KY039569, MF773496, MF773497).

Funding: We declare that all the funding or sources of support received during this specific study are presented. This study was supported by grants-in-aid and fellowships for Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (<http://www.faperj.br/>) (AMI, grant numbers 26/110.300/2012 and 26/

Abstract

Tuberculosis (TB) has been described in Native American populations prior to the arrival of European explorers, and in Brazilian populations dating from the Colonial Period. There are no studies demonstrating TB infection in native Brazilians, and the history and epidemiological scenario of TB in Brazil is still unknown. The aim of this study was to verify the presence of TB infection among the native Tenetehara-Guajajara population from Maranhão State, Brazil, 210 ± 40 years ago. A Tenetehara-Guajajara skeleton collection was submitted to paleopathological analysis, and rib bone samples (n = 17) were used for paleogenetic analysis based on *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) targets. Porotic hyperostosis and *cribra orbitalia* were found in 10 and 13 individuals, respectively. Maternal ancestry analysis revealed Native American mtDNA haplogroups A and C1 in three individuals. Three samples showed osteological evidence suggestive of TB. *katG* and *mtp40* sequences were detected in three individuals, indicating probable TB infection by two MTC lineages. Tuberculosis infection in the Tenetehara-Guajajara population since the 18th century points to a panorama of the disease resulting, most probably, from European contact. However, the important contribution of African slaves in the population of Maranhão State, could be also considered as a source of the disease. This study provides new data on TB during the Brazilian Colonial Period. This is the first report integrating paleopathological and paleogenetic data for the study of TB in Brazil.

Introduction

Tuberculosis is an infectious disease caused by bacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC), which comprises *Mycobacterium tuberculosis sensu stricto*, *M. africanum*,

202.945/2016), fellowships for Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (<http://www.cnpq.br/>) (AMI, grant numbers 307932/2014-1 and 312934/2017-3), and grants-in-aid for Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (<http://www.capes.gov.br/>) (AMI, grant number 847/15). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

M. canettii, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedi*, and *M. mungi* [1,2]. *Mycobacterium tuberculosis* complex emerged about 70,000 years ago and accompanied migrations of anatomically modern humans out of Africa [3]. Previously, it was believed that human TB originated in other animals, adapting to humans during the Neolithic, but current phylogenetic analyses suggest that strains adapted to other animals diverged from human strains before that period [4,5], and there is an evolutionary distance of at least 20,000 years between *M. tuberculosis sensu stricto* and other animal strains [6].

Paleopathological evidence described in pre-Columbian populations of Peru, Chile [7,8], and Venezuela [9] suggests that tuberculosis existed in America before the arrival of Columbus [10,11]. Genetic study has revealed MTC in human remains from Peru [12,13], Chile [14], and Colombia [15]. Evidence of *Mycobacterium tuberculosis* complex infection caused by ancient strains most closely related to those from sea lions was recently found in Peruvian mummies [16]. In Brazil, ancient MTC DNA (aDNA) has been detected from the Colonial Period of Rio de Janeiro, showing TB infection in individuals of predominantly European ancestry [17], as well as in African slaves [18]. There are no reports of TB infection in pre-Columbian native communities from Brazil.

We used paleogenetic analysis to investigate presence of TB infection in Native American Tenetehara-Guajajara skeletal remains dating from 210 ± 40 years ago, post-contact with Europeans and Africans. Study of a post-contact native group with bone lesions suggestive of TB allowed investigation of biological and cultural influences on disease processes in those Brazilian communities.

Material and methods

Ethics statements

The Tenetehara-Guajajara skeletal remains are held in the collection of the Biological Anthropology Section (*Setor de Antropologia Biológica-SABMN*) of the National Museum of the Federal University of Rio de Janeiro (*Museu Nacional/Universidade Federal do Rio de Janeiro -MN/UFRJ*). Rib samples ($n = 17$), SABMN00699-SABMN00707, SABMN00709-SABMN00711, SABMN00713-SABMN00715, and SABMN00717- SABMN00718, were supplied for the SABMN/MN/UFRJ for analysis at the paleogenetic laboratory of LABTRIP/IOC/Fiocruz. All necessary permits were obtained for the study, which complied with all relevant regulations.

The Tenetehara-Guajajara

The Tenetehara-Guajajara is an extant Tupi speaking native Brazilian community, one of the first to be contacted during the Colonial Period. Tenetehara means "be intact" [19]. Currently, the population of 24,428 individuals [20] is distributed in villages in Pindaré-Gurupi River basin, Maranhão State, Brazilian Amazonia. Their economy was traditionally based on growing corn and cassava, supplemented with hunting and fishing. Its main cultural ceremonies were honey and corn festivals, which accompanied the harvest season [21]. They were first encountered by French explorers in 1612, and, in 1616, Portuguese expeditions for gold began a period of war and slavery [22]. In 1653, catechizing of the Tenetehara by the Jesuits initiated the period of coexistence with Europeans [23]. Their history of conflict, slavery, and domination lasted for more than four centuries, but some small groups succeeded in escaping to distant settlements in the Pindaré-Gurupi River basin, where they lived for decades [24,25].

In 1945, when the isolated Tenetehara no longer existed, Dr. Pedro Lima travelled to the Pindaré-Gurupi River villages to study the bio-anthropology and health of the community [26]. During his ethnographic fieldwork, he exhumed skeletons from cemeteries of Kamirang

and Januária villages, with the full consent of the Tenetehara leaders. Twenty-one complete skeletons of adults and children were recovered and studied at the MN/UFRJ. Recent analysis revealed that the individuals lived during the end of Colonial Period and the beginning of Brazilian Empire. The sample designated SABMN00718 is from 210 ± 40 years BP (GEOCHRON MA GX31824-AMS C^{13} corrected), and SABMN00717 is from 140 ± 30 BP (BETA 291714-AMS, C^{13} corrected) [27].

Review of skeletal and dental characteristics

The original series of remains was numbered from SABMN00699 to SABMN00719 in the book of the Biological Anthropology Section (MN/UFRJ). Skeletons were examined to i) provide general descriptions [28]; ii) identify/confirm signs of possible infectious disease [29,30]; iii) provide contextual data for paleo-epidemiological interpretation; and iv) select bones for the paleogenetic analysis.

Most of the major bones were available for examination, although the small and spongy bones were lost, because of taphonomic processes in the humid tropical location of the cemetery. Teeth were still articulated and were examined *in situ*. Ribs were chosen for analysis because of their direct association with lung disease and acceptable state of preservation.

Criteria for bone samples to be submitted to aDNA analysis were i) rib samples only from adult/subadult skeletons of both sexes; ii) only one rib from each individual, either left or right; and iii) specimens with pathological signs were not used for the paleogenetic analysis.

Paleogenetic analysis

Precautions to avoid contamination. Precautions were taken to avoid contamination by modern DNA and cross-contamination, including use of protective clothing, gloves, head covering, masks, and sterile instruments and equipment. We implemented standard aDNA procedures to avoid aDNA degradation, contamination from modern DNA, and cross-contamination during the paleogenetic analysis as described [31–33]. The preparation of samples, aDNA extraction, and PCR were performed in the Paleogenetic Laboratory (LABTRIP/IOC/FIOCRUZ) in an isolated environment, in facilities exclusively dedicated to aDNA research. Hybridization assay, positive control PCRs for constructing DNA probes, electrophoresis, DNA sequencing, and sequence analysis were conducted at main laboratory (LABTRIP, IOC/FIOCRUZ). These laboratories are separated by 500 m. All work surfaces and equipment were treated with 1% sodium hypochlorite and UV irradiated. All reagents were separated into single-use aliquots. Extraction blank controls were processed in parallel with samples (1 blank for each 6 samples), and PCR negative controls were always included. The authenticity criteria included the absence of detectable PCR products (pPCR) in sediment removed from the surface of bones (archaeological site controls), extraction blank and PCR negative controls, and pretreatment by reconstructive polymerization (PR) and Whole Genome Amplification (WGA- REPLI-g, Qiagen). PCR positive controls were not included in the Paleogenetic Laboratory and were only applied in the main laboratory (LABTRIP, IOC/FIOCRUZ) as a technical requirement for the construction of MTC probes. Two and six genetic targets were used for MTC aDNA hybridization and detection/genotyping, respectively. Human DNA was analyzed in parallel with the MTC aDNA detection.

aDNA extraction. Seventeen ribs were provided by the biological anthropology section (MN/UFRJ) for paleogenetic analysis (Table 1). Exogenous DNA was removed from samples by exposing the surface to UV light for 15 min on all sides and subsequently removing the surfaces [34]. Bones were submitted to mill trituration with liquid nitrogen. About 200 mg of bone powder was used for aDNA extraction with the QIAmp DNA Investigator kit (Qiagen)

Table 1. Bio-anthropological analysis of Tenetehara-Guajajara individuals from the Biological Anthropology collection (MN/UFRJ).

Village	Individual	Sex ^a	Age	Sample
Kamirang	SABMN00699	M	Adult	Right rib
	SABMN00700	F	Young	Right rib
	SABMN00701	F	Adult	Right rib
	SABMN00702	M	Adult	Right rib
	SABMN00703	M	Adult	Left rib
	SABMN00704	M	Adult	Left rib
	SABMN00705	U	Child	Left rib
Januária	SABMN00706	F	Adult	Left rib
	SABMN00707	M	Young	Left rib
	SABMN00709	F	Adult	Right rib
	SABMN00710	M	Adult	Right rib
	SABMN00711	M	Adult	Right rib
	SABMN00713	U	Child	Right rib
	SABMN00714	U	Child	Right rib
	SABMN00715	F	Adult	Right rib
	SABMN00717	F	Adult	Left rib
	SABMN00718	M	Adult	Left rib

^a According to [28]. Adults >20 years; Young 14–20 years; Child 6–13 years. Abbreviations: M, male; F, female; U, undetermined.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394.t001>

according to the manufacturer’s instructions with the following modifications: Protein digestion was performed by adding 30 µL of proteinase K (Invitrogen) at 20 mg/µL, and the incubation period of elution buffer was increased to 10 minutes at room temperature and final centrifugation at 17,000 xg for 2 minutes. The concentrations of aDNA were estimated at 260 nm absorbance on a spectrophotometer NanoDrop™ 1000. Sediment samples removed from the first cleaning of bones were used as controls for the archaeological site and submitted to MTC paleogenetic procedures.

MTC aDNA hybridization. Dotblot and aDNA hybridization procedures were conducted as described elsewhere [17]. Human DNA was used as negative control. DNA probes of 93 and 113 bp, corresponding to MTC molecular targets IS6110 and IS1081, respectively [35,36], were prepared by PCR. DNA from four MTC type strains were used as hybridization positive controls for IS6110 and IS1081 probes: *M. tuberculosis* T92 (ATCC27294^T), *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294^T), *M. bovis* BCG (ATCC19210^T) and *M. africanum* T85 (ATCC25420^T). The pPCRs were purified by a GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE HealthCare) and directly sequenced 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. BioEdit 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. Sequencing and sequence analysis were performed to confirm MTC molecular targets. Probes were labeled by chemiluminescence using Gene Images Alkphos Direct Labeling and Detection Systems (Amersham) as described elsewhere [17].

MTC aDNA amplification. To confirm MTC infection and exclude false positive or environmental bacteria contamination, PCRs using MTC targets IS6110 and IS1081 were conducted on archaeological samples, following conditions and primers described [35, 36], using Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). Additional MTC genotyping

Table 2. Targets used to amplify MTC aDNA from Tenetehara-Guajajara skeletal remains from Maranhão State, Brazil.

Target	PCR product (bp)	TB polymorphism	References
<i>oxyR</i>	110/94	<i>oxyR</i> 285	[36]
<i>katG</i>	142	<i>katG</i> 203	[39]
<i>mtp40</i>	152	<i>mtp40</i>	[39]
<i>pncA</i>	117/96	<i>pncA</i> 57	[36]

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394.t002>

markers were applied, as described (Table 2). These molecular targets are widely used in aDNA studies to determine MTC species or lineages implicated in TB infection. In cases of negative PCR results, aDNA was submitted to reconstructive polymerization (RP) [37], using Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), and whole genomic amplification (WGA) (S1 Table). Reconstructive polymerization pretreatment has been used for reconstructing and amplifying total aDNA [17]. WGA was also conducted, since, in contrast to RP, the DNA is amplified based on short and random sequence primers, avoiding bias [38]. PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gels and visualized under UV light. Due to the weak bands obtained, pPCRs were purified with MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen). PCR results were replicated at least twice. pPCRs were submitted to cloning using pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems kit (Promega) following manufacturer’s instructions, with least three clones produced. Sequencing and sequence analysis were performed as described above. MTC sequences were submitted to GenBank.

Human mtDNA amplification and sequencing. The hypervariable segment I (HVS-I) of the mtDNA was used as target to determine human ancestry. Four primer pairs were used: L16070/H16259 [17], L16209/H16410 [40], L16268/H16498 [41] and L16234: 5’ -CACATCAACTGCAACTCCAAA-3’ and H16422: 5’ -ATTGATTTACGGAGGATGG-3’, designed in this study using PRIMER3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). PCR procedures, using Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), were replicated at least twice and pPCRs directly sequenced or/and cloned. Cloning, sequencing, and sequence analysis were performed as described above. Cambridge Reference Sequence (CRS, GenBank: NC12920, [42]) was used to identify mtDNA haplotypes, and sequences obtained were compared with mtDNA database of the paleogenetic lab staff to identify and discard contaminated sequences. The Tenetehara-Guajajara mtDNA sequences were submitted to GenBank.

Results and discussion

Relevant skeletal and dental data

Skeletal remains of 17 adults/subadults of the Tenetehara collection were analyzed, comprising eight males, six females, and three undetermined (Table 1). The long bones were gracile and the stature was short. The results were consistent with the description in ethnographic literature and the anthropometric descriptions for contemporaneous Tupi groups in Brazilian Amazonia. According to Lima [43], anthropometric studies of living Tenetehara showed the smallest stature among the Tupi groups (1.4–1.5 m). Our findings of small stature and the extremely frail and delicate long bones, in both males and females, pointed to severe malnutrition and underdevelopment, consistent with descriptions of poor health suffered by the Tenetehara over the centuries [25]. Individuals living in the mid-20th century experienced severe infections such as malaria and pneumopathies, as well as other conditions including stunted growth [43].

The rounded mongoloid skull was consistent with the description of most Native Amazonian communities, and dental loss and caries were observed in most individuals. Intentional dental modification was described in contemporary Tenetehara-Guajajara by Lima [43] and confirmed in the present study. So-called *piranha* teeth, with both angles of the four upper incisors cut off with a blade [43], were present in individuals SABMN00699, SABMN00701, SABMN00704, SABMN00707, and SABMN00715 (Fig 1A). As previously suggested and discussed [43,44], this dental modification was not a cultural tradition of the Tenetehara-Guajajara, and was possibly adopted after African slave and Afro-American influence during the Colonial and Imperial Periods. African influence is especially important, considering the substantial proportion of Africans in the population of Maranhão State [21].

Analysis of the joint surfaces and stress markers such as porotic hyperostosis and *cribra orbitalia* indicated trauma and underweight affecting even the young individuals, consistent with people facing extreme challenges to survival. Some developmental anomalies, such as butterfly vertebrae, and rib anomalies were observed (Fig 1B and 1C). Some bone indicators (Table 3; Fig 2) supported the hypothesis of nutritional and infectious stress [45]. Porotic

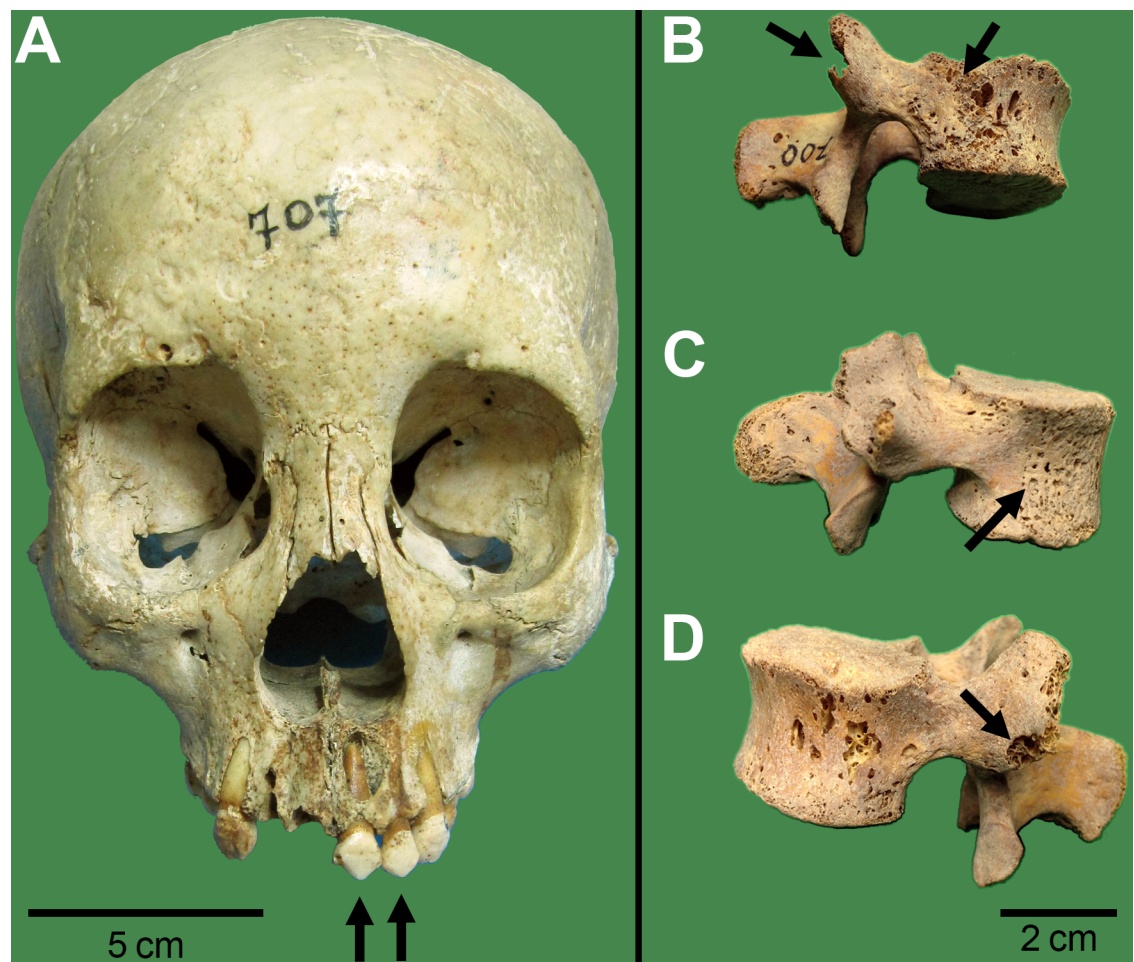


Fig 1. Intentional dental modification and bone anomalies suggestive of TB in skeletal remains of Tenetehara-Guajajara. (A) Frontal view of the skull of individual SABMN00707. The arrows indicate intentional dental mutilation of the upper incisors, the so-called *piranha* teeth. (B-D) Lumbar vertebrae of individual SABMN00700. (B) Left arrow indicates bone loss at the upper right zygapophysis of vertebrae. Right arrow indicates porotic changes of the vertebral body suggestive of TB. (C) Porotic changes suggestive of TB at the vertebral body (arrow). (D) Bone loss at the upper left zygapophysis of vertebrae (arrow).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394.g001>

Table 3. Paleogenetic and paleopathological data from Tenetehara-Guajajara skeletal remains from Maranhão State, Brazil.

Village	Sample	MTC Hybridization		mtDNA Human ancestry	Bone lesions suggestive of TB and stress markers
		IS6110	IS1081		
Kamirang	SABMN00699	-	-		porotic hyperostosis
	SABMN00700	+	+		lithic areas in cervical and lumbar vertebrae; rib periostitis; porotic hyperostosis; <i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00701	+	+	C1	rib periostitis; <i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00702	+	+		porotic hyperostosis
	SABMN00703	+	+	A	<i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00704	-	-	C1	periosteal reaction at lumbar vertebra; porotic hyperostosis; <i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00705	-	-		porotic hyperostosis; <i>cribra orbitalia</i>
Januária	SABMN00706	-	-		<i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00707	-	-		porotic hyperostosis; <i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00709	-	-		-
	SABMN00710	-	-		porotic hyperostosis; <i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00711	+	+		-
	SABMN00713	-	-		porotic hyperostosis; <i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00714	-	-		<i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00715	-	+		<i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00717	-	+		porotic hyperostosis; <i>cribra orbitalia</i>
	SABMN00718	+	-		porotic hyperostosis; <i>cribra orbitalia</i>

Abbreviations: MTC, *Mycobacterium tuberculosis* complex; (+) positive; (-) negative.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394.t003>

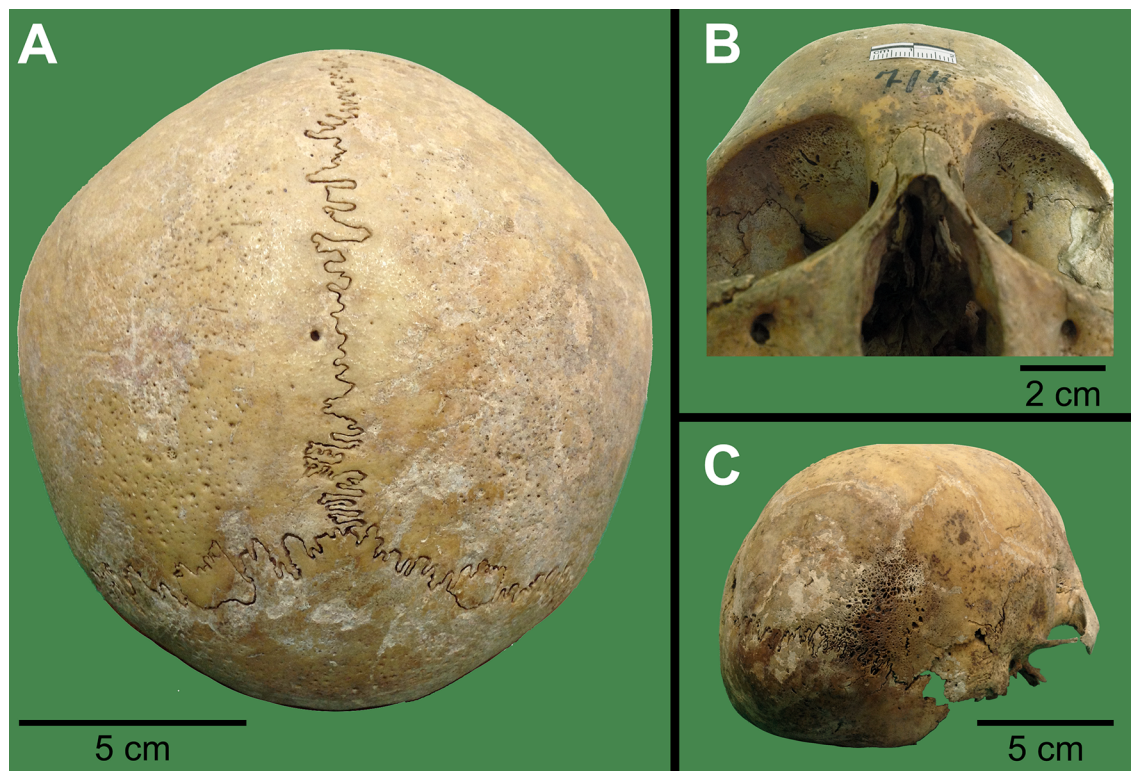


Fig 2. Paleopathological evidence in skeletal remains of Tenetehara-Guajajara. (A) Porotic hyperostosis in skull from individual SABMN00710. (B) Frontal view of skull from individual SABMN00714 showing *cribra orbitalia* (C). Lateral view of the skull from individual SABMN00714 with bone proliferation at the outer table.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394.g002>

hyperostosis (Fig 2A) and *cribra orbitalia* (Fig 2B) were found in 10 and 13 of the 17 individuals, respectively. Porotic hyperostosis was described by Mello et al. [46] who studied 20 Tenetehara-Guajajara skulls of adults and immature individuals, finding 16 positive for *cribra orbitalia* (Fig 2B) and porotic hyperostosis (Fig 2C). The authors, as supposed by Lima [43], suggested endemic malaria as a possible cause of anemia.

Tuberculosis in the Tenetehara-Guajajara individuals was first suggested by Altamirano [47], who observed destructive changes in some vertebral bodies and periosteal reactions in the skeletons of adult SABMN00700, SABMN00701, and SABMN00704 (Fig 1B–1D). Although bone anomalies could be suggestive of TB, mycotic lesions must be considered.

Findings of Altamirano [47] confirmed by the present study were as follows:

1. SABMN00700: 13–14 year old female—discoloring at the internal surface of the 7th, 8th, and 9th left ribs suggestive of periostitis; small lithic lesions at the pedicles and other areas of the vertebral arches and bodies.
2. SABMN00701: 20–25 year old female—periosteal reactions in ribs and other bones plus trauma suggestive of possible infection.
3. SABMN00704: 30–35 year old male—periosteal reaction in the ventral part of the body of a lumbar vertebra.

The characteristics of the Tenetehara-Guajajara skeletons are consistent with the poor health associated with economic constraints, poverty, and social disruption described in the ethnohistorical and bio-anthropological reports, contributing to recurrent epidemic or endemic diseases such as malaria, pneumopathies, smallpox, and others [43].

mtDNA analysis

Some fragments of HVS-I target were successfully amplified by PCR, cloned and sequenced (S1 Fig). Human mtDNA analysis identified the mtDNA haplogroup in three Tenetehara individuals (17.6%) (Table 3). The haplogroups classified were the Amerindian mtDNA macrohaplogroups A and C1 (GenBank ID KM066101–KM066103). We recovered and analyzed 183 bp of the mtDNA sequence of individual SABMN00703, which showed two of three HVS-I motifs for haplogroup A, 16223 and 16290 [48]. Cloning of pPCRs using L16209/H16410 primers confirmed 99–100% Amerindian haplotype (S1 Fig).

Sequences 353 and 239 bp in length were recovered from SABMN00701 and SABMN704, respectively (Table 3). The sequences showed the HVS-I motifs 16223, 16298, 16325, and 16327 (Table 4), which characterize haplogroup C1 [48]. Cloning of pPCRs using L16070/H16259–L16234/H16422 and L16268/H16498 primers confirmed 100% and 99–100% of

Table 4. Human mtDNA haplogroups and HVS-I polymorphism in Tenetehara-Guajajara remains, Maranhão State, Brazil.

Samples	Nucleotide position ^a										mtDNA Haplogroup
	1	2	2	2	2	2	3	3	3	4	
	2	0	2	9	9	9	2	2	6	9	
	9	4	3	0	2	8	5	7	2	6	
CRS	G	G	C	C	C	T	T	C	T	G	
SABMN00701	.	.	T	.	T	C	C	T	C	–	C1
SABMN00703	–	A	T	T	–	A
SABMN00704	–	–	–	.	T	C	C	T	C	A	C1

^a Prefix 16 according to Cambridge Reference Sequence (CRS)—GenBank: NC012920 [42]. Abbreviations: bp, base pair; (.), nucleotide equal to CRS; (–), not sequenced.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394.t004>

haplotype identification in SABMN00701 and SABMN704, respectively (S1 Fig). Haplogroup sequences for SABMN00701 and SABMN00704 revealed 100% and 99% identity, respectively, with haplogroup C1 from Native South Americans (KC676569 [49]; JQ996071 [50]; EU095227 [51]).

Our results agree with Leite et al. [27] who identified haplogroups A and C in ancient Tenehara-Guajajara remains. Haplogroup A is the most frequently found in contemporary Brazilian Natives. The autochthonous haplogroup C1 is widely distributed among North, Central, and South Americans [52,53]. In Brazil, it was found in a native Je speaking group from the 19th century called the Botocudo [54]. In contemporary populations, the C1 haplogroup has been described in a native Karib speaking group called Arara, from Pará State [51], a neighbor to Maranhão State. It was also observed in about 70% of Amerindian descendants of a rural community of Minas Gerais State, Southern Brazil, and described in 16.7% of haplogroups from modern unrelated samples from the same region [54]. Moreover, HVS-I motifs from C1 haplogroup have been observed in other regions of the country [55].

Tuberculosis

Positive MTC hybridization was observed in eight of 17 Tenetehara individuals, including six and seven with the IS6110 and IS1081 targets, respectively (Table 3). Five samples showed positive hybridization results with both targets.

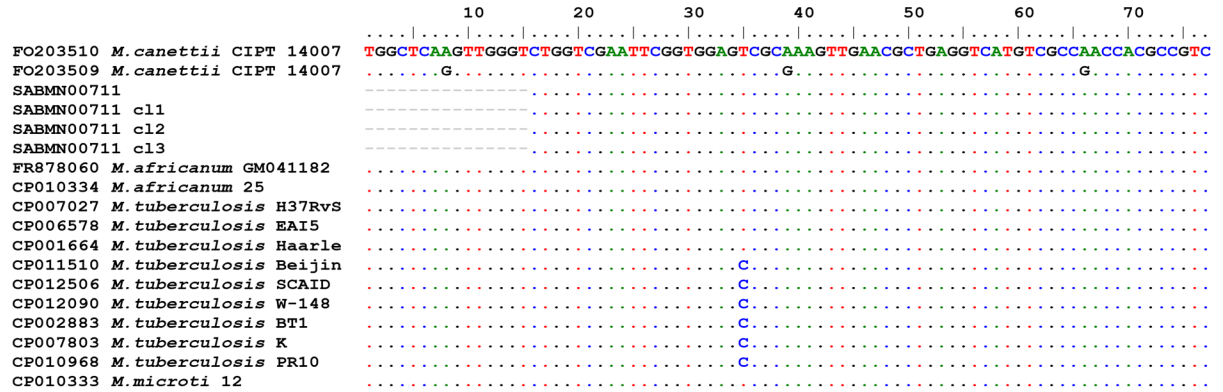
SABMN00700 and SBMN00701, which showed periosteal reactions and indications of infective lesions were positive for MTC hybridization by both IS6110 and IS1081. A third individual (SABMN00704) with rib periosteal reactions did not show positive results for MTC aDNA hybridization. Seven specimens positive for MTC hybridization demonstrated porotic hyperostosis and *cribra orbitalia* (Table 3).

All positive pPCR including those of unexpected length were submitted to nucleotide sequencing. The MTC sequencing that provided low quality or no sequences were excluded. Nucleotide sequencing confirmed PCR results for *mpt40* and *katG* targets in three individuals. PCR exhibited absence of amplification for all molecular targets in negative controls, even after application of RP and WGA.

RP and WGA increased the aDNA concentration (S1 Table) and probably aDNA quality, make PCR amplification more efficient. These approaches have been applied by us, and others, in paleogenetic studies [17,31,32, 56–58]. We chose to use the WGA based on MDA technology which uses a Phi29 polymerase which has 3'→5' exonuclease activity and a higher fidelity during replication compared to *Taq* DNA polymerase (qiagen.com). However, RP and WGA could produce chimeras in non-homogenous aDNA extracts. Forst and Brown [59] attested that WGA does not provide advantage in studies of MTC aDNA in human skeletons. However, previously, Forst [60] verified the success WGA application in archaeological samples to detect the MTC complex [59,60]. The author stated that probably the efficiency of technique depends on the age and preservation of sample. Accordingly, the experience with WGA application seems to be divergent. We obtained good increases on aDNA concentration, but indistinct tendency in PCR target detection (S1 Table). Since all positive pPCR were cloned and sequenced, if chimeras resulting of RP or WGA treatment were produced, they would be easily identified during the sequence analysis. The aDNA sequences from this study showed 100–98% of identity with the molecular targets applied, so, there is no doubts on the positive results achieved.

We obtained *mtp40* sequence fragment (Fig 3A) from individual SABMN00711 (GenBank: KY039569) and the complete sequence of the *katG* target (GenBank: MF773496-97) from SABMN00709 and SABMN00710 (Fig 3B).

3A



3B

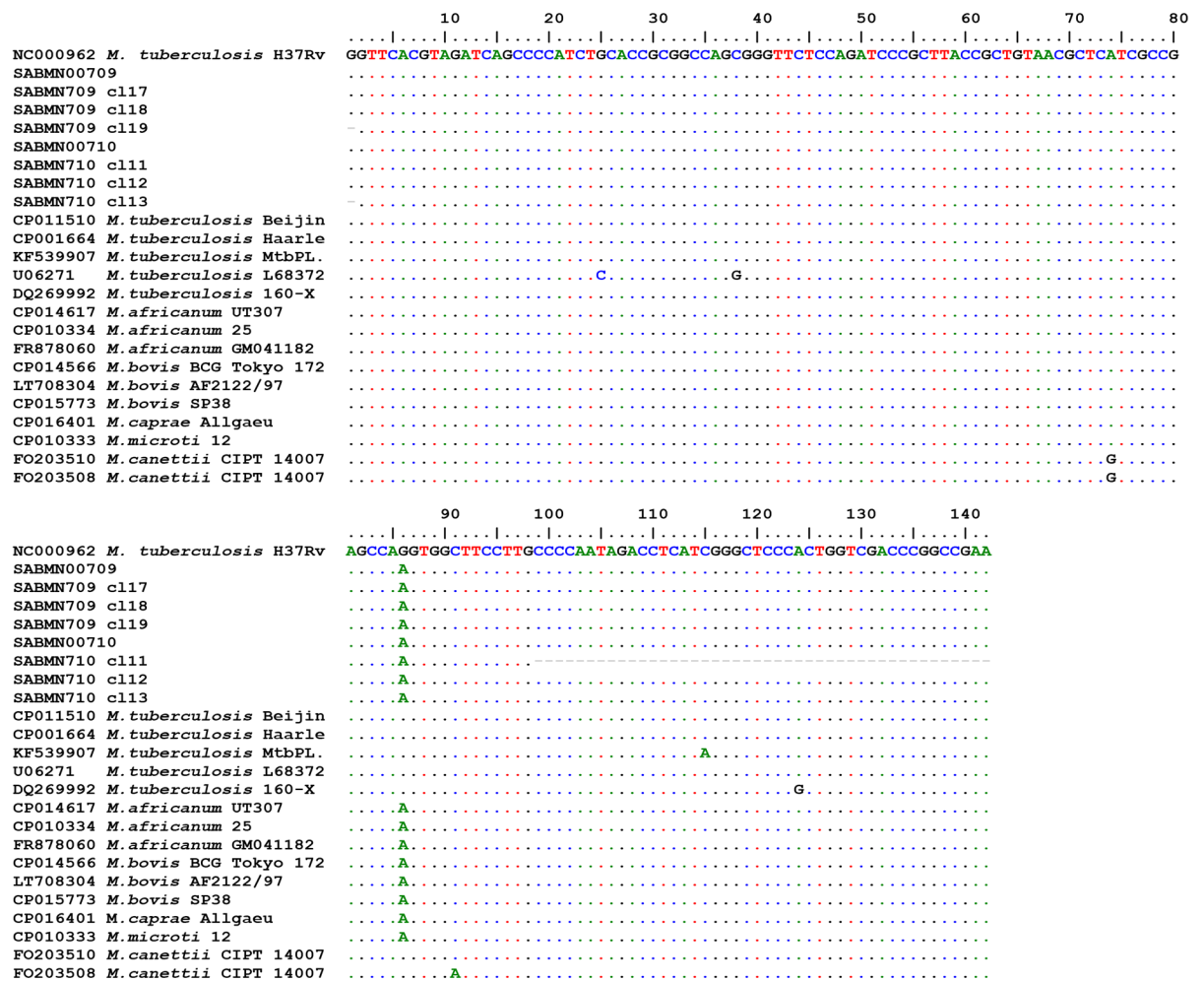


Fig 3. Mycobacterium tuberculosis complex alignments of *mtp40* and *katG* sequences of Tenetehara-Guajajara individuals. 3A: *mtp40* sequence and clones from sample SABMN00711 with *M. canettii* (GenBank FO203510) as reference sequence. All *M. canettii*, *M. africanum*, and *M. microti* sequences available in GenBank were included. The two type sequences from *M. tuberculosis* are shown with the T35C polymorphism. 3B: Alignment of *katG* sequences and clones of Tenetehara-Guajajara individuals SABMN00709 and SABMN00710 using *M. tuberculosis* (GenBank NC000962) as reference sequence. All *M. caprae*, *M. microti*, and *M. canettii* sequences available in GenBank were included.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202394.g003>

The *mtp40* sequence demonstrated 100% or 98% identity with all *M. tuberculosis* sequences available. The SABMN00711 sequence showed T at position 35 (Fig 3A) identical to H37R (GenBank: CP007027), EAI (GenBank: CP006578), and Haarlem (GenBank: CP001664) strains. In contrast to the Beijing (GenBank: CP011510) strain, which exhibits the T35C SNP (Fig 3A). Maximum identity was observed with other MTC strains, including *M. africanum* 25 (GenBank: CP010334), *M. canettii* CIPT140070017 (GenBank: FO203510), and *M. microti* 12 (GenBank: CP010333). *mtp40* is absent in some MTC strains, including *M. bovis*, *M. caprae*, and some *M. tuberculosis* [16]. Nevertheless, it has been shown to be specific for *M. tuberculosis* and *M. africanum* [61,62]. The short sequence amplified did not allow confirmation of the MTC species/lineage involved in SABMN00711 infection, but strongly indicated infection by these species rather than by *M. bovis*. Fletcher et al. [39] detected the *mtp40* gene in three 18th century Hungarian mummies, excluding *M. bovis* infection. The SABMN00711 individual was positive for IS aDNA hybridization, but no TB or nonspecific bone lesions were observed. The present study confirmed infection by pathogenic MTC *Mycobacteria*.

The *katG* sequences from samples SABMN00709 and SAMMN00710 showed the SNP A74G that discriminates *M. canettii* and G86A strains from all *M. tuberculosis* and *M. canettii* sequences. G86A SNP is present in *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, and *M. microti* strains and corresponds to the ACT (Thr) 203 codon described (in reverse position) by Fletcher et al. [39]. The *katG* 203 target has been used to identify MTC subspecies. Huard et al [63] classified MTC species in four principal genetic groups (PGG), with ACT *katG* 203 present in PGG1a, including *M. africanum* subtype Ia, *M. microti*, *M. caprae*, and *M. bovis*. Other PPGs with ACC *katG* 203 include 1b: *M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum* subtype Ib; 2: *M. tuberculosis*; 3: *M. tuberculosis*. Fletcher et al [39] genotyped PGG 2 and 3 in 18th century human remains found in a Hungarian crypt by *katG* analysis. In the present study, MTC strain PPG 1a was identified, suggesting *M. africanum* subtype Ia or *M. bovis* infection in samples SABMN00709 and SABMN00710, rather than *M. tuberculosis* strains. Both these individuals were negative for IS aDNA hybridization, and only SABMN00710 had both porotic hyperostosis and *cribra orbitalia*, bone evidence of poor health.

Tuberculosis genotyping revealed two MTC species/lineages affecting the Tenetehara-Guajajara population. The *mtp40* results pointed to *M. tuberculosis* or *M. africanum* strains, while *katG* ruled out *M. tuberculosis* strains, suggesting *M. africanum* and *M. bovis* members. This multiple infection possibility reflects the post-contact scenario blending cultures and epidemiological backgrounds of Europeans and Africans.

Jong et al. [64] discussed possible reasons that *M. africanum* has not become established outside of West Africa. They point out that, even with the massive migration to the Americas during slave trade, the diseased either did not survive the journey, or, if it did, was outcompeted in the New World by *M. tuberculosis* [64]. Host preference of *M. africanum* for ethnic West Africans was also suggested by the authors as a reason it did not become established in Native Americans or European explorers. The results presented here may show some level of *M. africanum* strain infection.

A previous study discussed the lack of specificity of IS6110 and IS1081 targets [65]. Our attempts to sequence other specific targets were not satisfactory, except for the *katG* and *mtp40* segments. This was not unexpected, due to the highly degraded aDNA. Hybridization is reported to be more sensitive than PCR in aDNA detection [17], especially in highly degraded samples [66] that are better analyzed by probes that can bind to the fragmented aDNA, unlike PCR, which requires the presence of intact DNA fragments for amplification. We applied IS aDNA hybridization as a screening tool for MTC diagnosis, due to its sensitivity, with the subsequent application of a more specific approach based on PCR, cloning, and sequencing of specific MTC targets. The results confirmed MTC infection in three individuals. However, it is

important to note that IS aDNA hybridization failed in screening for MTC infection, since two of three TB-positive individuals were negative by this technique. In addition, one of the three showed bone evidences of poor health with porotic hyperostosis and *cribra orbitalia* manifestations.

Finding anatomically normal bones positive for MTC aDNA has been previously described, including in skull, femur, and ribs [17,18]. Rollo et al. [67] argue that the manifestations of disease in bones are generally expressions of chronic conditions. In addition, MTC strain, as well as organs of primary focus may affect the presence and distribution of bone lesions. Either contiguous spread or bloodstream dissemination can explain MTC presence in bones, as well as pathological lesions. Periosteal reactions may be explained by blood dissemination from distant foci [68], or contiguous inflammatory responses. On the other hand, during TB infection, systemic blood dissemination may occur without visible macroscopic lesions in bones [69,70].

No detailed medical documents can be found for the Colonial Period or for Jesuits and travelers during the Empire Period in Maranhão State. Data from the former Native Protection Service (*Serviço de Proteção ao Índio*—SPI) and other Brazilian government agencies concerned with indigenous health, confirm the endemic conditions of the Tenetehara-Guajajara in the 20th century. Records describe malaria, smallpox, and syphilis, as well as TB, among other endemic and epidemic diseases. The impoverished living standards of the Tenetehara-Guajajara population following the Colonial Period contributed to health issues faced in the past century. Some of their groups succeeded in escaping slavery and extermination, migrating upstream in the Pindaré-Gurupi basin, and remaining isolated in poor conditions for almost a century.

As described by Wilbur and Buikstra [71], social disruption, forced mobility, crowding onto reservations, poor sanitation, extreme poverty, and malnutrition, with frequent exposure to pathogens, contributed to TB as a population-wide health problem. This was the case with the Tenetehara-Guajajara people since the 18th century. Tenetehara-Guajajara individuals studied here lived from the mid-18th to the mid-19th centuries in contact with Brazilian society after traditional isolation. They probably had contact with European explorers, as well as with African and/or Brazilian mestizos. In the mid-19th century, the village of Januária was colonized while Afro-Brazilian people were escaping from the Cabanagem wars in the region [24]. Cultural practices described by [43] and others confirm the contact with, and the assimilation of, African culture.

Paleogenetic studies showed TB infection in Rio de Janeiro during the 17th to 19th centuries [17,18], when poor sanitation and parasitic infections were widespread in urban areas regardless of social status [72,73]. The prevalence of TB of 53.1% in people of European ancestry demonstrated the prominent contribution of Europeans to the introduction or spread of disease in the city [17]. Additionally, 25% MTC infection among just-arrived African slaves revealed TB resulting from European contact in Africa and/or caused by native African strains [17]. The Tenetehara-Guajajara had contact with French, Portuguese, and other ethnic groups during the Brazilian Colonial Period [22,23] as well as with African-born individuals in Maranhão State, the capital of which, São Luís, was an important slave port [24,43]. Historical descriptions reported TB epidemics in Europe during the 16th and 18th centuries [74], coincident with the period of first contact and strong penetration of explorers into Tenetehara-Guajajara territory in the Pindaré-Gurupi River basin region.

Although it is well-known that TB existed in America before Columbus, possibly at a low level of endemicity [74,75], there is no paleopathological evidence of TB in pre-contact Brazilian populations. Some Native American communities may have never been exposed to infection, while others had certainly been in contact with some mycobacteria strains [11]. This

study did not determine the source of Tenetehara-Guajajara infection, but we cannot rule out the possibility of African, or worldwide, strains.

Our findings suggest that the association of positive TB aDNA and bone lesions in the Tenetehara-Guajajara skeletal series is epidemiologically supported, not only by the living conditions, but by indicators of poor health condition in the remains. Cranial porotic lesions are cited among the most frequent pathological signs in ancient human skeletal collections, and have been widely accepted as probably caused by anemia, a high pathogen load, or to scurvy [76–78].

Conclusions

In this study, we described for the first time MTC infection in a post-contact Native Brazilian population with paleopathological evidence suggestive of TB. This study provides new data supporting the occurrence of TB in the Brazilian Colonial Period. Paleopathological evidence suggested TB infection among native groups in the Pindaré-Gurupi River basin, far from the urbanized areas and farmlands created during the Colonial Period.

It is not clear whether TB infection in Tenetehara-Guajajara was caused by contact with European settlers or African slaves. They were infected by at least two MTC strains. Despite the limited number of individual remains examined, these results can have valuable impact on filling gaps in the history of TB in the Americas.

Supporting information

S1 Table. Data of aDNA concentrations of extract type, including pre-treated aDNA with RP and WGA for each sample and obtained pPCR confirmed by sequencing.

(XLSX)

S1 Fig. mtDNA alignment with clones generated in this study. Nomenclature of clones: The first number correspond to mtDNA PCR target (cl1-cl4) and the second to the number of clones generated. Target 1: primers L16070/H16259; 2: L16209/H16410; 3: L16234/H16422; 4: L16268/H16498.

(TIF)

Acknowledgments

We are grateful to PDTIS/FIOCRUZ genomic platform for assistance and LAPIH (IOC/FIOCRUZ).

Author Contributions

Conceptualization: Alena Mayo Iñiguez.

Data curation: Lucélia Guedes, Andersen Liryo, Claudia Rodrigues-Carvalho, Sheila Mendonça de Souza, Alena Mayo Iñiguez.

Formal analysis: Lucélia Guedes, Lauren Hubert Jaeger, Andersen Liryo, Sheila Mendonça de Souza, Alena Mayo Iñiguez.

Funding acquisition: Alena Mayo Iñiguez.

Investigation: Lucélia Guedes, Lauren Hubert Jaeger, Andersen Liryo, Sheila Mendonça de Souza, Alena Mayo Iñiguez.

Methodology: Lucélia Guedes, Lauren Hubert Jaeger, Alena Mayo Iñiguez.

Project administration: Alena Mayo Iñiguez.

Resources: Claudia Rodrigues-Carvalho, Alena Mayo Iñiguez.

Software: Alena Mayo Iñiguez.

Supervision: Sheila Mendonça de Souza, Alena Mayo Iñiguez.

Validation: Lucélia Guedes, Lauren Hubert Jaeger, Andersen Liryo, Claudia Rodrigues-Carvalho, Sheila Mendonça de Souza, Alena Mayo Iñiguez.

Visualization: Alena Mayo Iñiguez.

Writing – original draft: Lucélia Guedes, Lauren Hubert Jaeger, Alena Mayo Iñiguez.

Writing – review & editing: Lucélia Guedes, Sheila Mendonça de Souza, Alena Mayo Iñiguez.

References

1. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16: 1296–1299. <https://doi.org/10.3201/eid1608.100314> PMID: 20678329
2. Gagneux S. Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2012; 367: 850–859. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0316> PMID: 22312052
3. Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, et al. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of Mycobacterium tuberculosis with modern humans. *Nat Genet*. 2013; 45: 1176–1182. <https://doi.org/10.1038/ng.2744> PMID: 23995134
4. 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 U S A*. 2002; 99: 3684–3689. <https://doi.org/10.1073/pnas.052548299> PMID: 11891304
5. Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, et al. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of Mycobacterium tuberculosis. *PLOS Pathog*. 2005; 1: e5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010005> PMID: 16201017
6. 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: e1000160. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000160> PMID: 18802459
7. Allison MJ, Mendoza D, Pezzia A. Documentation of a case of tuberculosis in Pre-Columbian America. *Am Rev Respir Dis*. 1973; 107: 985–991.
8. Konomi N, Lebwohl E, Mowbray K, Tattersall I, Zhang D. Detection of Mycobacterial DNA in Andean Mummies. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 4738–4740. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4738-4740.2002> PMID: 12454182
9. Requena A. Evidencia de tuberculosis en la América Precolombina. *Acta Venezolana*. 1945; 1: 141–164.
10. Buikstra J. Paleoepidemiology of tuberculosis in the Americas. In: Pálfi G, Dutour O, Deák J, Hutás I, editors. *Tuberculosis, Past and Present*. Budapest: Golden Book Publisher Ltd; 1999. pp. 293–298.
11. Darling MI, Donoghue HD. Insights from paleomicrobiology into the indigenous peoples of pre-colonial America—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014; 109: 131–139. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140589> PMID: 24714964
12. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.05.019>
13. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci*. 1994; 91: 2091–2094. PMID: 8134354
14. Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA. Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am J Phys Anthropol*. 1995; 98: 37–45. <https://doi.org/10.1002/ajpa.1330980104> PMID: 8579189
15. Sotomayor H, Burgos J, Arango M. Demonstration of tuberculosis by DNA ribotyping of Mycobacterium tuberculosis in a Colombian prehispanic mummy. *Biomed Rev Inst Nac Salud*. 2004; 24 Supp 1: 18–26.

16. Bos KI, Harkins KM, Herbig A, Coscolla M, Weber N, Comas I, et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature*. 2014; 514: 494–497. <https://doi.org/10.1038/nature13591> PMID: 25141181
17. Jaeger L, Leles D, Lima V, Silva L, Dias O, Iñiguez A. Mycobacterium tuberculosis complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Genet Evol*. 2012; 12: 642–648. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.021> PMID: 21896337
18. Jaeger L, M.F.M. de Souza S, Dias O, Iñiguez A. Mycobacterium tuberculosis Complex in Remains of 18th–19th Century Slaves, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2013; 19: 837–839. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1905.120193>
19. Ribeiro F. Políticas Tenetehara e Tenetahara na política: Um estudo sobre as estratégias de uma campanha eleitoral direcionada a uma população indígena. M.Sc. Thesis, São Paulo University. 2009. <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/8/8134/tde-03052010-102616/pt-br.php>.
20. IBGE. IBGE Censo demográfico Brasileiro. 2013 [cited 14 march 2014]. In: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [internet]. Brasil. <http://censo2010.ibge.gov.br/resultados.html>
21. Melatti J. Áreas etnográficas da América Indígena: Amazônia Oriental. 1st ed. Brasília: Brasília University Press; 2011.
22. Varga I van D. A insustentável leveza do estado: devastação, genocídio, doenças e miséria nas fronteiras contemporâneas da Amazônia, no Maranhão. *Acta Amaz*. 2008; 38: 85–100. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672008000100010>
23. Soares Diniz E. Convívio e dependência. Os Tenetehara-Guajajara. *J Societé Américanistes*. 1983; 69: 117–127. <https://doi.org/10.3406/jsa.1983.2227>
24. Gomes M. O Índio na História: O Povo Tenetehara em Busca da Liberdade. 1st ed. Petrópolis: vozes; 2002.
25. Wagley C, Galvão E. The Tenetehara Indians of Brazil: A culture in Transition. 1st ed. New York: AMS Press; 1949.
26. Lima P. Os Índios Tenetehara: Nota de uma pesquisa de Antropologia física. *Rev Instit Hist Geog Brasil*. 1946; 190: 77–81.
27. Leite D, Leitão A, Schaan AP, Marinho ANR, Souza S, Rodrigues-Carvalho C, et al. Paleogenetic Studies in Guajajara Skeletal Remains, Maranhão State, Brazil. *Journal of Anthropology*. 2014; 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/729120>
28. Buikstra J, Ubelaker D. Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains. 1st ed. Fayetteville: Arkansas Archeological Series; 1994.
29. Buikstra J, Cook D. Paleopatologia. In: Araújo AJG, editor. Paleopatologia e Paleoepidemiologia: estudos multidisciplinares. Rio de Janeiro: Panorama ENSP; 1992. p. 343.
30. Ortner SB. Theory in Anthropology since the Sixties. *Comp Stud Soc Hist*. 1984; 26: 126. <https://doi.org/10.1017/S0010417500010811>
31. Iñiguez AM, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98: 63–65. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000900012> PMID: 12687765
32. Iñiguez A, Reinhard K, Carvalho Gonçalves M, Ferreira L, Araújo A, Paulo Vicente A. SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int J Parasitol*. 2006; 36: 1419–1425. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.07.005> PMID: 16950265
33. Iñiguez AM. Paleoparasitologia Molecular. In: Ferreira LF, Reinhard KJ, Araújo AJG, editors. Fundamentos da paleoparasitologia. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2011. pp. 301–316.
34. Iñiguez AM, Reinhard KJ, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP. *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from north and south American human coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98: 67–69. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000900013> PMID: 12687766
35. Taylor GM, Young DB, Mays SA. Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 2236–2240. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2236-2240.2005> PMID: 15872248
36. Taylor MG, Crossey M, Saldanha J, Waldron T. DNA from *Mycobacterium tuberculosis* identified in Mediaeval Human Skeletal Remains Using Polymerase Chain Reaction. *J Archaeol Sci*. 1996; 23: 789–798. <https://doi.org/10.1006/jasc.1996.0073>
37. Golenberg EM, Bickel A, Weihs P. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Res*. 1996; 24: 5026–5033. PMID: 9016676
38. Suzuki K, Saso A, Hoshino K, Sakurai J, Tanigawa K, Luo Y, et al. Paleopathological Evidence and Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from Archaeological Skeletal Remains of Nabe-kaburi (Head-

- Covered with Iron Pots) Burials in Japan. PLOS ONE. 2014; 9: e88356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088356> PMID: 24516638
39. Fletcher HA. Molecular analysis of Mycobacterium tuberculosis DNA from a family of 18th century Hungarians. *Microbiology*. 2003; 149: 143–151. <https://doi.org/10.1099/mic.0.25961-0> PMID: 12576588
 40. Handt O, Krings M, Ward RH, Pääbo S. The retrieval of ancient human DNA sequences. *Am J Hum Genet*. 1996; 59: 368–376. PMID: 8755923
 41. Jaeger LH, Gijón-Botella H, del Carmen del Arco-Aguilar M, Martín-Oval M, Rodríguez-Maffiotte C, del Arco-Aguilar M, et al. Evidence of Helminth Infection in Guancho Mummies: Integrating Paleoparasitological and Paleogenetic Investigations. *J Parasitol*. 2016; 102: 222–228. <https://doi.org/10.1645/15-866> PMID: 26641720
 42. 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: 147. <https://doi.org/10.1038/13779> PMID: 10508508
 43. Lima P. Deformações Tegumentares e Mutilação Dentária entre os índios Tenetehara. *Bol Museu Nacional*. 1954; 16: 1–22.
 44. Liryo A, de Souza SM, Cook DC. Dentes intencionalmente modificados e etnicidade em cemitérios do Brasil Colônia e Império. *Rev Mus Arqueol E Etnologia*. 2011; 0: 315–334. <https://doi.org/10.11606/issn.2448-1750.revmae.2011.89979>
 45. Buikstra JE, Cook DC. Palaeopathology: An American Account. *Annu Rev Anthropol*. 1980; 9: 433–470. <https://doi.org/10.1146/annurev.an.09.100180.002245>
 46. Mello e Alvim M, Gomes J. Paleopatologia & Paleoepidemiologia: Hipersostose Porosa: Anemia Malária? Índios Guajajara—Estudo de Caso. 1st ed. Rio de Janeiro: Série Panoma ENSP; 1992.
 47. Altamirano A. Comprometiendo la estructura Osteo-Facial de las Poblaciones Humanas del Antiguo Perú por la Leishmaniasis Tegumentaria de forma mucosa y su Significado Cultural. Ph.D Thesis. Fundação Oswaldo Cruz. 2000. http://portaldesicict.fiocruz.br/transfp.php?script=thes_print&id=00010800&lng=pt/
 48. Tamm E, Kivisild T, Reidla M, Metspalu M, Smith DG, Mulligan CJ, et al. Beringian Standstill and Spread of Native American Founders. *Carter D, editor. PLoS ONE*. 2007; 2: e829. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000829> PMID: 17786201
 49. Cardena MMSG, Ribeiro-Dos-Santos A, Santos S, Mansur AJ, Pereira AC, Fridman C. Assessment of the relationship between self-declared ethnicity, mitochondrial haplogroups and genomic ancestry in Brazilian individuals. *PloS One*. 2013; 8: e62005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062005> PMID: 23637946
 50. Ramallo V, Bisso-Machado R, Bravi C, Coble MD, Salzano FM, Hünemeier T, et al. Demographic expansions in South America: enlightening a complex scenario with genetic and linguistic data. *Am J Phys Anthropol*. 2013; 150: 453–463. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22219> PMID: 23341256
 51. Fagundes NJR, Kanitz R, Eckert R, Valls ACS, Bogo 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: 583–592. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.11.013> PMID: 18313026
 52. Achilli A, Perego UA, Bravi CM, Coble MD, Kong Q-P, Woodward SR, et al. The Phylogeny of the Four Pan-American MtDNA Haplogroups: Implications for Evolutionary and Disease Studies. *Macaulay V, editor. PLoS ONE*. 2008; 3: e1764. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001764> PMID: 18335039
 53. Goebel T, Waters MR, O'Rourke DH. The Late Pleistocene Dispersal of Modern Humans in the Americas. *Science*. 2008; 319: 1497–1502. <https://doi.org/10.1126/science.1153569> PMID: 18339930
 54. Gonçalves VF, Parra FC, Gonçalves-Dornelas H, Rodrigues-Carvalho C, Silva HP, Pena SD. Recovering mitochondrial DNA lineages of extinct Amerindian nations in extant homopatric Brazilian populations. *Investig Genet*. 2010; 1: 13. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-1-13> PMID: 21122100
 55. Gonçalves VF, Carvalho CMB, Bortolini MC, Bydlowski SP, Pena SDJ. The phylogeography of African Brazilians. *Hum Hered*. 2008; 65: 23–32. <https://doi.org/10.1159/000106059> PMID: 17652961
 56. Leles D, Araújo A, Ferreira LF, Vicente ACP, Iñiguez AM. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Colombian South America times. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008; 103: 106–108. PMID: 18327505
 57. Poulakakis N, Parmakelis A, Lymberakis P, Mylonas M, Zouros E, Reese DS, et al. Ancient DNA forces reconsideration of evolutionary history of Mediterranean pygmy elephantids. *Biol Lett*. 2006; 2: 451–454. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0467> PMID: 17148428
 58. Mikić AM. The First Attested Extraction of Ancient DNA in Legumes (Fabaceae). *Front Plant Sci*. 2015; 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01006> PMID: 26635833

59. Forst J, Brown TA. Inability of “Whole Genome Amplification” to Improve Success Rates for the Biomolecular Detection of Tuberculosis in Archaeological Samples. *PLOS ONE*. 2016; 11: e0163031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163031> PMID: 27654468
60. Forst J. Detecting and Sequencing Mycobacterium tuberculosis aDNA from Archaeological Remains. Ph.D. Thesis. The University of Manchester. 2015. [https://www.research.manchester.ac.uk/portal/en/theses/detecting-and-sequencing-mycobacterium-tuberculosis-adna-from-archaeological-remains\(a806f3a9-8d22-4395-a1ff-a3ffbc1c8cc\).html](https://www.research.manchester.ac.uk/portal/en/theses/detecting-and-sequencing-mycobacterium-tuberculosis-adna-from-archaeological-remains(a806f3a9-8d22-4395-a1ff-a3ffbc1c8cc).html)
61. Liébana E, Aranaz A, Francis B, Cousins D. Assessment of genetic markers for species differentiation within the Mycobacterium tuberculosis complex. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 933–938. PMID: 8815111
62. Zink AR, Nerlich AG. Molecular strain identification of the Mycobacterium tuberculosis complex in archival tissue samples. *J Clin Pathol*. 2004; 57: 1185–1192. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015719> PMID: 15509681
63. Huard RC, Lazzarini LC de O, Butler WR, van Soelingen D, Ho JL. PCR-based method to differentiate the subspecies of the Mycobacterium tuberculosis complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 1637–1650. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1637-1650.2003> PMID: 12682155
64. de Jong BC, Antonio M, Gagneux S. Mycobacterium africanum—Review of an Important Cause of Human Tuberculosis in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: e744. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000744> PMID: 20927191
65. Müller R, Roberts CA, Brown TA. Complications in the study of ancient tuberculosis: Presence of environmental bacteria in human archaeological remains. *J Archaeol Sci*. 2016; 68: 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2016.03.002>
66. Jaeger L, Iñiguez A. Molecular Paleoparasitological Hybridization Approach as Effective Tool for Diagnosing Human Intestinal Parasites from Scarce Archaeological Remains. Veitia R, editor. *PLoS ONE*. 2014; 9: e105910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105910> PMID: 25162694
67. Rollo F, Ermini L, Luciani S, Marota I, Olivieri C. Studies on the preservation of the intestinal microbiota’s DNA in human mummies from cold environments. *Med Secoli*. 2006; 18: 725–740. PMID: 18175619
68. Donoghue HD. Insights gained from palaeomicrobiology into ancient and modern tuberculosis. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2011; 17: 821–829. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03554.x> PMID: 21682803
69. Baron H, Hummel S, Herrmann B. Mycobacterium tuberculosisComplex DNA in Ancient Human Bones. *J Archaeol Sci*. 1996; 23: 667–671. <https://doi.org/10.1006/jasc.1996.0063>
70. Müller 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: 178–189. <https://doi.org/10.1002/ajpa.22417> PMID: 24226751
71. Wilbur AK, Buikstra JE. Patterns of tuberculosis in the Americas: how can modern biomedicine inform the ancient past? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101: 59–66. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006001000011> PMID: 17308811
72. Jaeger L, Taglioretti V, Fugassa M, Dias O, Neto J, Iñiguez A. Paleoparasitological results from XVIII century human remains from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop*. 2013; 125: 282–286. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.11.007> PMID: 23200641
73. Jaeger LH, Taglioretti V, Dias O, Iñiguez AM. Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th century in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Paleopathol*. 2013; 3: 214–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2013.04.001> PMID: 29539459
74. Daniel TM. The impact of tuberculosis on civilization. *Infect Dis Clin North Am*. 2004; 18: 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(03\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(03)00096-5) PMID: 15081511
75. Gómez i Prat J, de Souza SMFM. Prehistoric tuberculosis in america: adding comments to a literature review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98 Suppl 1: 151–159.
76. Roberts CA, Buikstra JE. The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a The bioarchaeology of tuberculosis. A global view on a reemerging disease. 1st ed. Gainesville, Florida: University Press of Florida; 2003.
77. Walker PL, Bathurst RR, Richman R, Gjerdrum T, Andrushko VA. The causes of porotic hyperostosis and cribra orbitalia: a reappraisal of the iron-deficiency-anemia hypothesis. *Am J Phys Anthropol*. 2009; 139: 109–125. <https://doi.org/10.1002/ajpa.21031> PMID: 19280675
78. Zuckerman MK, Garofalo EM, Frohlich B, Ortner DJ. Anemia or scurvy: A pilot study on differential diagnosis of porous and hyperostotic lesions using differential cranial vault thickness in subadult humans. *Int J Paleopathol*. 2014; 5: 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2014.02.001> PMID: 29539465

Research Article

First Paleogenetic Evidence of Probable Syphilis and Treponematoses Cases in the Brazilian Colonial Period

Lucélia Guedes,¹ Ondemar Dias,² Jandira Neto,² Laura da Piedade Ribeiro da Silva,² Sheila M. F. Mendonça de Souza,³ and Alena Mayo Iñiguez ¹

¹Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LABTRIP), Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365 – Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-900, Brazil

²Instituto de Arqueologia Brasileira, Estr. Cruz Vermelha, 45 – Vila Santa Teresa, Belford Roxo, Rio de Janeiro, RJ 26193-415, Brazil

³Departamento de Endemias Samuel Pessoa, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, R. Leopoldo Bulhões, 1480 Bonsucesso, Rio de Janeiro, RJ 21041-210, Brazil

Correspondence should be addressed to Alena Mayo Iñiguez; alenainiguez@gmail.com

Received 20 March 2018; Revised 25 May 2018; Accepted 12 September 2018; Published 10 October 2018

Guest Editor: Hisashi Fujita

Copyright © 2018 Lucélia Guedes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Despite interest in the origins of syphilis, paleopathological analysis has not provided answers, and paleogenetic diagnosis remains a challenge. Even venereal syphilis has low infectivity which means there are few circulating bacteria for most of the individual's life. Human remains recovered from the Nossa Senhora do Carmo Church (17th to 19th centuries) and the Praça XV Cemetery (18th to 19th centuries), Rio de Janeiro, Brazil, were subjected to *Treponema* paleogenetic analysis. Historical data point to endemic treponemal infections in the city, including venereal syphilis. Based on the physiopathology of *Treponema pallidum* infection, 25 samples, mostly from skull remains of young adults, with no visible paleopathological evidence of treponematoses, were analyzed. PCR with three molecular targets, *tpp47*, *polA*, and *tpp15*, were applied. Ancient DNA *tpp15* sequences were recovered from two young adults from each archaeological site and revealed the polymorphism that characterizes *T. p.* subsp. *pallidum* in a female up to 18 years old, suggesting a probable case of syphilis infection. The results indicated that the epidemiological context and the physiopathology of the disease should be considered in syphilis paleogenetic detection. The findings of *Treponema* sp. aDNA are consistent with historical documents that describe venereal syphilis and yaws as endemic diseases in Rio de Janeiro. Data on the epidemiological characteristics of the disease and its pathophysiology offer new perspectives in paleopathology.

1. Introduction

The geographic origin of syphilis, an infectious disease caused by the spirochete *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* [1], is controversial. Three hypotheses have been proposed to explain the emergence of venereal syphilis. The pre-Columbian hypothesis proposes that syphilis and other human treponematoses originated in the Old World before New World contact but was misdiagnosed [2]. The Columbian hypothesis proposes that syphilis arose in the New World before the contact period and was transported to Europe by Columbus's sailors [3]. Lack of immunity against the disease facilitated rapid dispersion among Europeans. This hypothesis is supported by ethnographic reports of the use of medicinal plants for the treatment of the disease in the

New World [4, 5]. Finally, the Unitarian hypothesis suggests that there is a single treponeme with wide global distribution, and that, due to differences in climate, geographic conditions, and cultural practices, it is expressed as different forms of the disease [6]. These include syphilis and the so-called non-venereal or endemic treponematoses (ET): yaws (*T. pallidum* subsp. *pertenue*), bejel or endemic syphilis (*T. pallidum* subsp. *endemicum*), and pinta (*Treponema carateum*) [7]. All treponemes infecting humans exhibit biochemical, histological, microbiological, genetic, and antigenic similarities [4, 8]. Differences in incidence, geographical distribution, age at acquisition, main mode of transmission, clinical manifestations, capacity for invasion, and severity of late stage disease have been demonstrated [9–11]. Therefore, genetic analysis could be useful in the differential diagnosis of

Treponema species and subspecies. Complete genomes of *T. p.* subsp. *pallidum* and *T. p.* subsp. *pertenue*, which cannot be distinguished morphologically, show 99.8% identity [12]. Phylogenetic studies indicated that syphilis seems to have emerged in the Americas since *Treponema* spp. evolutionary rates are compatible with pre-Columbian times [13] and no evidence for European strains prior to the syphilis pandemic was detected [13, 14]. However, reports of pre-Columbian venereal syphilis outside the Americas and the possibility that ancient syphilis strains existed in the Old World [13, 14] imply that the topic of syphilis origin is unsolved.

Paleopathological differentiation of treponematoses is challenging. The osteological lesions caused by *Treponema* sp. and other infectious disease parasites are similar, and treponeme lesions are most pronounced in advanced stages [15, 16]. However, reproducible osseous patterns, including frequency in bone involvement, that support discrimination among treponematoses have been documented [17–19]. Ancient DNA (aDNA) analysis can be a useful tool for study of *T. pallidum* in archaeological samples and provides an opportunity to research the origins of syphilis. Kolman et al. [20] reported the detection of *T. p.* subsp. *pallidum* aDNA in a 200-year-old skeleton from Easter Island with a lesion typical of syphilis. This confirmed the first paleogenetic identification of venereal syphilis based on the polymorphism of the *tpp15* lipoprotein gene that is specific to the subspecies. Montiel et al. [21] reported recovery of *T. p.* subsp. *pallidum* aDNA from bones of human neonates recovered from the crypt of La Ermita de la Soledad (16th and 17th centuries), Spain. The aDNA was detected by PCR using *tpp15* and *arp* genes as molecular targets. Recently, Schuenemann et al. [22] used next-generation sequencing (NGS) for reconstructing genomes of *T. p.* subsp. *pallidum* and *T. p.* subsp. *pertenue* from skeletons recovered from Mexico City (17th and 19th centuries), which belonged to a perinate and infants with treponematoses manifestations.

Venereal syphilis is the most severe treponematoses, affecting various tissues and organs, including the nervous system and causing severe disability and death. It develops in three stages, and is characterized by long latent and low-infectious periods. The tertiary phase of the disease, when the typical gummatous and inflammatory bone lesions occur, is the least infectious phase. This might suggest that paleogenetic analysis could be fruitless in the study and diagnosis of treponematoses. The secondary but highly infectious phase of the disease could provide a diagnostic opportunity, although it cannot normally be identified in the osteoarchaeological record, since it is not associated with visible skeletal lesions [23, 24].

During endemic and epidemic periods, when a significant portion of the population is affected, the possibility of obtaining positive aDNA results for treponematoses by surveying skeletal keeps increases. In this study, human remains recovered from the Nossa Senhora do Carmo Church (17th to 19th centuries) and the Praça XV cemetery (18th and to 19th centuries), located in the city of Rio de Janeiro, Brazil, were submitted to *Treponema* aDNA analysis. Historical data point to endemic treponemal infections, including venereal syphilis, in the city. The investigation of bone samples from

all available individuals provided the first paleoepidemiologic scenario from the Brazilian Colonial Period.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement. This study was submitted to, and approved by, the Research Ethics Committee Nacional School of Health Public (Escola Nacional de Saúde Pública-ENSP) [AMII] (CEP number 12/2013). The bone materials are the property of the paleogenetic collection of the Laboratório de Biologia de Tripanosomatídeos (LABTRIP/IOC/Fiocruz) under the supervision of Dra. Alena Mayo Iñiguez, in collaboration with the Institute of Brazilian Archaeology (Instituto de Arqueologia Brasileira-IAB).

2.2. Nossa Senhora do Carmo Church Site. The Nossa Senhora do Carmo Church (INSC), or Old Cathedral, is located in Rio de Janeiro city, Brazil. The church became the royal chapel upon the arrival of the Portuguese royal family in 1808. In the same year, it was designated the cathedral of the city and remained so until 1976. In 2007, as part of the celebration of the bicentennial of the arrival of the Portuguese royal family, the chapel was restored [25]. During the work, several burials were discovered under the church floor, comprising Christian interments that took place until the mid-19 century [26]. The archaeological excavation was conducted by the IAB in collaboration with researchers of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Brazil. Articles relating to Catholicism (crucifixes) were found near or associated with the bodies buried in the nave area, and a few objects of African culture were found in the chapel area [25]. Bioanthropological analysis of skeletons *in situ* and paleogenetic collection of human remains were conducted by an anthropologist and a geneticist, respectively (Figure 1(a)). Bioanthropological analysis (n = 32) showed 13 of individuals were adults <35 years, 6 were mature adults >35 years, 5 were young <20 years, and 2 were children <10 years (IAB and PL/LABTRIP) [27]. The age was undetermined in the remaining 6. Eight individuals were identified as male and eight as female. Sex was undetermined in the remaining 16. The human matrilineal ancestry determined in 23/32 of the INSC individuals demonstrated that European ancestry was predominant (21/23) [27].

Paleogenetic collection involved recovering the archaeological remains in such a way as to avoid contamination during excavation as well as cross-contamination with modern DNA [28] (Figure 1(a)). It also prevented the degradation of aDNA from the time that remains were removed from their microenvironment at the archaeological site until the aDNA procedures were carried out at PL/LABTRIP [28, 29]. Measures taken during excavation included wearing protective clothing, gloves, head covering, masks, and use of sterile instruments [28, 30] (Figure 1(a)). Samples were collected in low intensity lighting and stored at 4°C protected from light in sterile containers. They were transported to the laboratory at 4°C and held at –20°C until paleogenetic analysis was performed [28].

Samples from burial, 31 comprising 14 skull fragments and 1 tooth (15 individuals), were selected for investigation. Bioanthropological data available from this study is



FIGURE 1: Paleogenetic collection, human remains, and cultural artifacts found in the Rio de Janeiro archaeological sites. (a) Procedure of paleogenetic collection of osteological samples in the INSC archaeological site performed by IAB archeologist, wearing individual protective equipment to preserve the integrity of archaeological remains; (b) a human skull from CPXV archaeological site; (c) teeth from CPXV individual, including intentional dental modifications; and (d) artifacts of African culture from CPXV archaeological site.

in Table 1. Based on the physiopathology of *Treponema* infection, the criteria for sample selection were that they should be taken from young adults [31] and show no evidence of treponematoses, in the osteological material available. Lesions compatible with treponematoses considered in this study were extensive periostitis (thickened or spiculated), of symmetrical-type, mainly in the diaphysis of the lower limbs, especially in the tibia. We also searched for localized porosities in the skulls, associated or not with hypertrophic and confluent bone reactions, as *caries sicca* type, following [9, 17, 18]. These criteria were based on the following assumptions: (1) the clinical progress of the infection is such that the highly infective secondary phase of syphilis generally occurs in young adults, increasing the probability of detectable DNA, since the number of circulating spirochetes is high only in this phase of the disease [31] and (2) when the typical bone lesions are visible during the tertiary phase, the bacterial load is low. The lack of bone lesions increases the chance of DNA recovery [15]. Skull tissue was used, as another criterion of selection, based on ready availability and its tropism for *Treponema* sp. infection [32]. In the absence of the skull in one individual, a tooth was chosen as an alternate source of well-preserved genetic material [33]. Three subadults <18 years and 3 subadults <12 years buried on burial 31, which most were young adults (n=9), were also included in the analysis (Table 1).

2.3. Praça XV Cemetery Site. The Praça XV Cemetery (CPXV) was discovered and excavated, in 1996 during the construction of a tunnel at the port of Rio de Janeiro. The cemetery was known to have received bodies of the general population who died in major epidemics with an important African slave component [34].

Thirty-seven human skeletons were recovered from secondary burials dated from 18th century. During excavation, conducted by the IAB, complete skeletal series were not identified due to a high degree of anatomic disarticulation of individuals; instead, a series of types of bones (skulls (Figure 1(b)) and mandibles, for example) were collected [35]. After excavation, samples were kept at room temperature and protected from light and underwent a curation process of brushing the surface to remove soil without use of chemicals. According to bioanthropological analysis, (n=37) 22 of CPXV individuals were young adults <30 years, 10 mature adults >40 years, 4 adolescents <17 years, and 1 child <10 years (IAB and PL/LABTRIP). Seventeen were male and 14 female, and in 6 sex was undetermined [34]. Nine of twelve individuals from which tooth samples were available showed dental modifications (Figure 1(c)) consistent with African ethnic practices but also described in Amerindian groups [36]. Objects of African culture were found around the site, as well (Figure 1(d)) (IAB and PL/LABTRIP). African, European, and Amerindian haplogroups were verified in

TABLE 1: Bioanthropological data of individuals of the present study.

Sample	Age group	Sex
INSC1a	Young adult	Female
INSC2a	Young adult	Female
INSC3a	Young adult	Female
INSC4a	12-15 years	Undetermined
INSC5a	30 years	Male
INSC6a	<18 years	Female
INSC7a	18-20 years	Female
INSC8 [*]	<25 years	Female
INSC10a	<25 years	Female
INSC11	18-25 years	Female
INSC12a	10-12 years	Undetermined
INSC13a	Child	Undetermined
INSC16	18-20 years	Female
INSC17	<18 years	Undetermined
INSC18	10-12 years	Undetermined
CPXV6a	15-20 years	Undetermined
CPXV8a	<17 years	Female
CPXV9b	<15 years	Undetermined
CPXV10a	25-30 years	Male
CPXV12a	23-25 years	Female
CPXV15b	25 years	Male
CPXV16a	25-30 years	Male
CPXV17a	25 years	Male
CPXV20a	22-23 years	Male
CPXV28a	25-35 years	Male

* A tooth was used in the absence of the skull tissue. Child: <12years; Young adult: <30 years following IAB protocol.

25% of CPXV individuals [37]. For the present study, skull fragments, corresponding to 10 individuals, were obtained from the IAB, based on the selection criteria of the study and following the procedures described above. No evidence of treponematoses was observed in the osteological material available. Bioanthropological data available from this study is in Table 1. Eight individuals were young adults <30 years and 2 subadults <17 years.

2.4. Maintaining DNA Integrity. Rigorous precautions were taken to prevent aDNA degradation and contamination by modern DNA during collection and analysis at PL/LABTRIP where sample preparation, aDNA extraction, PCR, positive PCR controls, and post-PCR procedures including electrophoresis and sequencing were conducted at the Central Laboratory (LABTRIP/IOC/Fiocruz), which is located 500m from PL/LABTRIP [28]. The replication of experiments, including PCR, electrophoresis, and sequencing was temporally separated at the Central Laboratory (LABTRIP/IOC/Fiocruz). Extraction blank controls were processed in parallel with samples, and PCR negative controls were always included. The authenticity criteria consist of the absence of detectable PCR products (pPCR) in the sediment removed from area of the sacrum (archaeological site controls),

extraction blank, and PCR negative controls. PCR positive controls were not present in the Paleogenetic Laboratory.

2.5. Ancient DNA Extraction. Prior to aDNA extraction, samples were decontaminated: the surface of the samples were removed and cleaned with 3% sodium hypochlorite. Subsequently, surfaces were irradiated with 254 nm ultraviolet light from a distance of 15 cm for 15 minutes [29]. After ultraviolet irradiation, bones were ground in an analytical mill using liquid nitrogen. Approximately 200 mg of bone powder was used for DNA extraction with proteinase K digestion as described by Iñiguez et al. [29]. Sediments (200mg) from the area of the sacrum of individuals from both INSC and CPXV, used as site environmental controls, were also submitted to aDNA extraction. For aDNA extraction, one blank control was included every six samples. The DNA IQ™ System (Promega) was used according to the manufacturer's bone extraction protocol with the modification of incubation at 56°C for 2 hours and the addition of 20 µl of 0.2M EDTA and 10 µl of proteinase K (20mg/ml) with gentle agitation. Alternatively, the QIAamp DNA Investigator-Qiagen kit was used according to manufacturer directions, with modifications: instead of the proteinase K solution specified by the kit, 30 µl of proteinase K (Invitrogen) at 20 mg/ml was used; the incubation with TAE time was increased to 10 minutes at room temperature; and final centrifugation was at 17,000 x g for 2 minutes. The concentrations of aDNA were estimated at 260 nm absorbance on a Pico200 spectrophotometer (Picodrop™).

2.6. PCR and Sequencing. Three molecular targets were applied corresponding to the *tpp47*, *polA*, and *tpp15* genes of *T. pallidum* using primers and PCR conditions according to description of each genetic marker [20, 38, 39]. The targets allowed diagnosis of syphilis and ETs but did not discriminate among *Treponema* species and subspecies, with the exception of the *tpp15* target, which discriminates venereal syphilis from ET [20]. PCR was performed in a total volume of 25 µL, using Platinum *Taq* polymerase (Invitrogen, USA) in an Eppendorf Mastercycler® PCR Cyclyer (Eppendorf, Germany). The pPCRs were analyzed by electrophoresis in 1.5-2.0% low-melt agarose gels (Sigma, USA) and visualized under UV light, after staining with GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA). All positive pPCR including those of unexpected length were submitted to nucleotide sequencing. The pPCRs were directly sequenced using BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) in a 3100 Automated DNA Sequencer as recommended by the suppliers. Pairwise/Blast/NCBI and BioEdit v. 7.0.1 software were used for sequence analysis. Target sequences obtained were submitted to GenBank under accession numbers KU892169-70.

3. Results

One individual from INSC (ISNC6A) and one from CPXV (CPXV8A) were PCR positive for the *tpp15* target. The remaining samples and controls, including aDNA extraction

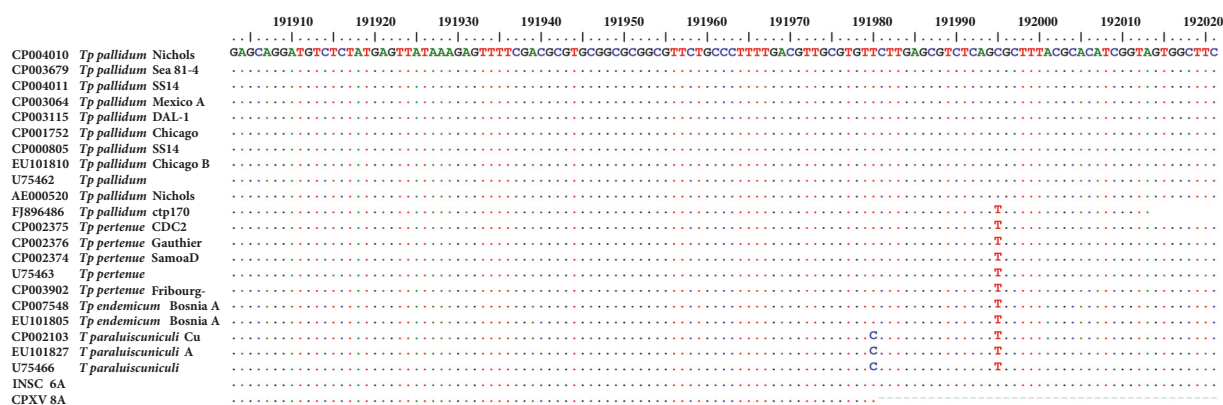


FIGURE 2: Alignment of treponemal *tpp15* target sequences. Treponemal sequences recovered in this study compared to reference sequences available from GenBank.

and PCR blanks and control sediments from the archaeological sites, were negative or presented nonspecific amplification. Nonspecific amplifications were sequenced, but no- or poor-quality sequences were obtained. Sequencing analysis of the individual from INSC when compared with reference sequence *T. p. pallidum* Nichols (Genbank CP004010) revealed the polymorphism T191995C that characterizes *T. p.* subsp. *pallidum* (Figure 2). The INSC individual with possible syphilis infection corresponded to a female up to 18 years old (Table 1). The individual from CPXV showed a short fragment in the *tpp15* conserved region that confirmed *T. pallidum* and excluded *Treponema paraluiscuniculi* (T191980C) but did not allow *T. p.* subsp. *pallidum* discrimination. The CPXV individual probably affected by treponematoses was a female up to 17 years old (Table 1).

4. Discussion

Studies have shown the difficulty in recovering aDNA of *T. pallidum*. However, Kolman et al. [20] and Montiel et al. [21] were successful in using PCR to obtain genetic material of the bacterium using spermidine, a compound that stabilizes cell membranes and DNA structure [40]. Montiel et al. [21] reported that the primary factor in their successful *T. pallidum* aDNA detection was the focus on neonate remains with evidence of CS. According to the authors, the potential for aDNA detection is higher in young individuals, due to the greater number of spirochetes distributed throughout the skeleton. Schuenemann et al. [22] also attributed the potential successfully recovering bacteria aDNA when they focused the study on young individuals. These are the only studies that have been successful in PCR recovering *T. pallidum* genetic material. Bouwman and Brown [31] evaluated the presence of *T. p.* subsp. *pallidum* and *Mycobacterium tuberculosis* aDNA in 46 human bones, some showing evidence of treponematoses and tuberculosis. Analysis of bone samples collected from an English cemetery used from the 9th through the 19th centuries did not reveal *Treponema* sp. aDNA, while *M. tuberculosis* aDNA was obtained. The authors proposed differential aDNA preservation of the pathogens. *Mycobacterium tuberculosis* is the most commonly recovered pathogen in paleogenetic analysis, due to its high load in remodeled bone

as well as the protection against DNA degradation provided by the thick and lipid rich bacterial cell membrane [31]. The lipid poor cell membrane in treponemes leaves the DNA vulnerable to degradation. Barnes and Thomas [41] analyzed *M. tuberculosis* and *T. pallidum* infections in human bones from museum collections dating from the 18th and 20th centuries. The authors concluded that an additional source of negative results in recovery of *T. pallidum* is its weak cell wall. Von Hunnius et al. [42] pointed to the lack of lipopolysaccharides, which are known to act as physical barriers to lysis, in the fragile outer cell membrane of *T. pallidum*. Spilgeman et al. [43] also discussed that the Gram-negative bacterium has high sensibility to temperature changes and easily lyses. In this study, we attributed the success of the aDNA *Treponema* detection to criteria adopted based on epidemiological data and mainly the pathophysiology of the disease.

Besides the age of remains, the type of soil, high temperatures, inadequacy on transportation, and stock conditions of sample after excavation are important factors that act in the aDNA preservation [43–45]. In this study, paleogenetic collection was applied on INSC excavation and samples were protected from the light and transported/preserved in low temperatures [27]. However, CPXV samples were obtained from IAB collection, where they were maintained at room temperature [34]. Both sites are localized in Rio de Janeiro with a tropical climate that interferes in the samples preservation [27, 34, 35, 46]. All these elements could explain negative results in most samples, but noninfected individuals cannot be ruled out.

The hypothesis of an American origin for both yaws and syphilis has been considered in many opportunities [13]. Pre-Columbian data of Brazil from Okumura et al. [47] and Eggers et al. [48] suggest treponematoses in coastal prehistoric groups dating from 2890 ± 55 to 2186 ± 60 BP and 5800–4500 BP, respectively. Filippini [49] observed bone paleopathological evidences suggestive of syphilis and yaws in Brazilian coastal sites 2000–5000 BP. In many prehistoric North American sites, bone lesions confirming yaws and even suggesting venereal and congenital syphilis have been described [50–52] but urban and historical context in the present study must be considered.

In the present work, *Treponema* sp. aDNA sequences were recovered in two young females, and the polymorphism of *T. p.* subspecies *pallidum*, the causative agent of syphilis was observed in the INSC church individual. Positive molecular results are insufficient to confirm clinical and pathological conditions, but in the positive individuals, they strongly suggest active and infective treponematoses. Studies showed similar frequencies of disease in both groups of female and male, but varying according to age, with subadults, male, and adults as the most affected [18].

Yaws and syphilis were endemic in Rio de Janeiro during the colonial period. The former was especially associated with slaves coming from Africa [53]. Syphilis was particularly important in the colonial period and, along with yaws, was mentioned by Sigaud as a disease of Africans [53]. Yaws is expected to have affected many more people than syphilis, since infants and children were infected, while syphilis, acquired through sexual intercourse, affected a different age group. Children with CS rarely survived.

Herein paleogenetic results for treponematoses reported point to possible cases of both diseases, and the epidemiological and the historical context support the findings. Poor sanitary conditions contributed to the risk of treponematoses among African slaves, which predominated among the burials of the CPXV. One individual from CPXV revealed a *Treponema* sp. aDNA sequence that, based on historical and epidemiological records, could be consistent with either yaws or syphilis. As an endemic nonvenereal disease of tropical worldwide distribution, introduced in Brazil by African slaves, yaws is most probable, but syphilis should also be pondered. Since the CPXV archaeological site has a strong African component and African cultural evidence was verified in the INSC site, a high proportion of those individuals suffering from yaws, especially those of African ethnicity, is highly probable. However, it should be considered that there is evidence for all treponemal diseases in the South America since Pre-Columbian times [47, 54, 55].

According to Edler [56], yaws and syphilis were prevalent diseases among Europeans, Native Americans, and Africans in the Brazilian imperial period. The author states that health conditions of African people were deplorable and cites contemporary depictions that illustrate this scenario, including slaves suffering from yaws. Sigaud [53] reported that yaws, to which he refers as “piã,” was spread along the Rio de Janeiro coast in the 18th century, along with other deadly diseases. According to the author, these diseases were an inevitable consequence of the slave trade that established the exchange of lethal diseases between continents.

On the other hand, it is known that syphilis became epidemic during the Brazilian colonial period [57, 58]. Araújo [59] stated that high incidence of syphilis in Brazil, especially in Rio de Janeiro, has been reported by reliable sources since the 18th century. A survey by the government of Rio de Janeiro in 1798 revealed venereal disease as epidemic in the city [37]. In the 1860s, syphilis, tuberculosis, intestinal disorders, and intermittent fevers appeared in the annual reports of health officials of the empire as diseases disproportionately affecting the poorest. According to Araújo [59], high rates of mortality from syphilis have existed since the

18th century. In 1909, Souza [60] speculated that statistics on the incidence of syphilis could be dispensed with, since the rate of those affected was similar to the total population. Other authors have reported high mortality rates from syphilis during the Brazilian historical period [58, 61]. The possible syphilis-positive individual from the Nossa Senhora do Carmo Church site, an important church for the elite of the colonial/empire period, is consistent with historical data. Further investigational PCR assays to distinguish nonvenereal *Treponema* subspecies, using new diagnostic targets and/or methodologies [62] that could be applied in paleogenetic studies, are needed for a more comprehensive panorama of treponematoses in the Brazilian Colonial period. The paucity of molecular studies on *Treponema* spp. has been contrasted by NSG studies. Recent NGS data showed treponemal genomes recovery from asymptomatic bones and PCR negative samples [63]. In addition, NGS analysis of worldwide strains showed two genomic clusters, with the emergence of syphilis strains placed in the 18th century (mean calendar year 1733, 1588-1848) and the present-day epidemic clade, in the second half of 20th century [14]. The first application of NGS for treponematoses diagnosis in archaeological samples was recently demonstrated [22]. NGS technologies open up new possibilities on syphilis paleogenetic studies to better understand the paleoepidemiology of the disease.

This study reports the first aDNA detection of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* that indicates a possible case of syphilis in the Colonial Brazil. Distinct populations were included in the research. Since the INSC constituted mainly Europeans of the ecclesiastical class, and the CPXV included the general population, mainly Africans slaves, it seems that the vulnerability to treponemal infection was not limited to any social or cultural group. We suggest that systematic surveys of skeletal series considering paleoepidemiological modeling could help elucidate the origins and history of treponematoses, including syphilis, in the New World.

5. Conclusions

In this study, *Treponema* sp. aDNA sequences were recovered for the first time in individuals from the Brazilian Colonial period. The paleogenetic results that suggest *Treponema* sp. infection are consistent with historical documents describing venereal syphilis, as well as yaws, as endemic diseases in Rio de Janeiro. The findings in two young females indicated that not only the epidemiological context but also the physiopathology of the disease should be considered in syphilis paleogenetic studies.

Data Availability

The nucleotide sequence data used to support the findings of this study have been deposited in the GenBank repository (KU892169-70).

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

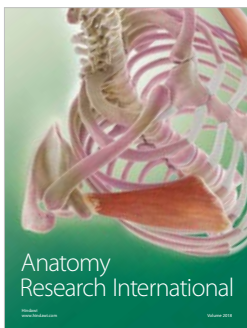
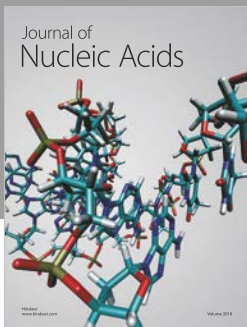
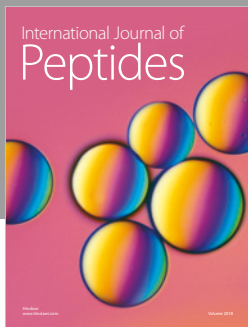
Acknowledgments

We thank Dr. Andersen Liryo for assistance in editing the figures. We are grateful to the genomic sequencing RPT01A (Fiocruz). This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) [Alena Mayo Iñiguez, Grant no. CNE-E-26/202.945/2016], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Alena Mayo Iñiguez, Grant no. 307932/2014-1], Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Alena Mayo Iñiguez, Grant no. 847/15], and Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP) [Lucélia Guedes] [Grant no. 01/2015].

References

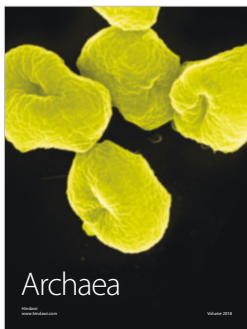
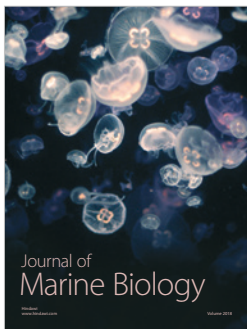
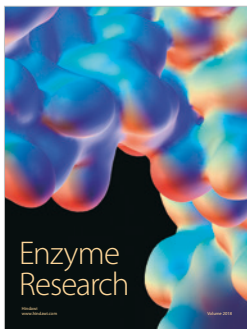
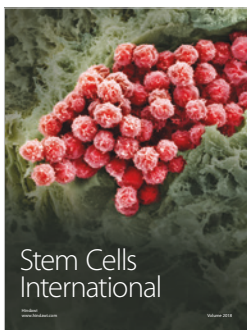
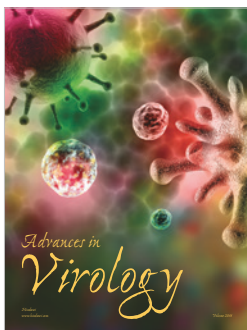
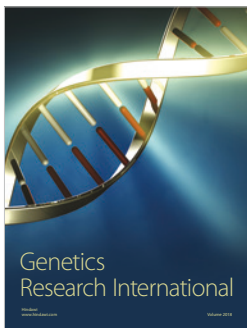
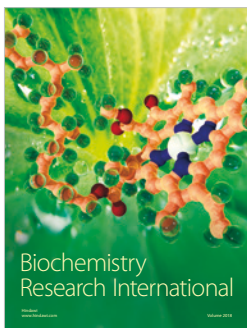
- [1] V. Lee and G. Kinghorn, "Syphilis: an update," *Clinical Medicine*, vol. 8, no. 3, pp. 330-330, 2008.
- [2] C. J. Hackett, "On the origin of the human treponematoses (pinta, yaws, endemic syphilis and venereal syphilis)," *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 29, pp. 7-41, 1963.
- [3] A. W. Crosby, "The Early History of Syphilis: A Reappraisal," *American Anthropologist*, vol. 71, no. 2, pp. 218-227, 1969.
- [4] G. M. Antal, S. A. Lukehart, and A. Z. Meheus, "The endemic treponematoses," *Microbes and Infection*, vol. 4, no. 1, pp. 83-94, 2002.
- [5] A. L. Santos, M. T. Gardner, and P. Allsworth-Jones, "Treponematoses in Pre-Columbian Jamaica: A biocultural approach to the human cranium found in Bull Savannah," *Journal of Archaeological Science*, vol. 40, no. 1, pp. 490-496, 2013.
- [6] E. H. Hudson, "Treponematoses and Mans Social Evolution," *American Anthropologist*, vol. 67, no. 4, pp. 885-901, 1965.
- [7] P. L. Perine, D. R. Hopkins, P. L. A. Niemel et al., *Handbook of Endemic Treponematoses: Yaws, Enemic syphilis, and Pinta*, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1984.
- [8] S. J. Norris, "Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Treponema Pallidum* Polypeptide Research Group," *Microbiological Reviews*, vol. 57, no. 3, pp. 750-779, 1993.
- [9] B. M. Rothschild, "History of syphilis," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 40, no. 10, pp. 1454-1463, 2005.
- [10] B. Rothschild, "Infectious Processes around the dawn of Civilization. , Emerging pathogens?: the archaeology, ecology, and evolution of infectious disease," in *Emerging pathogens: the archaeology*, pp. 103-116, Oxford University Press, Oxford, UK, 2003.
- [11] T. B. Turner and D. H. Hollander, *Monograph Series. World Health Organization*, Monogr. Ser. World Health Organ no 35, 1957.
- [12] D. Čejková, M. Zbaníková, L. Chen et al., "Whole genome sequences of three *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* strains: Yaws and syphilis treponemes differ in less than 0.2% of the genome sequence," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, no. 1, 2012.
- [13] F. L. de Melo, J. C. de Mello, A. M. Fraga, K. Nunes, S. Eggers, and S. Lukehart, "Syphilis at the Crossroad of Phylogenetics and Paleopathology," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 4, no. 1, p. e575, 2010.
- [14] N. Arora, V. J. Schuenemann, G. Jäger et al., "Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster," *Nature Microbiology*, vol. 2, no. 1, Article ID 16245, 2017.
- [15] J. W. Wood, G. R. Milner, H. C. Harpending et al., "The Osteological Paradox: Problems of Inferring Prehistoric Health from Skeletal Samples [and Comments and Reply]," *Current Anthropology*, vol. 33, no. 4, pp. 343-370, 1992.
- [16] D. Ortner, "Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains," in *Infectious Diseases: Treponematoses and Other Bacterial Infectious Diseases*, pp. 273-323, Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 2003.
- [17] B. M. Rothschild and C. Rothschild, "Treponemal Disease in the New World," *Current Anthropology*, vol. 37, no. 3, pp. 555-561, 1996.
- [18] D. Walker, N. Powers, B. Connell, and R. Redfern, "Evidence of skeletal treponematoses from the medieval burial ground of St. Mary Spital, London, and implications for the origins of the disease in Europe," *American Journal of Physical Anthropology*, vol. 156, no. 1, pp. 90-101, 2016.
- [19] A. C. Aufderheide and C. Rodríguez-Martín, *The Cambridge encyclopedia of human paleopathology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2011.
- [20] C. J. Kolman, A. Centurion-Lara, S. A. Lukehart, D. W. Owsley, and N. C. Tuross, "Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen," *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 180, no. 6, pp. 2060-2063, 1999.
- [21] R. Montiel, E. Solórzano, N. Díaz et al., "Neonate human remains: A window of opportunity to the molecular study of ancient syphilis," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, 2012.
- [22] V. J. Schuenemann, A. Kumar Lankapalli, R. Barquera et al., "Historic *Treponema pallidum* genomes from Colonial Mexico retrieved from archaeological remains," *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 12, no. 6, p. e0006447, 2018.
- [23] E. Anastasiou and P. D. Mitchell, "Palaeopathology and genes: investigating the genetics of infectious diseases in excavated human skeletal remains and mummies from past populations," *Gene*, vol. 528, no. 1, pp. 33-40, 2013.
- [24] C. Tipple, M. O. F. Hanna, S. Hill et al., "Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection," *Sexually Transmitted Infections*, vol. 87, no. 6, pp. 479-485, 2011.
- [25] O. Dias, *Arqueologia, Igreja de Nossa Senhora do Carmo da Antiga Sé: História e Restauração*, 2008.
- [26] C. Rodrigues, "Lugares dos mortos na cidade dos vivos: tradições e transformações fúnebres no Rio de Janeiro," in *Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, Secretaria Municipal de Cultura, Departamento Geral de Documentação e Informação Cultural*, Rio de Janeiro, Brazil, 1997.
- [27] L. H. Jaeger, D. Leles, V. D. S. Lima, L. D. P. D. Silva, O. Dias, and A. M. Iñiguez, "Mycobacterium tuberculosis complex detection in human remains: Tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil," *Infection, Genetics and Evolution*, vol. 12, no. 4, pp. 642-648, 2012.
- [28] A. M. Iñiguez, "Paleoparasitologia Molecular e Paleogenética para o Estudo de Doenças Infecto-Parasitárias do Passado: Princípios, Metodologia e Agravos," in *Avances Recientes de la Bioarqueología Latinoamericana*, L. Luna, C. Aranda, and J. Suby, Eds., pp. 285-319, GIB, 2014.
- [29] A. M. Iñiguez, K. Reinhard, M. L. Carvalho Gonçalves, L. F. Ferreira, A. Araújo, and A. C. Paulo Vicente, "SLI RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites," *International Journal for Parasitology*, vol. 36, no. 13, pp. 1419-1425, 2006.
- [30] A. M. Iñiguez, A. Araújo, L. F. Ferreira, and A. C. P. Vicente, "Analysis of Ancient DNA from Coprolites: A Perspective

- with Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction Approach,” *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 98, no. 1, pp. 63–65, 2003.
- [31] A. S. Bouwman and T. A. Brown, “The limits of biomolecular palaeopathology: Ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis,” *Journal of Archaeological Science*, vol. 32, no. 5, pp. 703–713, 2005.
- [32] “The myth of syphilis: the natural history of treponematoses in North America,” in *Treponematoses: Inquiries into The Nature of a Protean Disease*, pp. 9–62, University Press of Florida, Gainesville, Fla, USA, 2005.
- [33] H. Oota, N. Saitou, T. Matsushita, and S. Ueda, “A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences,” *American Journal of Physical Anthropology*, vol. 98, no. 2, pp. 133–145, 1995.
- [34] L. H. Jaeger, V. Taglioretti, M. H. Fugassa, O. Dias, J. Neto, and A. M. Iñiguez, “Paleoparasitological results from XVIII century human remains from Rio de Janeiro, Brazil,” *Acta Tropica*, vol. 125, no. 3, pp. 282–286, 2013.
- [35] L. H. Jaeger and A. M. Iñiguez, “Molecular Paleoparasitological Hybridization approach as effective tool for diagnosing human intestinal parasites from scarce archaeological remains,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 8, 2014.
- [36] A. Liryo, S. M. Souza, and D. C. Cook, “Dentes intencionalmente modificados e etnicidade em cemitérios do Brasil Colônia e Império,” *Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia*, no. 21, p. 315, 2011.
- [37] L. H. Jaeger, S. M. F. M. de Souza, O. F. Dias, and A. M. Iñiguez, “Mycobacterium tuberculosis complex in remains of 18th-19th century Slaves, Brazil,” *Emerging Infectious Diseases*, vol. 19, no. 5, pp. 837–839, 2013.
- [38] W. Behrhof, E. Springer, W. Bräuninger, C. J. Kirkpatrick, and A. Weber, “PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin-embedded skin biopsy specimens: Test design and impact on the diagnosis of syphilis,” *Journal of Clinical Pathology*, vol. 61, no. 3, pp. 390–395, 2008.
- [39] L. Wenhai, Z. Jianzhong, and Y. Cao, “Detection of *Treponema pallidum* in skin lesions of secondary syphilis and characterization of the inflammatory infiltrate,” *Dermatology*, vol. 208, no. 2, pp. 94–97, 2004.
- [40] M. R. Green and J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2008.
- [41] I. Barnes and M. G. Thomas, “Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in museum osteological collections,” *Proceedings of the Royal Society B Biological Science*, vol. 273, no. 1587, pp. 645–653, 2006.
- [42] T. E. von Hunnius, D. Yang, B. Eng, J. S. Wayne, and S. R. Saunders, “Digging deeper into the limits of ancient DNA research on syphilis,” *Journal of Archaeological Science*, vol. 34, no. 12, pp. 2091–2100, 2007.
- [43] M. Spilgeman, D. Shin, and G. Bar Gal, “The promise, the problems and the future of DNA analysis in paleopathology studies,” in *A companion to paleopathology*, Wiley Blackwell, 2016.
- [44] S. Pääbo, H. Poinar, D. Serre et al., “Genetic analyses from ancient DNA,” *Annual Review of Genetics*, vol. 38, pp. 645–679, 2004.
- [45] M. Höss, P. Jaruga, T. H. Zastawny, M. Dizdaroglu, and S. Pääbo, “DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues,” *Nucleic Acids Research*, vol. 24, no. 7, pp. 1304–1307, 1996.
- [46] L. H. Jaeger, V. Taglioretti, O. Dias, and A. M. Iñiguez, “Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th-19th century in Rio de Janeiro, Brazil,” *International Journal of Paleopathology*, vol. 3, no. 3, pp. 214–217, 2013.
- [47] M. M. M. Okumura and S. Eggers, “The people of Jabuticabeira II: Reconstruction of the way of life in a Brazilian shellmound,” *HOMO—Journal of Comparative Human Biology*, vol. 55, no. 3, pp. 263–281, 2005.
- [48] S. Eggers, C. C. Petronilho, K. Brandt, C. Jericó-Daminello, J. Filippini, and K. J. Reinhard, “How does a riverine setting affect the lifestyle of shellmound builders in Brazil?” *HOMO—Journal of Comparative Human Biology*, vol. 59, no. 6, pp. 405–427, 2008.
- [49] J. Filippini, “Treponematoses e outras paleopatologias em sítios arqueológicos pré-históricos do litoral sul e sudeste do Brasil,” 2012.
- [50] A. Stodder, “Treponemal Infection in the Prehistoric Southwest,” in *The myth of syphilis*, pp. 227–278, University Press of Florida, Gainesville, Florida, 2005.
- [51] D. Weaver, M. Sandford, G. Bogdan, G. Kissling, and M. Powell, “Prehistoric Treponematoses on the North Carolina Coast,” in *The myth of syphilis*, pp. 77–91, University Press of Florida, Gainesville, Florida, 2005.
- [52] D. Hutchinson, C. Larsen, M. Williamson, V. Green-Clow, and M. Powell, “Temporal and Spatial Variation in the Patterns of Treponematoses in Georgia and Florida,” in *The myth of syphilis*, pp. 92–116, University Press of Florida, Gainesville, Florida, 2005.
- [53] J. F. X. Sigaud, *Do clima e das doenças do Brasil: ou estatística médica deste império*, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2009.
- [54] M. Y. El-Najjar, “Human treponematoses and tuberculosis: Evidence from the New World,” *American Journal of Physical Anthropology*, vol. 51, no. 4, pp. 599–618, 1979.
- [55] J. Mansilla, B. M. Rothschild, C. Pijoa, and C. Rothschild, “Transitions among treponematoses in ancient Mexico,” *Chungará (Arica)*, vol. 32, no. 2, pp. 167–174, 2000.
- [56] F. L. Edler, “O saber médico e o poder profissional: do contexto brasileiro ao Brasil imperial,” in *Na corda bamba de sombrinha: a saúde no fio da história*, pp. 23–46, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 2010.
- [57] S. Carrara, “The symbolic geopolitics of syphilis: an essay in historical anthropology,” *História, ciências, saúde—Manguinhos*, vol. 3, no. 3, pp. 391–408, 1996.
- [58] S. Carrara, *Tributo a Vênus: a luta contra a sífilis no Brasil, da passagem do século aos anos 40*, Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, 1996.
- [59] O. S. Araújo, *Alguns comentários sobre a syphilis no Rio de Janeiro*, Empresa Gráfica Editora Paulo Pongetti & Cia, Rio de Janeiro, Brazil, 1928.
- [60] C. Souza, *Da responsabilidade civil e criminal do sifilítico: publicação da Liga Paulista de Prophylaxia Moral e Sanitária*, Typ. Hennes Irmãos, São Paulo, Brazil, 1909.
- [61] A. de Gonçalves, *Expostos à misericórdia: um estudo sobre o abandono de crianças no Rio de Janeiro (século XVIII e XIX)* [Masters, thesis], 1990.
- [62] O. Mitjà, D. Šmajš, and Q. Bassat, “Advances in the Diagnosis of Endemic Treponematoses: Yaws, Bejel, and Pinta,” *PLOS Neglected Tropical Diseases*, vol. 7, no. 10, 2013.
- [63] J. F. Gogarten, A. Düx, V. J. Schuenemann et al., “Tools for opening new chapters in the book of *Treponema pallidum* evolutionary history,” *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 22, no. 11, pp. 916–921, 2016.



Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com



1 **African helminth infections out of Africa: Paleoparasitological and**
2 **paleogenetic investigations in *Pretos Novos* cemetery, Rio de Janeiro,**
3 **Brazil (1769-1830)**

4

5 Lucélia Guedes^{1*}, Victor Hugo Borba^{1*}, Morgana Camacho¹, Jandira Neto²,
6 Ondemar Dias², Alena Mayo Iñiguez¹

7

8 ¹LABTRIP, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz
9 (LABTRIP/IOC/FIOCRUZ). Avenida Brasil, 4365, Pavilhão Rocha Lima,
10 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil. CEP: 21045-900.

11

12 ²Instituto de Arqueologia Brasileira (IAB). Estr. Cruz Vermelha, 45 – Vila Santa
13 Teresa, Belford Roxo, Rio de Janeiro, Brazil. CEP: 26193-415

14

15 *These authors contributed equally to this work

16

17 Corresponding author: alenainiguez@gmail.com.br; alena@ioc.fiocruz.br

18 E-mail addresses of each author: lucelia.fiocruz@gmail.com;

19 borba.vh@gmail.com; morganacamacho88@gmail.com;

20 jandiranetodias@terra.com.br; alena@ioc.fiocruz.br

21 ABSTRACT

22 *Pretos Novos* cemetery (PNC), Rio de Janeiro, Brazil (1769-1830), was created
23 exclusively to bury enslaved Africans who had died when arrived to the city or
24 before to be sold in the slave market. Since the bodies were dismembered,
25 placed in mass graves and burned, most of human remains collected from the
26 site were highly fragmented and showed intense degradation. PNC site is
27 possibly, the unique in America that allow the study of African parasitic infections
28 out of Africa. In this study we aimed to identify which parasites affected PNC
29 individuals through paleoparasitological and paleogenetic analyses. Sacrum and
30 pelvic sediments were collected from PNC individuals (n=5), in addition to control
31 samples (n=7). Samples were submitted to 3 parasitological techniques,
32 spontaneous sedimentation, modified sucrose centrifugal-flotation and zinc
33 sulphate centrifugal-flotation. In the paleogenetic analysis 4 molecular targets,
34 18S rDNA, *cytb*, *nad1* and *cox1* were used for helminth identification. *Ascaris* sp.
35 and *Trichuris trichiura* were identified by spontaneous sedimentation in 2 PNC
36 individuals and *Ascaris* sp. *cytb* sequence was retrieved in another PNC
37 individual. Environmental controls also demonstrated an ascarid, unidentified
38 egg, and free-living larvae. We highlight that even with the intense degradation
39 of PNC human remains, and the process of curation of samples after excavation,
40 it was possible to recover eggs and aDNA of helminths. In this regard, the
41 helminth infection in 3/5 PNC individuals should be interpreted as
42 underestimated, as well as, the parasitic load observed. Considering the origin
43 PNC individuals, it is possible to state that these infections were brought to Brazil
44 from Africa during the colonial times.

45 **Keywords:** *Ascaris* sp., *Trichuris trichiura*, *cytb*, colonial period, taphonomy

46 1. INTRODUCTION

47 *Pretos Novos* (New Blacks) cemetery (PNC) was created in 1769 as a
48 demand to transfer the slave market which was previously located at Praça XV,
49 next to the Royal Palace, to the wharf Valongo, port area of Rio de Janeiro. PNC
50 was used as a place to bury African slaves that died as soon as they arrived in
51 the city, were put in quarantine outside the port, or were awaiting to be sold in the
52 slave market (Machado, 2006). Although PNC was administered by the church,
53 the slaves were buried without religious rituals. The bodies were accumulated for
54 days, burned and disposed without coffins, one body above the other (Machado,
55 2006). In order to facilitate the burial of a great number of individuals, their bodies
56 were also dismembered (Pereira, 2007). Despite the longtime of function, for sixty
57 years, the administration of the cemetery had obituaries only from 1824 to 1830.
58 The obituaries demonstrated that in this period 6,119 African slaves were buried
59 at PNC. Individuals from all ages and gender were buried, but the majority was
60 characterized for being young male adults (Pereira, 2007)

61 The analysis of strontium conducted by Bastos et al. (2010) revealed that
62 PNC individuals were brought from different African areas, and that they lived
63 away from coast, since maritime resources were not identified. Matrilineal
64 ancestry was also identified in three individuals as belonging to haplotypes L3e2,
65 L3d1, and L1c2 (Jaeger et al., 2013a). These 3 haplotypes correspond to main
66 African areas and ports where captives were shipped. This data reaffirmed the
67 diversity of the geographic origin of PNC individuals.

68 Since their capture until the arrival in Rio de Janeiro port, the slaves were
69 maintained in unhealthy conditions in small crowded places, that probably
70 facilitated the transmission of infectious diseases, and contributed to poor health

71 status (Pereira, 2007). Previous paleoparasitological study of Praça XV
72 archaeological site (PXV), a cemetery (18th century) with an important number
73 of African slaves buried, revealed that 8/10 individuals were infected with
74 intestinal helminths and/or protozoa (Jaeger et al., 2013b). A paleogenetic study
75 in the same site demonstrated infections with *Trichuris trichiura* and *Ascaris* sp.
76 in 40% of the individuals and *Enterobius vermicularis* in 50% (Jaeger and Iñiguez,
77 2014). The first paleogenetic investigation in PNC site revealed positive
78 tuberculosis infection in 4/16 individuals by *Mycobacterium tuberculosis* complex
79 (MTBC) ancient DNA (aDNA) detection, using bones as source of research
80 (Jaeger et al., 2013a). The results demonstrated the circulation of MTBC in Africa
81 during the Colonial times, which was a controversial subject.

82 The present study aimed to recover paleoparasitological evidence of intestinal
83 infection in PNC individuals. Since PNC is possibly the only cemetery composed
84 of newly arrived African slaves in America, the study provided the opportunity to
85 research past infections and contribute to the knowledge of the health status of
86 this specific group.

87

88 2. MATERIALS AND METHODS

89 Sediment samples from PNC individuals (n=5), in addition to control
90 samples (n=7) were analyzed. Samples used in this work were obtained collected
91 from the Brazilian Archaeological Institute (*Instituto de Arqueologia Brasileira*-
92 IAB) and maintained in the Paleogenetic Laboratory (PL) of LABTRIP
93 (IOC/FIOCRUZ) under the responsibility of Dr. Alena Mayo Iñiguez. The samples
94 were submitted to curation processes by archaeologists at IAB, practice that

95 involved washing and scraping of the material. However, no chemicals were
96 added.

97 During the archaeological campaign, due to a high degree of
98 disaggregation of the anatomic parts of the bodies, series of types of bones,
99 skulls and long bones, for example, were collected and stored at room
100 temperature in the IAB museum collection. Teeth with intentional modifications,
101 characteristics of Africans people (Lyrio et al., 2011), beads (Fig. 1A) and
102 smoking pipe (Fig. 1A) were also found (Iñiguez 2014). Four sacra and one ilium
103 corresponding to 5 individuals were the only PNC human remains available for
104 intestinal parasite investigation. Sediments from sacral foramens and from an
105 ilium crest were collected for this study. Additionally, sediments associated to
106 unspecific infection site or bones, as skulls, were used as environmental or
107 archaeological site controls (Table 1). Samples (n=12) were collected following
108 the paleogenetic collection protocol (Iñiguez, 2014), protected from light,
109 preserved and transported on ice to the PL laboratory.

110 In order to increase the chances of finding parasite remains in PNC
111 samples, three parasitological techniques were performed: spontaneous
112 sedimentation (Lutz, 1919), modified sucrose centrifugal-flotation (specific
113 gravity-sg=1300) (Hubber et al., 2003) and zinc sulphate centrifugal-flotation at
114 33% (sg=1180) (Faust et al., 1939). Samples were rehydrated with 0.5%
115 trisodium phosphate (Na_3PO_4) aqueous solution (Callen and Cameron, 1960)
116 during 24h and then submitted to the spontaneous sedimentation technique
117 (Lutz, 1919). Two-hundred microliters of each sample were used to prepare
118 slides that were analyzed in the light microscope Nikon Eclipse E200 at 100x
119 magnification. Photographs were obtained at 400x magnification. Aliquots of 1mL



120

121 **Fig. 1.** Cultural artifacts found during the archaeological campaign of *Pretos*
122 *Novos* cemetery, Rio de Janeiro, Brazil. (A) African beads; (B): Fragment of an
123 smoking pipe. Source: Iñiguez, AM-IAB collection.

124

125 of sediment obtained by the spontaneous sedimentation were used to perform
126 each centrifugal flotation technique. One slide from each sample was prepared
127 and analyzed in the same conditions described above.

128

129 Considering the several taphonomic issues involving the cemetery and
130 precautions to avoid contamination with modern DNA, methodological efforts
involving the collection of the material, storage, transport to the laboratory, and

131 use of parasitological techniques were an especial concern (Iñiguez, 2014). The
132 paleogenetic analysis was conducted at the Paleogenetic Laboratory (PL)
133 (LABTRIP/IOC/FIOCRUZ, Brazil) using standard procedures to avoid aDNA
134 contamination, degradation and cross-contamination as described in some
135 studies (Iñiguez, 2011; Iñiguez et al., 2006; Iñiguez AM, 2014). Two-hundred
136 microliters of each rehydrated sediment were used for aDNA extraction with
137 previous freezing with liquid nitrogen. QIAamp® DNA Investigator Kit (QIAGEN)
138 was used according to the instructions of the manufacturer, with modifications,
139 including a pretreatment step of proteinase K digestion (Invitrogen) 20mg/ml with
140 ATL buffer at 56°C during 72h (Jaeger et al., 2013a). The concentrations were
141 estimated at 260nm absorbance in a spectrophotometer NanoDrop (ND-1000).
142 Whole Genome Amplification (WGA) Repli-g (Qiagen) was applied at samples to
143 increase the concentration of aDNA. The Polymerase Chain Reaction (PCR) was
144 applied using four molecular targets for *Ascaris* sp. diagnosis: 18S ribosomal
145 DNA (18S rDNA) and cytochrome b (*cytb*) (Loreille et al., 2001), NADH
146 dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) and cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*)
147 (Botella et al., 2010). The 18S rDNA PCR modifications were in 25µl of reaction
148 volume with 2.5mM of MgCl₂, 200ng of each primer, 2.5 units Platinum™ Taq
149 DNA Polymerase (Invitrogen). The PCR thermal conditions were, one denaturing
150 step at 94°C for 2 minutes, followed by 50 cycles of denaturation at 94°C for 30
151 seconds, annealing at 44°C for 30 seconds, elongation at 72°C for 30 seconds
152 and extension at 72°C for 5 minutes. Extraction blank and PCR negative controls
153 were included. Positive PCR controls were not included. For the *cytb* target was
154 followed the same conditions described above, with exception of annealing at
155 52°C. For the *nad1* target, 25pmol of each primer were used and the PCR thermal

156 conditions consisted of an initial denaturation cycle at 94°C for 5 minutes, 50
157 cycles of denaturation at 94°C for 40 seconds, annealing at 45°C for 40 seconds,
158 elongation at 72°C for 50 seconds and extension at 72°C for 7 minutes. For *cox1*
159 target, 100ng of each primer were used and the PCR thermal conditions
160 consisted of one denaturation cycle at 96°C for 5 minutes, followed by 40 cycles
161 of denaturation at 96°C for 40 seconds, annealing at 45°C for 50 seconds,
162 elongation at 72°C for 50 seconds and extension at 72°C for 5 minutes. To detect
163 *T. trichiura* infection the 18S rDNA molecular target was used (Oh et al, 2010).
164 PCR products were visualized by 3% low melting agarose gel electrophoresis
165 stained with Gel-Red (Biotium). The sequencing reaction was performed using
166 Kit Big Dye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems) in the sequencing platform
167 RPT01A/IOC-Fiocruz (Applied Biosystems ABI 3730 sequencer). The sequence
168 analysis was performed using Lasergene Seqman v. 7.0.0 (DNASTAR, Madison,
169 Wisconsin) and Bio Edit v. 7.0.4 (Department of Microbiology, North Carolina
170 State University, Raleigh, North Carolina). BLAST searches were performed at
171 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) to identify the obtained aDNA
172 sequences until 02/2019.

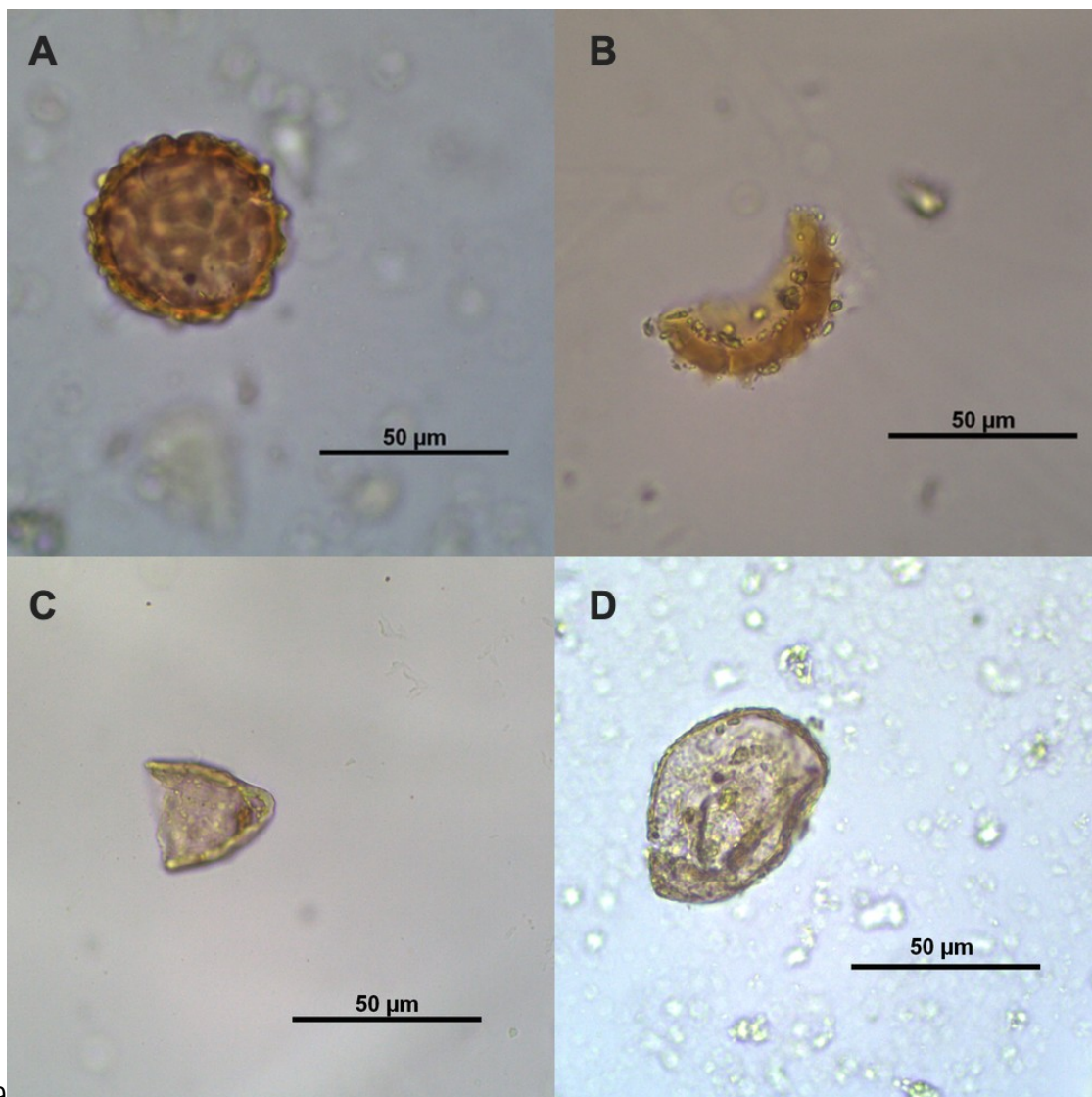
173

174 3. RESULTS

175 The paleoparasitological and paleogenetic assays revealed the intestinal
176 infection in 4/5 PNC individuals. *Ascaris* sp., *T. trichiura* and unidentified egg and
177 larvae were found through paleoparasitological analyses (Fig. 2; Table 1). Two
178 individuals were positive for each *Ascaris* sp. and *T. trichiura* infection. A fragment
179 of a *T. trichiura* egg was recovered from sample PNC06 (Fig. 2C) and an *Ascaris*
180 sp. eggshell was identified in sample PNC11 (Fig. 2B). In environmental controls,

181 one unidentified egg was recovered from sample PNC02 (Fig. 2D). And in sample
182 PNC03 was found an *Ascaris* sp. egg, whose dimensions were smaller than
183 usually observed in the specie, with 52,49 x 53,00 μm (Fig. 2A) (O’Lorcain and
184 Holland, 2000; Quilès et al., 2006). Mites, monolete pollen grains, fungi spores
185 and free-living larvae were also found (Table 1). The analysis performed by using
186 the centrifugal-flotation in sucrose solution was negative and the centrifugal-
187 flotation in zinc sulphate solution yielded a fungi spore in PNC10 sample.

188



189

190 **Fig. 2.** Results of paleoparasitological analyses from *Pretos Novos* cemetery
 191 individuals. (A) *Ascaris* sp. egg from PNC03; (B): *Ascaris* sp. eggshell from
 192 PNC11; (C): Fragment of a *T. trichiura* egg from PNC06; (D): Unidentified
 193 egg from sample PNC02.

194

195 **Table 1:** *Pretos Novos* cemetery individuals analyzed in this study and
 196 paleoparasitological and paleogenetic results

ID	IAB ID	Sample Type	Sex	Age (years)	Paleoparasitological results**	Paleogenetic results***
PNC01	B2: B1 sector	Environmental sediment	NA	NA	Mite	Negative
PNC02	B3	Environmental sediment	NA	NA	Monolet	Negative
PNC03	B3	Humerus sediment	-	-	<i>Ascaris</i> sp.	Negative
PNC04	B3	Skull sediment	-	-	Negative	Negative
PNC05	B3	Sacrum sediment	-	-	Negative	<i>Ascaris</i> sp. <i>cytb</i>
PNC06	B3: B1 sector	Sacrum sediment	UD	Child (<2)	Fragmented <i>Trichuris trichiura</i> egg	Negative
PNC07	B4: PN44	Skull sediment	M	Adult (>30)	Fungi spores / Free-living larvae	Negative
PNC08	B4:PN38	Skull sediment	UD	Young Adult (<20)	Negative	Negative
PNC09	B4:PN36	Skull sediment	UD	UD	Palynomorph	Negative
PNC10	B6*: B1/2 sector PN26	Ilium sediment	F	Adult (>20)	Palynomorph/Fungi spores	Negative

PNC11	B7	Sacrum sediment	-	-	Fragmented <i>Ascaris</i> sp. eggshell	Negative
PNC12	B8	Sacrum sediment	-	-	Negative	Negative

197 ID: Paleogenetic Laboratory identification; IAB ID: *Instituto de Arqueologia*
198 *Brasileira* identification; NA: not applicable; -: information not available; M: male;
199 F: female; UD: parameter undetermined; *burned bones; **results obtained by

200 spontaneous sedimentation technique, except fungi spore finding in sample
 201 PNC10 by zinc sulphate centrifugal flotation technique. ****Ascaris* sp. and *T.*
 202 *trichiura* molecular paleoparasitological diagnosis.

203 Of four molecular targets applied in the paleogenetic analysis of *Ascaris*
 204 sp., the infection was confirmed by *cytb* aDNA sequence in one individual
 205 (PNC05). The analysis revealed 100% of sequence identity with *A. lumbricoides*
 206 (GenBank EF439709) and 99-92.96% with *A. lumbricoides*, *A. suum* and *Ascaris*
 207 sp. sequences in 100-84% of query cover. The *cytb* alignment using *A.*
 208 *lumbricoides* (GenBank EF439709) as reference, revealed the polymorphism
 209 C11034T in PNC05 sequence from this study, also present in the reference
 210 sequence, but absent in others *A. lumbricoides* strains (Fig. 3). Polymorphisms
 211 at positions 11011, 11016, 11031, 11073 and 11128 are as well not species-
 212 specific, shared by *A. lumbricoides*, *A. suum* and *Ascaris* sp. sequences (Fig. 3).
 213 Negative controls as well as sediment controls showed absence of PCR
 214 amplification. We did not obtain positive *T. trichiura* amplifications.

215

	11010	11020	11030	11040	11050	11060	11070	11080	11090	11100	11110	11120	11130	11140
HQ704901 <i>A. suum</i>	G	T	T	A	G	G	T	T	A	C	C	G	T	C
PNC05	G	T	T	A	G	G	T	T	A	C	C	G	T	C
KY045800 <i>A. suum</i>
X54253 <i>A. suum</i>
KY045804 <i>A. suum</i>
KY045805 <i>A. suum</i>
EF439709 <i>A. lumbricoides</i>
KY045802 <i>A. lumbricoides</i>
HQ704900 <i>A. lumbricoides</i>
EF439710 <i>A. lumbricoides</i>
EF439712 <i>A. lumbricoides</i>
EF439713 <i>A. lumbricoides</i>
EF439711 <i>A. lumbricoides</i>
JN801161 <i>A. lumbricoides</i>
KY368760 <i>A. lumbricoides</i>
KY368764 <i>A. lumbricoides</i>
KY368763 <i>A. lumbricoides</i>
KY368762 <i>A. lumbricoides</i>
KY368761 <i>A. lumbricoides</i>
KY368759 <i>A. lumbricoides</i>
KY368758 <i>A. lumbricoides</i>
KY368757 <i>A. lumbricoides</i>
KY368756 <i>A. lumbricoides</i>
KY368755 <i>A. lumbricoides</i>
KY368754 <i>A. lumbricoides</i>
KY045803 <i>A. lumbricoides</i>
AP017677 <i>A. lumbricoides</i>
EF150651 <i>A. lumbricoides</i>
GU339224 <i>Ascaris</i> sp.
MH059535 <i>Ascaris</i> sp.
KC839987 <i>Ascaris</i> sp. gibbon
KC839986 <i>Ascaris</i> sp. chimpanzee

216

217 **Fig. 3:** Nucleotide alignment of *cytb* gene fragment of PNC05 sample and *A.*
218 *lumbricoides*, *A. suum* and *Ascaris* sp. sequences from GenBank using *A. suum*
219 complete genome (accession number HQ704901) as reference sequence.

220

221 4. DISCUSSION

222 Paleoparasitological analyses in PNC represented a taphonomic
223 challenge, since many factors influenced on the preservation of parasitological
224 remains. The site is located next to the sea and above sandy soil, which could
225 influence on water percolation and consequently the displacement of the eggs
226 through the archaeological layers. The hot and humid weather of Rio de Janeiro,
227 in addition to the burial conditions, possibly permitted a poorly preservation of the
228 organic material. One of the characteristics of PNC cemetery is the burning and
229 dismembering of the bodies. The burn was likely the most influent taphonomic
230 problem that interfered in the preservation of parasite eggs. Mites, fungi spores
231 and free-living larvae probably also affect the preservation of the parasite
232 vestiges. Predation by the soil biota could contribute to parasite degradation
233 (Leles, 2010; Morrow et al., 2016).

234 The parasite eggs identified were fragmented, aspect that was not
235 observed in other colonial sites from the same region (Jaeger et al., 2013b,
236 2013c). Because of the very specific morphologies of *Ascaris* sp. and *T. trichiura*
237 eggs, the parasites can be undoubtedly identified using eggshell fragments.

238 Despite the taphonomic problems that hampered the preservation of the
239 fecal material, the study showed that it is possible to recover parasite eggs. The
240 frequency of positive individuals as well as the number of eggs found possibly do
241 not represent the real parasitic load of PNC people, and should be considered as

242 underestimated. Previous paleoparasitological and paleogenetic studies in
243 individuals, mostly slaves, from the PXV archaeological site, which belong to the
244 same historic period and port area in Rio de Janeiro city, showed higher
245 frequency and diversity of intestinal parasite infection (Jaeger et al., 2013b;
246 Jaeger and Iñiguez, 2014). Nevertheless, since PXV remains were submitted to
247 a curating procedure, by cleaning of bones, the parasitological data should be
248 considered an underestimation of infection, health and sanitation. In the present
249 study, in addition to the helminthiases identified as one of the health problems of
250 PNC individuals, it is also possible to state the African origin of helminth infection.

251 Usually in paleoparasitological analyses, positive results in control
252 samples of archaeological sites indicate that parasite findings from individuals
253 should be excluded as evidence of true human infection. However, the particular
254 proceedings conducted in PNC burials, in which the bodies were dismembered,
255 piled and buried unorganized, allowed a different interpretation. The presence of
256 an ascarid egg in a control sediment, could be a source of information of infection
257 in the African slaves that were buried in this site.

258 *Ascaris* sp. and *T. trichiura* infect their hosts by fecal-oral transmission,
259 and despite the elimination of thousands of eggs, 200.000 eggs/day and 3.000-
260 10.000 eggs/day respectively, no infection can occur without a development in
261 ideal conditions of light, temperature and humidity in the soil. Therefore, the
262 infection could not be acquired during the traffic transportation, but in African
263 lands, as the conditions for the maturation of eggs was not ideal. Besides that,
264 the traffic duration of 60 days from Angola to Rio de Janeiro would not be enough
265 to a recent infected person starts to eliminate eggs, giving the time of infection

266 and the elimination being around 90 days for *T. trichiura* and 70 days for *Ascaris*
267 sp. (Rey, 2008).

268 Although bone analyses of these individuals showed no pathological
269 lesions and good health (Cook et al., 2015; Lyrio et al., 2011), they were probably
270 not healthy due the insalubrious conditions inside the ships, which can facilitate
271 infections among the slaves, as tuberculosis and smallpox, that was seen in
272 African slaves as mentioned by Sigaud (2009). In fact, tuberculosis in PNC
273 individuals was verified by *Mycobacterium* aDNA (Jaeger et al., 2013a). The
274 infection with intestinal parasites is usually asymptomatic, but it could have
275 influenced, along with the poor nutrition during the long journey to the New World,
276 in the nutrient depletion and precarious health status (Stephenson et al., 2000).

277 Parasitological concentration techniques have the purpose to increase the
278 number of parasites recovered. In this study, from three parasitological
279 techniques used, only the spontaneous sedimentation was effective. Different
280 results were previously obtained when tested the efficiency of these techniques
281 (Jaeger et al., 2013c). The spontaneous sedimentation recovered the greatest
282 number of parasites, but floatation techniques added new data, so the use of
283 concentration techniques with different principles were complementary on the
284 diagnosis of infection in individuals buried on Nossa Senhora do Carmo Church,
285 also from the historical period of Rio de Janeiro.

286 In this study, *Ascaris* sp. infection was also detected by paleogenetic
287 analysis in an individual who was negative by paleoparasitological essay. The
288 result emphasize the integrative use of the molecular and microscopical analyses
289 in the intestinal parasite diagnostic in the past (Iñiguez et al., 2003; 2006; Jaeger
290 and Iñiguez, 2014; Jaeger et al., 2016). Only one individual was positive for

291 *Ascaris* sp. infection with one molecular target. Since the parasite eggs were
292 highly fragmented, we infer that the preservation of aDNA was strongly affected,
293 without the protection inside the eggs, as well as, the mentioned taphonomic
294 process. Considering the gene fragment recovered, the *Ascaris* sp. *cytb*
295 genotype in PNC individual is identical to the one verified by Leles et al., (2008),
296 from probable latrine, garbage deposits or food storage sediment in the Belgium
297 (XVI century). Although the target was excellent in the molecular diagnosis, as
298 pointed by Leles et al., (2009), it is useless in the discrimination between *Ascaris*
299 *lumbricoides* (Linnaeus 1758) and *Ascaris suum* (Goeze 1782), parasites of
300 human and pig (*Sus sacrofa* Linnaeus, 1758), respectively. A number of genetic
301 studies aiming to differentiate between *Ascaris* species have been conducted
302 Anderson et al., (1993). (Anderson, 1995; Iñiguez et al., 2012; Leles et al., 2010,
303 2009; Peng et al., 2003, 1998; Zhu et al., 1999), However, the haplotype data did
304 not allow a discrimination of *Ascaris* species, and isolates are named as “*Ascaris*
305 from human or from pigs” instead the species taxonomic nomenclature. Iñiguez
306 et al. (2012) were categoric showed gene flow and lack of discrimination among
307 human and pigs *Ascaris* haplotypes worldwide. Then, Leles *et al.* (2012)
308 proposed that *Ascaris* species should be considered as the same. However, this
309 is still a controversial subject (Alves et al., 2016; Betson et al., 2014; Betson and
310 Stothard, 2016). Recently, a research with isolates from humans and pigs from
311 China, revealed hybrids of *A. lumbricoides* and *A. suum* mainly in humans (Zhou
312 et al., 2018). The *Ascaris cytb* sequence detected in a PNC individual is identical
313 to a previously reported with uncertain origin, and also showed polymorphisms
314 shared with both parasite species. Nevertheless, based on all aforementioned

315 studies the challenge of *Ascaris* spp. definition seems to be a taxonomic instead
316 a diagnostic issue.

317

318 5. CONCLUSIONS

319 Paleoparasitological and Paleogenetic data were recovered from PNC
320 samples, despite several taphonomic factors that influenced in the preservation
321 of the parasite eggs and aDNA. In spite of the process of burn which damaged
322 some bones, it was possible to recover *Ascaris* sp. and *T. trichiura* egg and
323 fragments, both important intestinal parasites in human population. The *cytb*
324 target applied was able of detect *Ascaris* sp. in negative PNC individual by
325 paleoparasitological analysis, corroborating the importance of the integration of
326 microscopical and genetic diagnosis essays. Even with a probable
327 underestimation of the infection, it possible to affirm the African origin of
328 helminthiasis. We report, for the first time, a parasite aDNA sequence from
329 human remains of Rio de Janeiro, Brazil colonial time.

330

331 ACKNOWLEDGEMENTS

332 This study was supported by fellowships from the Conselho Nacional de
333 Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (AMI, grant number
334 307932/2014-1 and 312934/2017-3); Coordenação de Aperfeiçoamento de
335 Pessoal de Nível Superior CAPES (AMI, grant number 847/15, VHB, grant
336 number 01/2015, AMI and VHB, grant number 23038000059/2015-61);
337 Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio de Janeiro (AMI, grant number
338 26/202.945/2016), Escola Nacional de Saúde Pública (LG, grant number
339 01/2015).

340 REFERENCES

- 341 Alves, E.B. da S., Conceição, M.J., Leles, D., 2016. *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris*
342 *suum*, or “*Ascaris lumbricum*”? *J. Infect. Dis.* 213, 1355–1355.
343 <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw027>
- 344 Anderson, T.J., Romero-Abal, M.E., Jaenike, J., 1993. Genetic structure and
345 epidemiology of *Ascaris* populations: patterns of host affiliation in
346 Guatemala. *Parasitology* 107 (Pt 3), 319–334.
- 347 Anderson, T.J., 1995. *Ascaris* infections in humans from North America:
348 molecular evidence for cross-infection. *Parasitology* 110 (Pt 2), 215–219.
- 349 Betson, M., Nejsum, P., Bendall, R.P., Deb, R.M., Stothard, J.R., 2014. Molecular
350 epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission
351 dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *J. Infect. Dis.* 210, 932–941.
352 <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu193>
- 353 Betson, M., Stothard, J.R., 2016. *Ascaris lumbricoides* or *Ascaris suum*: What’s
354 in a Name? *J. Infect. Dis.* 213, 1355–1356.
355 <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw037>
- 356 Callen, E.O., Cameron, T.W.M., 1960. A prehistoric diet as revealed in coprolites.
357 *New Sci.* 8, 35–40.
- 358 Cook, D.C., Bastos, M.Q.R., Lopes, C., Mendonça de Souza, S., Santos, R.V.,
359 2015. Pretos Novos: Evidence for African Oral Hygiene Practices in Brazil,
360 1769-1830. *Int. J. Osteoarchaeol.* 25, 238–244.
361 <https://doi.org/10.1002/oa.2278>
- 362 Faust, E.C., Sawitz, W., Tobie, J., Odom, V., Peres, C., Lincicome, D.R., 1939.
363 Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa
364 and helminths in feces. *J. Parasitol.* 25, 241–62.

- 365 Gijón Botella, H., Afonso Vargas, J., Arnay de la Rosa, M., Leles, D., González
366 Reimers, E., Vicente, A., Iñiguez, A., 2010. Paleoparasitologic,
367 paleogenetic and paleobotanic analysis of XVIII century coprolites from
368 the church La Concepción in Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands,
369 Spain. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 105, 1054–1056.
- 370 Hubber, F., Bonfim, T.C., Gomes, R.S., 2003. Comparação da Eficiência da
371 Técnica de Sedimentação pelo Formaldeído-Éter e da Técnica de
372 Centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e
373 oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. Rev.
374 Bras. Parasitol. Veterinária 12, 135–37.
- 375 Iñiguez, AM, 2003. *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from north and south
376 American human coprolites. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 98, 67–69.
- 377 Iñiguez, A., Reinhard, K., Carvalho Gonçalves, M., Ferreira, L., Araújo, A., Paulo
378 Vicente, A., 2006. SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis*
379 ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. Int. J. Parasitol. 36,
380 1419–1425. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.07.005>
- 381 Iñiguez, A., 2011. Paleoparasitologia molecular, in: Fundamentos da
382 Paleoparasitologia. Ferreira LF, Araújo A, Reinhard K, Rio de Janeiro,
383 Brazil, pp. 301–316.
- 384 Iñiguez, A., Leles, D., Jaeger, L., Carvalho-Costa, F., Araújo, A., 2012. Genetic
385 characterisation and molecular epidemiology of *Ascaris* spp. from humans
386 and pigs in Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 106, 604–612.
387 <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.06.009>
- 388 Iñiguez AM, 2014. Paleoparasitologia molecular e paleogenética para o estudo
389 das doenças infecto-parasitárias do passado: Princípios, metodologia e

- 390 agravos, in: *Avances Recientes de La Bioarqueología Latinoamericana*.
391 L. H. Luna, C. M. Aranda, J. A. Suby, Buenos Aires, Argentina, pp. 285–
392 320.
- 393 Jaeger, L., M.F.M. de Souza, S., Dias, O., Iñiguez, A., 2013a. *Mycobacterium*
394 *tuberculosis* Complex in Remains of 18th–19th Century Slaves, Brazil.
395 *Emerg. Infect. Dis.* 19, 837–839.
396 <http://dx.doi.org/10.3201/eid1905.120193>
- 397 Jaeger, L.H., Taglioretti, V., Fugassa, M.H., Dias, O., Neto, J., Iñiguez, A.M.,
398 2013b. Paleoparasitological results from XVIII century human remains
399 from Rio de Janeiro, Brazil. *Acta Trop.* 125, 282–286.
400 <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.11.007>
- 401 Jaeger, L.H., Taglioretti, V., Dias, O., Iñiguez, A.M., 2013c. Paleoparasitological
402 analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th
403 century in Rio de Janeiro, Brazil. *Int. J. Paleopathol.* 3, 214–217.
404 <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2013.04.001>
- 405 Jaeger, L., Iñiguez, A., 2014. Molecular Paleoparasitological Hybridization
406 Approach as Effective Tool for Diagnosing Human Intestinal Parasites
407 from Scarce Archaeological Remains. *PLoS ONE* 9, e105910.
408 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105910>
- 409 Jaeger, L.H., Gijón-Botella, H., del Carmen del Arco-Aguilar, M., Martín-Oval, M.,
410 Rodríguez-Maffiotte, C., del Arco-Aguilar, M., Araújo, A., Iñiguez, A.M.,
411 2016. Evidence of Helminth Infection in Guanche Mummies: Integrating
412 Paleoparasitological and Paleogenetic Investigations. *J. Parasitol.* 102,
413 222–228. <https://doi.org/10.1645/15-866>

- 414 Leles, D., Araújo, A., Ferreira, L.F., Vicente, A.C.P., Iñiguez, A.M., 2008.
415 Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites:
416 new scenery of ascariasis in pre-Colombian South America times. Mem.
417 Inst. Oswaldo Cruz 103, 106–108.
- 418 Leles, D., Araújo, A., Vicente, A.C.P., Iñiguez, A.M., 2009. Molecular diagnosis
419 of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp.
420 genotype in Brazil. Vet. Parasitol. 163, 167–170.
421 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.050>
- 422 Leles, D., 2010. Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus,
423 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer, 1761). Escola Nacional de Saúde Pública
424 Sérgio Arouca.
- 425 Leles, D., Araújo, A., Vicente, A.C.P., Iñiguez, A.M., 2010. ITS1 intra-individual
426 variability of *Ascaris* isolates from Brazil. Parasitol. Int. 59, 93–96.
427 <https://doi.org/10.1016/j.parint.2009.10.001>
- 428 Leles, D., Gardner, S.L., Reinhard, K., Iñiguez, A., Araujo, A., 2012. Are *Ascaris*
429 lumbricoides and *Ascaris suum* a single species? Parasit. Vectors 5, 1.
- 430 Loreille, O., Roumat, E., Verneau, O., Bouchet, F., Hänni, C., 2001. Ancient DNA
431 from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected
432 in coprolites. Int. J. Parasitol. 31, 1101–1106.
433 [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00214-4)
- 434 Lutz, A., 1919. O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo
435 observações, feitas no Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 11.
436 <https://doi.org/10.1590/S0074-02761919000100006>

- 437 Lyrio, A., Souza, S.M., Cook, D.C., 2011. Dentes intencionalmente modificados
438 e etnicidade em cemitérios do Brasil Colônia e Império. *Rev. Mus.*
439 *Arqueol. E Etnologia* 21, 315–334.
- 440 Machado, L.C., 2006. Sítio Cemitério dos Pretos Novos: análise biocultural.
441 Interpretando os ossos e os dentes humanos. *Bol. Inst. Arqueol. Bras. IAB*
442 1–24.
- 443 Morrow, J.J., Newby, J., Piombino-Mascalì, D., Reinhard, K.J., 2016.
444 Taphonomic considerations for the analysis of parasites in archaeological
445 materials. *Int. J. Paleopathol.* 13, 56–64.
446 <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2016.01.005>
- 447 O’Lorcain, P., Holland, C.V., 2000. The public health importance of *Ascaris*
448 *lumbricoides*. *Parasitology* 121, S51.
449 <https://doi.org/10.1017/S0031182000006442>
- 450 Peng, W., Anderson, T.J.C., Zhou, X., Kennedy, M.W., 1998. Genetic variation in
451 sympatric *Ascaris* populations from humans and pigs in China.
452 *Parasitology* 117, 355–361. <https://doi.org/10.1017/S0031182098003102>
- 453 Peng, W., Yuan, K., Zhou, X., Hu, M., Abs EL-Osta, Y.G., Gasser, R.B., 2003.
454 Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China
455 based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal
456 DNA. *Electrophoresis* 24, 2308–2315.
457 <https://doi.org/10.1002/elps.200305455>
- 458 Pereira, J., 2007. À Flor da Terra: o Cemitério dos Pretos Novos no Rio de
459 Janeiro. Garamond/Prefeitura do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- 460 Quilès, F., Balandier, J.-Y., Capizzi-Banas, S., 2006. In situ characterisation of a
461 microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris*

- 462 eggs. Anal. Bioanal. Chem. 386, 249–255.
463 <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0638-4>
- 464 Rey, L., 2008. Parasitologia, 4th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- 465 Stephenson, L.S., Latham, M.C., Ottesen, E.A., 2000. Malnutrition and parasitic
466 helminth infections. Parasitology 121, S23.
467 <https://doi.org/10.1017/S0031182000006491>
- 468 Zhou, C., Jian, S., Peng, W., Li, M., 2018. Genetic Diversity of Ascaris in China
469 Assessed Using Simple Sequence Repeat Markers. Korean J. Parasitol.
470 56, 175–181. <https://doi.org/10.3347/kjp.2018.56.2.175>
- 471 Zhu, X., Chilton, N.B., Jacobs, D.E., Boes, J., Gasser, R.B., 1999.
472 Characterisation of Ascaris from human and pig hosts by nuclear
473 ribosomal DNA sequences. Int. J. Parasitol. 29, 469–478.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi demonstrada a circulação de infecções por MTC, *Treponema* spp., *T. trichiura* e *Ascaris* sp. em remanescentes humanos recuperados em sítios arqueológicos localizados no Maranhão e Rio de Janeiro datados do período colonial Brasileiro. A detecção destas infecções condiz com os dados da literatura, que reportam diversas epidemias e endemias no Brasil, que se intensificaram ou foram introduzidas após a chegada de Europeus e Africanos, e causaram grandes devastações (SIGAUD, 2009b, 2009f).

Embora a tuberculose já tenha sido apontada na América pré-colombiana (ALLISON et al., 1973; SALO et al., 1994; ARRIAZA et al., 1995; KONOMI et al., 2002) os dados referentes ao período pós-contato são escassos. A presença da infecção no Rio de Janeiro colonial foi demonstrada até o momento por Jaeger e colaboradores (2012; 2013b), que apontaram a circulação de MTC em população majoritariamente com ancestralidade europeia e em Africanos escravizados. Contudo, *Mycobacterium* sp. ainda não foi verificado em Nativos Ameríndios do período pós-contato. Em nosso estudo reportamos pela primeira vez MTC em indígenas Tenetehara-Guajajara um dos primeiros Nativos a terem contato com Europeus e Africanos e que tinham evidências sugestivas de tuberculose. Nossos dados foram complementados com a condução da genotipagem, uma abordagem essencial para o entendimento da contribuição de tipos de linhagens nas infecções detectadas. A caracterização de genótipos pode revelar introduções de espécies/cepas, como a possível presença de *M. africanum* nos indígenas estudados. Embora não fosse possível determinar as espécies de MTC circulantes nesta população, verificamos que pelo menos duas linhagens diferentes pertencentes ao complexo estavam presentes. Os únicos estudos que evidenciaram MTC no Brasil colonial, mencionados acima, não determinaram o genótipo das cepas circulantes, e conseqüentemente, há um desconhecimento sobre a origem destas linhagens.

A metodologia aplicada no presente estudo para o diagnóstico de *Treponema* sp. em material ósseo arqueológico, permitiu a detecção do aDNA da bactéria em populações remanescentes no Rio de Janeiro durante o período colonial. Mesmo diante de estudos anteriores que apontaram para a inviabilidade da identificação da bactéria neste tipo de material (BOUWMAN, BROWN, 2005; KOLMAN et al., 1999; VON HUNNIUS et al., 2007), nosso estudo mostrou que a aplicação de critérios na escolha de indivíduos e populações de estudo, permitiu a detecção da infecção em populações antigas. No atual trabalho foi demonstrada pela primeira vez a evidência biológica da infecção por

Treponema sp. no Rio de Janeiro colonial, o que é sustentado pelos dados históricos sobre a circulação de sífilis e boubá na cidade a partir do século XV. A aplicação de NGS como perspectiva permitirá a detecção de outros indivíduos possivelmente infectados bem como a determinação das subespécies circulantes, principalmente em relação a jovem proveniente do sítio arqueológico CPXV, positiva para *Treponema* sp.

Considerando o ciclo biológico de *T. trichiura* e *Ascaris* sp. e o tempo de oviposição até a aquisição das infecções por estes helmintos, nosso estudo apontou que a presença destas espécies nos indivíduos escravizados só pode ser explicada se adquirida em terras Africanas. A literatura reporta achados de *T. trichiura* e *Ascaris* sp. em todo o mundo durante o período pré-Colombiano, incluindo a África (GONÇALVES et al., 2003). Esses dados suportam o contato de Africanos com estes helmintos antes das grandes navegações e levando posteriormente, a dispersão. A presença destes geohelmintos aponta que provavelmente indivíduos provenientes do CPN viviam em ambientes que favoreciam à transmissão destas infecções. Fragmentos de ovos de *T. trichiura* e *Ascaris* sp. verificados na análise paleoparasitológica indicaram que fatores tafonômicos e o processo de curadoria aplicado às amostras ósseas podem ter influenciado na preservação das estruturas parasitárias. Mas o fator a que atribuímos a maior influência se refere à cremação conferida aos ossos. Estudos anteriores conduzidos por Jaeger e colaboradores (2013a; 2013c) em populações do período colonial Brasileiro demonstraram além de maior frequência e diversidade parasitária, ausência de fragmentos de ovos. Na análise paleogenética, o marcador molecular utilizado para identificação de *Ascaris* sp., embora tenha permitido a detecção da infecção em um indivíduo previamente negativo na análise paleoparasitológica, não discriminou entre os genótipos circulantes em diferentes hospedeiros e/ou regiões. Apontamos que a falta de caracterização genética não estaria relacionada a uma limitação do alvo molecular aplicado, mas sim à ausência de informação genética disponível para este alvo.

8- CONCLUSÕES

ARTIGO 1: “Tuberculosis in post-contact Native Americans of Brazil: Paleopathological and paleogenetic evidence from the Tenetehara-Guajajara”

- O estudo demonstrou geneticamente a infecção pelo MTC em indivíduos Nativos Brasileiros Tenetehara-Guajaras com evidências paleopatológicas sugestivas de TB no período pós-contato.
- Os indivíduos estudados foram infectados por pelo menos por duas linhagens diferentes de MTC.
- As linhagens de MTC identificadas permitem sugerir duas possíveis vias de infecção nesse grupo, pelo contato com Europeus e/ou escravos Africanos.

ARTIGO 2: “First Paleogenetic Evidence of Probable Syphilis and Treponematoses Cases in the Brazilian Colonial Period”

- Os resultados paleogenéticos demonstraram a infecção por *Treponema* spp. em indivíduos do período histórico do Rio de Janeiro o que é consistente com a literatura da época, que descreve sífilis venérea, bem como boubas, como doenças endêmicas na cidade.
- A infecção por treponematoses revelada em duas jovens adultas, uma com confirmação para TPA, indica que não só o contexto epidemiológico, mas também a fisiopatologia da doença, devem ser considerados nos estudos de paleogenética de sífilis.
- No estudo sequências de aDNA *Treponema* spp. foram recuperadas pela primeira vez em indivíduos do Brasil.

ARTIGO 3: “African helminth infections out of Africa: Paleoparasitological and paleogenetic investigations in Pretos Novos cemetery, Rio de Janeiro, Brazil (1769-1830)”

- Dados paleoparasitológicos e paleogenéticos foram recuperados de remanescentes humanos provenientes do cemitério dos Pretos Novos, apesar das práticas de sepultamento, dos fatores tafonômicos e dos processos de curadoria que influenciaram na preservação dos ovos e aDNA dos parasitos.

- A infecção por *Ascaris* sp. e *T. trichiura*, foi confirmada pela integração das análises paleoparasitológicas e paleogenéticas o que demonstra a importância dos estudos multidisciplinares.
- Mesmo com uma provável subestimação da infecção, é possível afirmar a origem Africana destas helmintíases nos indivíduos do cemitério dos Pretos Novos.
- Este estudo relatou pela primeira vez uma sequência de aDNA de parasito em restos humanos do período colonial no Rio de Janeiro.

9- REFERÊNCIAS

- ABOUBAKER OSMAN, D. et al. Smooth Tubercle Bacilli: Neglected Opportunistic Tropical Pathogens. **Frontiers in Public Health**, v. 3, 11 jan. 2016.
- ADRUS, M. et al. Gastrointestinal parasites of zoonotic importance observed in the wild, urban, and captive populations of non-human primates in Malaysia. **Journal of Medical Primatology**, v. 48, n. 1, p. 22–31, fev. 2019.
- ALBARELLA, U. (ED.). **Pigs and humans: 10,000 years of interaction**. Oxford ; New York: Oxford University Press, 2007.
- ALEXANDER, K. A. et al. Novel Mycobacterium tuberculosis complex pathogen, M. mungi. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1296–1299, ago. 2010.
- ALLISON, M. J.; MENDOZA, D.; PEZZIA, A. Documentation of a case of tuberculosis in Pre-Columbian America. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 107, n. 6, p. 985–991, jun. 1973.
- ALVES, E. B. DA S.; CONCEIÇÃO, M. J.; LELES, D. Ascaris lumbricoides, Ascaris suum, or “Ascaris lumbrisuum”? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 8, p. 1355–1355, 15 abr. 2016.
- AMES, S. K. et al. Scalable metagenomic taxonomy classification using a reference genome database. **Bioinformatics**, v. 29, n. 18, p. 2253–2260, 15 set. 2013.
- ANDERSON, T. J. Ascaris infections in humans from North America: molecular evidence for cross-infection. **Parasitology**, v. 110 (Pt 2), p. 215–219, fev. 1995.
- ANDERSON, T. J.; ROMERO-ABAL, M. E.; JAENIKE, J. Genetic structure and epidemiology of Ascaris populations: patterns of host affiliation in Guatemala. **Parasitology**, v. 107 (Pt 3), p. 319–334, set. 1993.
- ANDREWS, R. M. et al. Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. **Nature Genetics**, v. 23, n. 2, p. 147, out. 1999.
- ANTAL, G. M.; LUKEHART, S. A.; MEHEUS, A. Z. The endemic treponematoses. **Microbes and Infection / Institut Pasteur**, v. 4, n. 1, p. 83–94, jan. 2002.
- ARAÚJO, A. et al. Parasites as probes for prehistoric human migrations? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 3, p. 112–115, mar. 2008.
- ARAÚJO, A. et al. Parasites as probes for prehistoric human migrations? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 3, p. 112–115, mar. 2008.
- ARAÚJO, A. et al. Paleoparasitology: the origin of human parasites. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 71, n. 9B, p. 722–726, set. 2013.
- ARAÚJO, A. et al. The paleoepidemiology of Chagas disease. In: **Foundations of paleoparasitology**. 2. ed. Rio de Janeiro, Brazil: Fiocruz, 2014. p. 419–434.

ARAÚJO, A. J. G.; FERREIRA, L. F.; CONFALONIERI, U. E. C. A contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 41, p. 873–881, 1981.

ARAÚJO, A.; REINHARD, K. J.; FERREIRA, L. F. **Paleoparasitologia**. Fiocruz, 2008.

ARORA, N. et al. Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 16245, jan. 2016.

ARRIAZA, B. T. et al. Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 98, n. 1, p. 37–45, set. 1995.

BAKER, B. J. Early manifestations of tuberculosis in the skeleton. In: PÁLFI, G. et al. (Eds.) **Tuberculosis Past and Present**. Golden Book Publisher Ltd, TB Foundation, 1999. p. 301–307.

BAKER, L. et al. Silent Nucleotide Polymorphisms and a Phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1568–1577, set. 2004.

BARNES, I.; THOMAS, M. G. Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in museum osteological collections. **Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society**, v. 273, n. 1587, p. 645–653, 22 mar. 2006.

BARRETO, M. L. et al. Effect of city-wide sanitation programme on reduction in rate of childhood diarrhoea in northeast Brazil: assessment by two cohort studies. **The Lancet**, v. 370, n. 9599, p. 1622–1628, 10 nov. 2007.

BARRETO MAURICIO L. et al. Impact of a Citywide Sanitation Program in Northeast Brazil on Intestinal Parasites Infection in Young Children. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 11, p. 1637–1642, 1 nov. 2010.

BASLER, N. et al. Reduction of the contaminant fraction of DNA obtained from an ancient giant panda bone. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, dez. 2017.

BASSO, R. M. C. et al. Evolução da prevalência de parasitoses intestinais em escolares em Caxias do Sul, RS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 263–268, jun. 2008.

BEGGS, M. L. et al. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex direct repeat sequence for use in cycling probe reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 12, p. 2985–2989, 1 dez. 1996.

BEHRHOF, W. et al. PCR testing for *Treponema pallidum* in paraffin-embedded skin biopsy specimens: test design and impact on the diagnosis of syphilis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 3, p. 390–395, mar. 2008.

BELTRAME, M. O. et al. Parasitological study of mountain viscacha fecal pellets from patagonia over the last 1200 years (“Cueva Peligro”, Chubut province, Argentina). **Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 253–260, fev. 2019.

BETSON, M. et al. Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 6, p. 932–941, 15 set. 2014.

BETSON, M.; STOTHARD, J. R. *Ascaris lumbricoides* or *Ascaris suum*: What's in a Name? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 8, p. 1355–1356, 15 abr. 2016.

BICK, E. M. (ED.). **Classics of orthopaedics**. Philadelphia: Lippincott, 1976.

BÖDDINGHAUS, B. et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 8, p. 1751–1759, 1 ago. 1990.

BONANI, G. et al. Altersbestimmung von Lilligrammproben der Oetzaler Gletscherleiche mit der Beschleunigermassenpektrometrie methode (AMS). In: Hopfel, F.; Platzer, W.; Spindler, K. (Eds.). **Der Mann im Eis**. Veröffentlichungen der Universität Innsbruck: Innsbruck, 1992. v. 1p. 108–116.

BORITSCH, E. C. et al. A glimpse into the past and predictions for the future: the molecular evolution of the tuberculosis agent. **Molecular Microbiology**, v. 93, n. 5, p. 835–852, 2014.

BOS, K. I. et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. **Nature**, v. 514, n. 7523, p. 494–497, 23 out. 2014.

BOUCHET, F. et al. Paléoparasitologie en contexte pléistocène: premières observations à la Grande Grotte d'Arcy-sur-Cure (Yonne), France. v. 319, p. 147–151, 1996.

BOUWMAN, A. S. et al. Genotype of a historic strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 45, p. 18511–18516, 6 nov. 2012.

BOUWMAN, A. S.; BROWN, T. A. The limits of biomolecular palaeopathology: ancient DNA cannot be used to study venereal syphilis. **Journal of Archaeological Science**, v. 32, n. 5, p. 703–713, maio 2005.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1019, p. 1–26, 2017.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 6, p. 3684–3689, 19 mar. 2002.

BROSSIER, F. et al. Molecular detection methods of resistance to antituberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 47, n. 5, p. 340–348, 1 set. 2017.

BRUSCHI, F. et al. Short report: cysticercosis in an Egyptian mummy of the late Ptolemaic period. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 4, p. 598–599, abr. 2006.

BUIKSTRA, J.; COOK, D. Paleopatologia e Paleoepidemiologia: estudos multidisciplinares. In: ARAÚJO, A. (Ed.). **Paleopatologia**. Rio de Janeiro: Panorama ENSP, 1992. p. 343.

BUIKSTRA, J.; UBELAKER, D. **Standards for Data Collection from Human Skeletal Remains**. Fayetteville: Arkansas Archeological Series, 1994.

BUNDY, D. A.; COOPER, E. S.; BROOKER, S. Nematodes Limited to the Intestinal Tract (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Capillaria philippinensis* and *Trichostrongylus* spp.). In: **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease**. Elsevier, 2013. p. 797–803.

CAIMI, K.; CATALDI, A. A Fragment of 21 ORFs Around the Direct Repeat (DR) Region of *Mycobacterium tuberculosis* is Absent From the Other Sequenced Mycobacterial Genomes: Implications for the Evolution of the DR Region. **Comparative and Functional Genomics**, v. 5, n. 2, p. 116–122, 2004.

CALLEN, E. O.; CAMERON, T. W. M. A prehistoric diet revealed in coprolites. **New Scientist**, v. 8, n. 190, 1960.

CALMETTE, A.; GUERIN, G. Nouvelles recherches experimentales sur la vaccination des bovines contre la tuberculose. v. 34, p. 553–560, 1920.

CAMERON, T. W. M. The Helminth Parasites of Animals and Human Disease. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 20, n. 5, p. 547–556, mar. 1927.

CAMPOS, H. Diagnóstico da tuberculose. 2. v. 15, p. 92–99, 2006.

CANO, R. et al. Sequence analysis of bacterial DNA in the colon and stomach of the Tyrolean Iceman. v. 112, n. 3, p. 297–309, 2000.

CANO, R. J. et al. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 536–538, 10 jun. 1993.

CARLSGART, J.; ROEPSTORFF, A.; NEJSUM, P. Multiplex PCR on single unembryonated *Ascaris* (roundworm) eggs. **Parasitology Research**, v. 104, n. 4, p. 939–943, mar. 2009.

CARRARA, S. The symbolic geopolitics of syphilis: an essay in historical anthropology. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 3, n. 3, p. 391–408, nov. 1996.

CASTETS, M. et al. Tuberculosis bacilli of the African type: preliminary note. **Revue De Tuberculose Et De Pneumologie**, v. 32, n. 2, p. 179–184, mar. 1968.

CASTRO, D. B. DE et al. The Socioeconomic Factors and the Indigenous Component of Tuberculosis in Amazonas. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0158574, 30 jun. 2016.

CAVALLERO, S. et al. Phylogeographical studies of *Ascaris* spp. based on ribosomal and mitochondrial DNA sequences. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 4, p. e2170, 2013.

ÇAVUŞOĞLU, C.; YILMAZ, F. F. Molecular epidemiology of human *Mycobacterium bovis* infection in Aegean Region, Turkey. **Mikrobiyoloji Bulteni**, v. 51, n. 2, p. 165–170, abr. 2017.

CDC. **Parasites - Trichuriasis (also known as Whipworm Infection)**, 2013a. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/whipworm/epi.html>>. Acesso em: 4 abr. 2019

CDC. **Parasites - soil transmitted helminths**. 2013b. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/sth/>>. Acesso em: 26 mar. 2019b.

CDC. **Trichuriasis**, 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trichuriasis/>>. Acesso em: 4 abr. 2019

CDC. **Parasites - Ascariasis: Biology**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>>. Acesso em: 14 jan. 2019a.

CDC. **Parasites - Ascaris**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/index.html>>. Acesso em: 14 jan. 2019b.

CDC. **Parasites - Ascariasis - Epidemiology & Risk Factors**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/epi.html>>. Acesso em: 18 jan. 2019c.

ČEJKOVÁ, D. et al. Whole Genome Sequences of Three *Treponema pallidum* ssp. *pertenue* Strains: Yaws and Syphilis Treponemes Differ in Less than 0.2% of the Genome Sequence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, p. e1471, 24 jan. 2012.

ČEJKOVÁ, D. et al. A Retrospective Study on Genetic Heterogeneity within *Treponema* Strains: Subpopulations Are Genetically Distinct in a Limited Number of Positions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004110, 5 out. 2015.

CHAN, M. S. et al. The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. **Parasitology**, v. 109 (Pt 3), p. 373–387, set. 1994.

CHESSON, H.; MAYAUD, P.; ARAL, S. Sexually Transmitted Infections: Impact and Cost-Effectiveness of Prevention. In: HOLMES, K. et al. (Eds.). **Major Infectious Diseases**. 3ª ed. World Bank Group, 2017. v. 6p. 203–232.

CHO, P. Y. et al. Discovery of Parasite Eggs in Archeological Residence during the 15th Century in Seoul, Korea. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 55, n. 3, p. 357–361, 30 jun. 2017.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 11 jun. 1998.

COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. E. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology**, v. 103, n. 1, p. 1–9, maio 2001.

COMAS, I. et al. Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. **Nature Genetics**, v. 42, n. 6, p. 498–503, jun. 2010.

COMAS, I. et al. Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature genetics**, v. 45, n. 10, p. 1176–1182, out. 2013.

CONFALONIERI, U. Paleoepidemiologia de *T. trichiura* na América. In: FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A.; CONFALONIERI, U. (Eds.). **Paleoparasitologia no Brasil**. Rio de Janeiro: PEC/ENSP, 1988. p. 120–137.

COOPER, C. et al. Tuberculosis in early medieval Switzerland--osteological and molecular evidence. **Swiss Medical Weekly**, v. 146, p. w14269, 2016.

CÔTÉ, N. M. L. et al. A New High-Throughput Approach to Genotype Ancient Human Gastrointestinal Parasites. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0146230, 11 jan. 2016.

CÔTÉ, N. M.-L.; BAILLY, M. L. Palaeoparasitology and palaeogenetics: review and perspectives for the study of ancient human parasites. **Parasitology**, v. 145, n. 5, p. 656–664, abr. 2018.

CRISCIONE, C. D. et al. Microsatellite markers for the human nematode parasite *Ascaris lumbricoides*: development and assessment of utility. **The Journal of Parasitology**, v. 93, n. 3, p. 704–708, jun. 2007.

CROMPTON, D. W. *Ascaris* and ascariasis. **Advances in Parasitology**, v. 48, p. 285–375, 2001.

CROSBY, A. W. The Early History of Syphilis: A Reappraisal. **American Anthropologist**, v. 71, n. 2, p. 218–227, 1 abr. 1969.

CUMMINS, S. L. "VIRGIN SOIL"-AND AFTER: A WORKING CONCEPTION OF TUBERCULOSIS IN CHILDREN, ADOLESCENTS, AND ABORIGINES. **British Medical Journal**, v. 2, n. 3575, p. 39–41, 13 jul. 1929.

CUTILLAS, C. et al. *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. **Acta Tropica**, v. 111, n. 3, p. 299–307, set. 2009.

DABERNAT, H. et al. Tuberculosis epidemiology and selection in an autochthonous Siberian population from the 16th-19th century. **PloS One**, v. 9, n. 2, p. e89877, 2014.

DAS, K.; CHOWDHURY, P.; GANGULY, S. Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) based sequence typing reveals phylogenetically distinct *Ascaris* population. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 478–483, 4 set. 2015.

DAVIDSON, J. A. et al. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* Disease in Humans in England, Wales, and Northern Ireland, 2002-2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 3, p. 377–386, 2017.

DE MELO, F. L. et al. Syphilis at the Crossroad of Phylogenetics and Paleopathology. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, 5 jan. 2010.

DE SILVA, N. R.; COOPER, E. S. Trichuriasis. In: **Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice**. Elsevier, 2011. p. 791–793.

DE SOUZA, M. V. et al. New Paleoparasitological Investigations from the Pre-Inca to Hispanic Contact Period in northern Chile. **Acta Tropica**, 27 nov. 2017.

DIAS, A.; TANURE, A.; MANHÃES, H. Ocorrência de *Ascaris suum* em suínos abatidos na Zona da Mata, Minas Gerais. v. 48, n. 2, p. 101–106, 2011.

DIAS, O. **Arqueologia, Igreja de Nossa Senhora do Carmo da Antiga Sé: História e Restauração**. Nacional, 2008.

DICKSON, J. H. et al. The omnivorous Tyrolean Iceman: colon contents (meat, cereals, pollen, moss and whipworm) and stable isotope analyses. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 355, n. 1404, p. 1843–1849, 29 dez. 2000.

DONOGHUE, H. D. et al. Co-infection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* in human archaeological samples: a possible explanation for the historical decline of leprosy. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 272, n. 1561, p. 389–394, 22 fev. 2005.

DONOGHUE, H. D. Human tuberculosis – an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 14–15, p. 1156–1162, dez. 2009.

DONOGHUE, H. D. Insights gained from ancient biomolecules into past and present tuberculosis—a personal perspective. **International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 56, p. 176–180, mar. 2017.

DOU, H.-Y. et al. Prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* strain genotypes in Taiwan reveals a close link to ethnic and population migration. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 114, n. 6, p. 484–488, 1 jun. 2015.

ERMINI, L. et al. Complete mitochondrial genome sequence of the Tyrolean Iceman. **Current biology: CB**, v. 18, n. 21, p. 1687–1693, 11 nov. 2008.

EVANS, A. C. et al. Late stone-age coprolite reveals evidence of prehistoric parasitism. **South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde**, v. 86, n. 3, p. 274–275, mar. 1996.

FARIA, C. P. et al. Geospatial distribution of intestinal parasitic infections in Rio de Janeiro (Brazil) and its association with social determinants. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005445, 8 mar. 2017.

FAUST, E. C. et al. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. **The Journal of Parasitology**, v. 25, n. 3, p. 241–62, 1939.

FERREIRA, L. F. Introdução à paleoparasitologia. In: FERREIRA, L. F.; REINHARD, K.; ARAÚJO, A. (Eds.). **Fundamentos da paleoparasitologia**. Fiocruz, 2011. p. 27–41.

FERREIRA, L. F. et al. Os achados na América do Sul. In: FERREIRA, L. F.; REINHARD, K.; ARAÚJO, A. (Eds.). **Fundamentos da paleoparasitologia**. Fiocruz, 2011. p. 319–352.

FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. J. G.; CONFALONIERI, U. E. C. Subsídios para a paleoparasitologia do Brasil: parasitos encontrados em coprólitos no município de Unaí, MG. **Resumos de IV Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 1979.

FERREIRA, L. F.; DE ARAÚJO, A. J. G.; CONFALONIERI, U. E. C. The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 1, p. 65–67, 1983.

FERREIRA, L. F.; REINHARD, K.; ARAÚJO, A. Interpretando resultados. In: **Paleoparasitologia**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. p. 53–102.

FERREIRA, L. F.; REINHARD, K.; ARAÚJO, A. Origem dos parasitos humanos. In: FERREIRA, L. F.; REINHARD, K.; ARAÚJO, A. (Eds.). **Fundamentos da paleoparasitologia**. 1ª ed., Fiocruz, 2011a. p. 121–139.

FERREIRA, L.; REINHARD, K.; ARAÚJO, A. **Fundamentos da paleoparasitologia**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2011b.

FIRDESSA, R. et al. Mycobacterial Lineages Causing Pulmonary and Extrapulmonary Tuberculosis, Ethiopia - Volume 19, Number 3—March 2013 - Emerging Infectious Diseases journal - CDC. v. 19, p. 460–463, 2013.

FLASAROVÁ, M. et al. Sequencing-based molecular typing of treponema pallidum strains in the Czech Republic: all identified genotypes are related to the sequence of the SS14 strain. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 92, n. 6, p. 669–674, nov. 2012.

FLETCHER, H. A. Molecular analysis of Mycobacterium tuberculosis DNA from a family of 18th century Hungarians. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 143–151, 1 jan. 2003.

FORBES, B. A. Mycobacterial Taxonomy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 380–383, 1 fev. 2017.

FRASER, C. M. et al. Complete genome sequence of Treponema pallidum, the syphilis spirochete. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5375, p. 375–388, 17 jul. 1998.

FULTON, T. L.; SHAPIRO, B. Setting Up an Ancient DNA Laboratory. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, v. 1963, p. 1–13, 2019.

FURLAN, M. C. R. et al. Avaliação do acesso ao tratamento de tuberculose sob a perspectiva de usuários. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 339–347, jul. 2017.

GAGNEUX, S. Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1590, p. 850–859, 19 mar. 2012.

GALAGAN, J. E. Genomic insights into tuberculosis. **Nature Reviews Genetics**, v. 15, n. 5, p. 307–320, maio 2014.

GALVIN, T. J. Development of Human and Pig Ascaris in the Pig and Rabbit. **The Journal of Parasitology**, v. 54, n. 6, p. 1085–1091, 1968.

GAYET-AGERON, A. et al. Use of Treponema pallidum PCR in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 127–129, jan. 2015.

GERSZTEN, P. C.; GERSZTEN, E.; ALLISON, M. J. Diseases of the Spine in South American Mummies. **Neurosurgery**, v. 48, n. 1, p. 208–213, 1 jan. 2001.

GIACANI, L.; LUKEHART, S. A. The endemic treponematoses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 89–115, jan. 2014.

GIJÓN BOTELLA, H. et al. Paleoparasitologic, paleogenetic and paleobotanic analysis of XVIII century coprolites from the church La Concepción in Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands, Spain. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1054–1056, dez. 2010.

GODREUIL, S.; TAZI, L.; BAULS, A.-L. Pulmonary Tuberculosis and Mycobacterium Tuberculosis: Modern Molecular Epidemiology and Perspectives. In: TIBAYRENC, M. (Ed.). **Encyclopedia of Infectious Diseases**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007. p. 1–29.

GOGARTEN, J. F. et al. Tools for opening new chapters in the book of *Treponema pallidum* evolutionary history. **Clinical Microbiology and Infection**, ago. 2016.

GOLENBERG, E. M.; BICKEL, A.; WEIHS, P. Effect of highly fragmented DNA on PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 24, p. 5026–5033, 15 dez. 1996.

GOMES, M. **O Índio na História: O Povo Tenetehara em Busca da Liberdade**. Petrópolis: vozes, 2002.

GÓMEZ I PRAT, J.; DE SOUZA, S. M. F. M. Prehistoric tuberculosis in america: adding comments to a literature review. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98 Suppl 1, p. 151–159, 2003.

GONÇALVES, M. L. C.; ARAÚJO, A.; FERREIRA, L. F. Paleoparasitology in Brazil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 191–196, 2002.

GONÇALVES, M. L. C.; ARAÚJO, A.; FERREIRA, L. F. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 103–118, jan. 2003.

GORDON, S. V. et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 643–655, maio 1999.

GRILLOVÁ, L. et al. Molecular characterization of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in Switzerland and France with a new multilocus sequence typing scheme. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200773, 30 jul. 2018.

GRILLOVA, L. et al. A public database for the new MLST scheme for *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*: surveillance and epidemiology of the causative agent of syphilis. **PeerJ**, v. 6, p. e6182, 2019.

GUICHÓN, R. A. et al. Pre-Columbian tuberculosis in Tierra del Fuego? Discussion of the paleopathological and molecular evidence. **International Journal of Paleopathology**, v. 11, p. 92–101, dez. 2015.

GUIMARÃES, F. N. et al. O puru-puru da Amazônia (Pinta, Carate, Mal del Pinto etc). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 46, n. 1, p. 135–197, mar. 1948.

GUTAKER, R. M.; BURBANO, H. A. Reinforcing plant evolutionary genomics using ancient DNA. **Current Opinion in Plant Biology**, 36 Genome studies and molecular genetics. v. 36, p. 38–45, 1 abr. 2017.

GUTIERREZ, M. C. et al. Ancient Origin and Gene Mosaicism of the Progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLOS Pathogens**, v. 1, n. 1, p. e5, 19 ago. 2005.

HACKETT, C. J. ON THE ORIGIN OF THE HUMAN TREPONEMATOSES (PINTA, YAWS, ENDEMIC SYPHILIS AND VENEREAL SYPHILIS). **Bulletin of the World Health Organization**, v. 29, p. 7–41, 1963.

HAMEED, H. M. A. et al. Molecular Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR-*Mycobacterium tuberculosis* Strains. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 2018.

HANCE, A. J. et al. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. **Molecular Microbiology**, v. 3, n. 7, p. 843–849, jul. 1989.

HANDT, O. et al. Ancient DNA: Methodological challenges. **Experientia**, v. 50, n. 6, p. 524–529, 1 jun. 1994.

HANDT, O. et al. The retrieval of ancient human DNA sequences. **American Journal of Human Genetics**, v. 59, n. 2, p. 368–376, ago. 1996.

HERRMANN, B.; HUMMEL, S. **Ancient DNA: Recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens**. New York: Springer - Verlag., 1994.

HIGUCHI, R. et al. DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. **Nature**, v. 312, n. 5991, p. 282–284, 15 nov. 1984.

HIJJAR, M.; CAMPOS, H.; FEITOSA, J. Tuberculose. In: COURA, J. R. (Ed.). **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. v. 2p. 1424–1463.

HO, E. L.; LUKEHART, S. A. Syphilis: using modern approaches to understand an old disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 12, p. 4584–4592, dez. 2011.

HOLLOWAY, K. L. et al. Evolution of human tuberculosis: A systematic review and meta-analysis of paleopathological evidence. **HOMO**, v. 62, n. 6, p. 402–458, 1 dez. 2011.

HONG, J. H. et al. ANCIENT ASCARIS DNA SEQUENCES OF CYTOCHROME B, CYTOCHROME C OXIDASE SUBUNIT 1, NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 1 AND INTERNAL TRANSCRIBED SPACER 1 GENES FROM JOSEON MUMMY FECES OF KOREA. **The Journal of Parasitology**, 24 jul. 2017.

HOOK, E. W.; PEELING, R. W. Syphilis Control — A Continuing Challenge. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 2, p. 122–124, 8 jul. 2004.

HUBBER, F.; BONFIM, T. C.; GOMES, R. S. Comparação da Eficiência da Técnica de Sedimentação pelo Formaldeído-Éter e da Técnica de Centrífugo-flutuação modificada na

detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 3, p. 135–37, 2003.

HUDSON, E. H. Treponematoses and Man's Social Evolution. **American Anthropologist**, v. 67, n. 4, p. 885–901, 1 ago. 1965.

IBGE. **IBGE Censo demográfico Brasileiro**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2013. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/resultados.html>>. Acesso em: 14 mar. 2014.

ILLUMINA. **Next-Generation Sequencing (NGS)**. Disponível em: <<https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>>. Acesso em: 7 fev. 2017.

IÑIGUEZ, A. et al. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 63–65, jan. 2003a.

IÑIGUEZ, A. Paleoparasitologia molecular. In: **Fundamentos da Paleoparasitologia**. Rio de Janeiro, Brazil: Ferreira LF, Araújo A, Reinhard K, 2011. p. 301–316.

IÑIGUEZ, A. et al. Genetic characterisation and molecular epidemiology of *Ascaris* spp. from humans and pigs in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 10, p. 604–612, out. 2012.

IÑIGUEZ, A. M. et al. *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from north and south American human coprolites. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 67–69, jan. 2003b.

IÑIGUEZ, A. M. et al. SL1 RNA gene recovery from *Enterobius vermicularis* ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 13, p. 1419–1425, nov. 2006.

IÑIGUEZ, A. M. Paleoparasitologia Molecular e Paleogenética para o Estudo de Doenças Infecto-Parasitárias do Passado: Princípios, Metodologia e Agravos. In: LUNA, L.; ARANDA, C.; SUBY, J. (Eds.). **Avances Recientes de la Bioarqueología Latinoamericana**. Buenos Aires ed. [s.l.] GIB, 2014. p. 285–319.

JAEGER, L. H. et al. Mycobacterium tuberculosis complex detection in human remains: tuberculosis spread since the 17th century in Rio de Janeiro, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 642–648, jun. 2012.

JAEGER, L. H. et al. Paleoparasitological results from XVIII century human remains from Rio de Janeiro, Brazil. **Acta Tropica**, v. 125, n. 3, p. 282–286, mar. 2013a.

JAEGER, L. H. et al. Mycobacterium tuberculosis Complex in Remains of 18th–19th Century Slaves, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 5, p. 837–838, maio 2013b.

JAEGER, L. H. et al. Paleoparasitological analysis of human remains from a European cemetery of the 17th–19th century in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Paleopathology**, v. 3, n. 3, p. 214–217, 1 set. 2013c.

JAEGER, L. H. et al. Evidence of Helminth Infection in Guanche Mummies: Integrating Paleoparasitological and Paleogenetic Investigations. **Journal of Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 222–228, abr. 2016.

JAEGER, L. H.; IÑIGUEZ, A. M. Molecular Paleoparasitological Hybridization Approach as Effective Tool for Diagnosing Human Intestinal Parasites from Scarce Archaeological Remains. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105910, 27 ago. 2014.

JOURDAN, P. M. et al. Soil-transmitted helminth infections. **The Lancet**, v. 391, n. 10117, p. 252–265, 20 jan. 2018.

KAISAR, M. M. M. et al. Improved diagnosis of *Trichuris trichiura* by using a bead-beating procedure on ethanol preserved stool samples prior to DNA isolation and the performance of multiplex real-time PCR for intestinal parasites. **Parasitology**, v. 144, n. 7, p. 965–974, jun. 2017.

KAPUR, V.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 Years Old? **The Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 5, p. 1348–1349, 1 nov. 1994.

KASTIEN-HILKA, T. et al. Health-related quality of life and its association with medication adherence in active pulmonary tuberculosis- a systematic review of global literature with focus on South Africa. **Health and Quality of Life Outcomes**, v. 14, p. 42, 11 mar. 2016.

KATO, K.; MIURA, M. Comparative examinations. v. 3, n. 35, 1954.

KATTULA, D. et al. Prevalence & risk factors for soil transmitted helminth infection among school children in south India. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 1, p. 76–82, jan. 2014.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397–400, dez. 1972.

KELLER, A. et al. New insights into the Tyrolean Iceman's origin and phenotype as inferred by whole-genome sequencing. **Nature Communications**, v. 3, p. 698, 28 fev. 2012.

KHURANA, S.; SETHI, S. Laboratory diagnosis of soil transmitted helminthiasis. **Tropical Parasitology**, v. 7, n. 2, p. 86–91, 2017.

KIM, M.-J. et al. Paleoparasitological Surveys for Detection of Helminth Eggs in Archaeological Sites of Jeolla-do and Jeju-do. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 51, n. 4, p. 489–492, 30 ago. 2013.

KLAUS, H. D. et al. Tuberculosis on the north coast of Peru: skeletal and molecular paleopathology of late pre-Hispanic and postcontact mycobacterial disease. **Journal of Archaeological Science**, v. 37, n. 10, p. 2587–2597, 1 out. 2010.

KNAPP, M.; HOFREITER, M. Next Generation Sequencing of Ancient DNA: Requirements, Strategies and Perspectives. **Genes**, v. 1, n. 2, p. 227–243, 28 jul. 2010.

KOLMAN, C. J. et al. Identification of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* in a 200-year-old skeletal specimen. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 2060–2063, dez. 1999.

KONOMI, N. et al. Detection of Mycobacterial DNA in Andean Mummies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4738–4740, dez. 2002.

KOUZNETSOV, A. V.; PRINZ, J. C. Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy. **The Lancet**, v. 360, n. 9330, p. 388–389, 3 ago. 2002.

KRINGS, M. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. v. 90, p. 19–30, 1997.

KUMAR JAISWAL, A. et al. An In Silico Identification of Common Putative Vaccine Candidates against *Treponema pallidum*: A Reverse Vaccinology and Subtractive Genomics Based Approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, 14 fev. 2017.

LAGIER, R. et al. Paleopathological diagnosis of skeletal tuberculosis. In: **Tuberculosis Past and Present**. [s.l.] Golden Book Publisher Ltd, TB Foundation, 1999. p. 285–290.

LAMBERTON, P. H. L.; JOURDAN, P. M. Human Ascariasis: Diagnostics Update. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 4, p. 189–200, dez. 2015.

LAN, Z.; BASTOS, M.; MENZIES, D. Treatment of human disease due to *Mycobacterium bovis*: a systematic review. **The European Respiratory Journal**, v. 48, n. 5, p. 1500–1503, 2016.

LE BAILLY, M.; ARAÚJO, A. Past Intestinal Parasites. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 4, 2016.

LEITE, D. et al. **Paleogenetic Studies in Guajajara Skeletal Remains, Maranhão State, Brazil**. Research article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/archive/2014/729120/>>. Acesso em: 4 dez. 2017.

LELES, D. et al. Molecular paleoparasitological diagnosis of *Ascaris* sp. from coprolites: new scenery of ascariasis in pre-Colombian South America times. **Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 106–108, fev. 2008.

LELES, D. et al. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 163, n. 1, p. 167–170, 7 jul. 2009.

LELES, D. **Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer, 1761)**. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, 2010.

LELES, D. et al. ITS1 intra-individual variability of *Ascaris* isolates from Brazil. **Parasitology International**, v. 59, n. 1, p. 93–96, mar. 2010a.

LELES, D. et al. A parasitological paradox: Why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas? **Journal of Archaeological Science**, v. 37, n. 7, p. 1510–1520, 1 jul. 2010b.

LELES, D. et al. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

LEVECKE, B. et al. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 3–4, p. 236–246, 30 set. 2007.

LI, Y. et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of ascarid nematodes from twenty-one species of captive wild mammals based on mitochondrial and nuclear sequences. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1329–1338, set. 2012.

LIMA, P. Os Índios Tenetehara: Nota de uma pesquisa de Antropologia física. v. 190, p. 77–81, 1946.

LIMA, T. O povoamento inicial do continente americano: migrações, contextos e datações. In: SILVA, H.; RODRIGUES-CARVALHO, C. (Eds.). **Nossa origem - O povoamento das Américas - visões multidisciplinares**. 1ª ed. Vieira e Lent, 2006. p. 77–103.

LINDQUIST, H. D. A.; CROSS, J. H. Helminths. In: COHEN, J.; POWDERLY, W. G.; OPAL, S. M. (Eds.). **Infectious Diseases (Fourth Edition)**. Elsevier, 2017. p. 1763-1779.e1.

LIRYO, A.; SOUZA, S. M. DE; COOK, D. C. Dentes intencionalmente modificados e etnicidade em cemitérios do Brasil Colônia e Império. **Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia**, v. 0, n. 21, p. 315–334, 9 dez. 2011.

LIU, G. H. et al. Characterization of *Trichuris trichiura* from humans and *T. suis* from pigs in China using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. **Journal of Helminthology**, v. 88, n. 1, p. 64–68, mar. 2014.

LIU, G.-H. et al. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. **Gene**, v. 492, n. 1, p. 110–116, jan. 2012.

LOBUE, P. A.; MOSER, K. S. Treatment of *Mycobacterium bovis* infected tuberculosis patients: San Diego County, California, United States, 1994-2003. **Int J Tuberc Lung Dis**. V. 9, n. 3, 333-8, mar. 2005.

LOMBARDI, G. et al. Five-year surveillance of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in Bologna, Italy: an underestimated problem. **Epidemiology & Infection**, v. 145, n. 14, p. 3035–3039, out. 2017.

LOPES, A. J. et al. História natural e apresentação clínica. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 5, n. 2, p. 40–45, 2006.

LOREILLE, O. et al. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1101–1106, ago. 2001.

LUKEHART, S. A.; BAKER-ZANDER, S. A.; SELL, S. Characterization of lymphocyte responsiveness in early experimental syphilis. I. In vitro response to mitogens and *Treponema pallidum* antigens. **The Journal of Immunology**, v. 124, n. 1, p. 454–460, 1 jan. 1980.

LUTZ, A. O Schistosomum mansoni e a Schistosomatose segundo observações, feitas no Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 11, n. 1, 1919.

MA, D. Y.; GIACANI, L.; CENTURIÓN-LARA, A. The molecular epidemiology of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. **Sexual Health**, v. 12, n. 2, p. 141, 2015.

MACHADO, D.; COUTO, I.; VIVEIROS, M. Advances in the molecular diagnosis of tuberculosis: From probes to genomes. **Infection, Genetics and Evolution**, 30 nov. 2018.

MAIXNER, F. et al. Metagenomic Analysis Reveals Presence of *Treponema denticola* in a Tissue Biopsy of the Iceman. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99994, 18 jun. 2014.

MAIXNER, F. et al. The Iceman's Last Meal Consisted of Fat, Wild Meat, and Cereals. **Current Biology**, v. 28, n. 14, p. 2348- 2355.e9, 23 jul. 2018.

MARKS, M. et al. Diagnostic performance of PCR assays for the diagnosis of neurosyphilis: a systematic review. **Sexually transmitted infections**, 30 jul. 2018.

MARMIESSE, M. et al. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology**, v. 150, n. 2, p. 483–496, 2004.

MARRA, C. M. et al. Enhanced molecular typing of *treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 9, p. 1380–1388, 1 nov. 2010.

MARRA, C. M. Other central nervous system infections: cytomegalovirus, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Treponema pallidum*. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 152, p. 151–166, 2018.

MATIONG, M. L. S. et al. Status of soil-transmitted helminth infections in schoolchildren in Laguna Province, the Philippines: Determined by parasitological and molecular diagnostic techniques. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 11, p. e0006022, nov. 2017.

MEEKUMS, H. et al. A genetic analysis of *Trichuris trichiura* and *Trichuris suis* from Ecuador. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, dez. 2015.

MELATTI, J. **Áreas etnográficas da América Indígena: Amazônia Oriental**. 1. ed. Brasília: Brasília University Press, 2011.

MENDES, A. M. et al. Epidemiologic situation of tuberculosis in Rio Grande do Sul: an analysis about Sinan's data between 2003 and 2012 focusing on indigenous peoples. **Revista Brasileira De Epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology**, v. 19, n. 3, p. 658–669, set. 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sífilis 2017**. Brasil: Secretaria de vigilância em saúde, 2017. . Acesso em: 27 fev. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia Prático para o Controle das Geo-helmintíases**, 2018. . Acesso em: 4 abr. 2019

MONTEIRO, K. J. L. et al. Kato–Katz thick smears as a DNA source of soil-transmitted helminths. **Journal of Helminthology**, p. 1–4, 15 nov. 2018.

MONTENEGRO, A. et al. Parasites, Paleoclimate, and the Peopling of the Americas: Using the Hookworm to Time the Clovis Migration. **Current Anthropology**, v. 47, n. 1, p. 193–200, fev. 2006.

MONTIEL, R. et al. Neonate Human Remains: A Window of Opportunity to the Molecular Study of Ancient Syphilis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36371, 2 maio 2012.

MOSTOWY, S. et al. Genomic Analysis Distinguishes *Mycobacterium africanum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3594–3599, 1 ago. 2004.

MÜLLER, R.; ROBERTS, C. A.; BROWN, T. A. Biomolecular identification of ancient *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in human remains from Britain and continental Europe. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 153, n. 2, p. 178–189, fev. 2014.

MURRAY, P. *Mycobacterium* e bactérias acidorresistentes relacionadas. In: **Microbiologia médica**. 8ª ed. Elsevier, 2017. p. 218–228.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. Bacteriologia. In: **Microbiologia médica**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. *Treponema*, *Borrelia* e *Leptospira*. In: **Microbiologia médica**. 8ª ed. Elsevier, 2017.

MYERS, P. et al. **The Animal Diversity Web (online)**, 2019. Disponível em: <<https://animaldiversity.org>>

NADALIN, S. O. A população no passado colonial brasileiro: mobilidade versus estabilidade. **Topoi (Rio de Janeiro)**, v. 4, n. 7, p. 222–275, dez. 2003.

NECHVÁTAL, L. et al. Syphilis-causing strains belong to separate SS14-like or Nichols-like groups as defined by multilocus analysis of 19 *Treponema pallidum* strains. **International journal of medical microbiology: IJMM**, v. 304, n. 5–6, p. 645–653, jul. 2014.

NEZAMABADI, M. et al. Paleoparasitological analysis of samples from the Chehrabad salt mine (Northwestern Iran). **International Journal of Paleopathology**, v. 3, n. 3, p. 229–233, set. 2013.

NICHOLS, H. J. OBSERVATIONS ON A STRAIN OF SPIROCHAETA PALLIDA ISOLATED FROM THE NERVOUS SYSTEM. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 19, n. 4, p. 362–371, 1 abr. 1914.

NODA, A. A. et al. Bejel in Cuba: molecular identification of *Treponema pallidum* subsp. endemicum in patients diagnosed with venereal syphilis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 11, p. 1210.e1-1210.e5, 1 nov. 2018.

NORBIS, L. et al. Tuberculosis: lights and shadows in the current diagnostic landscape. **The New Microbiologica**, v. 36, n. 2, p. 111–120, abr. 2013.

NORRIS, S. J. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. *Treponema Pallidum Polypeptide Research Group. Microbiological Reviews*, v. 57, n. 3, p. 750–779, set. 1993.

O'CONNELL, E. M.; NUTMAN, T. B. Molecular Diagnostics for Soil-Transmitted Helminths. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 508–513, 7 set. 2016.

OH, C. S. et al. Paleoparasitological report on *Ascaris* aDNA from an ancient East Asian sample. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 225–228, mar. 2010a.

OH, C. S. et al. Amplification and sequencing of *Trichuris trichiura* ancient DNA extracted from archaeological sediments. **Journal of Archaeological Science**, v. 37, n. 6, p. 1269–1273, jun. 2010b.

OH, C. S. et al. Ancient Mitochondrial DNA Analyses of *Ascaris* Eggs Discovered in Coprolites from Joseon Tomb, Ancient Mitochondrial DNA Analyses of *Ascaris* Eggs Discovered in Coprolites from Joseon Tomb. **The Korean Journal of Parasitology, The Korean Journal of Parasitology**, v. 53, n. 2, p. 237–242, 22 abr. 2015.

O'LORCAIN, P.; HOLLAND, C. V. The public health importance of *Ascaris lumbricoides*. **Parasitology**, v. 121 Suppl, p. S51-71, 2000.

OOTA, H. et al. A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 98, n. 2, p. 133–145, 1 out. 1995.

ORTNER, D. Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains. In: **Infectious Diseases: Treponematoses and Other Bacterial Infectious Diseases**. Amsterdam: Academic Press, 2003a. p. 273–323.

ORTNER, D. J. Infectious disease: Tuberculosis and Leprosy. In: ORTNER, D. J. (Ed.). . **Identification of pathological Conditions in human Skeletal Remains**. 2. ed. Academic Press, 2003b.

ORTNER, S. B. Theory in Anthropology since the Sixties. **Comparative Studies in Society and History**, v. 26, n. 01, p. 126, jan. 1984.

PÄÄBO, S. Molecular cloning of Ancient Egyptian mummy DNA. **Nature**, v. 314, n. 6012, p. 644–645, 18 abr. 1985.

PÄÄBO, S.; GIFFORD, J. A.; WILSON, A. C. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 20, p. 9775–9787, 25 out. 1988.

PÄÄBO, S.; IRWIN, D. M.; WILSON, A. C. DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 8, p. 4718–4721, 15 mar. 1990.

PÄÄBO, S.; WILSON, A. C. Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts. **Nature**, v. 334, n. 6181, p. 387–388, 4 ago. 1988.

PAHO. **Iniciativa regional para la eliminación de la transmisión materno-infantil de VIH y de la sífilis.** [s.l.] Organización Panamericana de la Salud, 2009.

PANUEL, M. et al. Radiological differential diagnosis of skeletal tuberculosis. In: PÁLFI, G. et al. (Eds.). **Tuberculosis past and present.** Golden Book Publisher, TB Foundation, 1999. p. 229–235.

PAPA, F. et al. Serological specificity of Mycobacterium tuberculosis glycolipids. **Acta Leprologica**, v. 7 Suppl 1, p. 98–101, 1989.

PARIJA, S. C.; CHIDAMBARAM, M.; MANDAL, J. Epidemiology and clinical features of soil-transmitted helminths. **Tropical Parasitology**, v. 7, n. 2, p. 81–85, 2017.

PECSON, B. M. et al. A Real-Time PCR Method for Quantifying Viable Ascaris Eggs Using the First Internally Transcribed Spacer Region of Ribosomal DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 12, p. 7864–7872, 1 dez. 2006.

PEELING, R. W. et al. Syphilis. **Nature Reviews. Disease Primers**, v. 3, p. 17073, 12 out. 2017.

PENG, R.-R. et al. Molecular Typing of Treponema pallidum: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 11, p. e1273, 8 nov. 2011.

PENG, W. et al. Genetic variation in sympatric Ascaris populations from humans and pigs in China. **Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 355–361, out. 1998.

PENG, W. et al. Molecular epidemiological investigation of Ascaris genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. **Electrophoresis**, v. 24, n. 14, p. 2308–2315, jul. 2003.

PENG, W. et al. Mutation scanning-coupled analysis of haplotypic variability in mitochondrial DNA regions reveals low gene flow between human and porcine Ascaris in endemic regions of China. **ELECTROPHORESIS**, v. 26, n. 22, p. 4317–4326, 1 nov. 2005.

PEREIRA, J. C. M. DA S. **À flor da terra: o cemitério dos pretos novos no Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro: Garamond Universitária : Rio Prefeitura Cultura Arquivo da Cidade, 2007.

PĚTROŠOVÁ, H. et al. Resequencing of Treponema pallidum ssp. pallidum Strains Nichols and SS14: Correction of Sequencing Errors Resulted in Increased Separation of Syphilis Treponeme Subclusters. **PLOS ONE**, v. 8, n. 9, p. e74319, 10 set. 2013.

PHOSUK, I. et al. Molecular Identification of Trichuris suis and Trichuris trichiura Eggs in Human Populations from Thailand, Lao PDR, and Myanmar. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 1, p. 39–44, 2018.

PILLAY, A. et al. Molecular subtyping of Treponema pallidum subspecies pallidum. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 25, n. 8, p. 408–414, set. 1998.

PINILLA, G. et al. Detección de Treponema pallidum subespecie pallidum para el diagnóstico de sífilis congénita mediante reacción en cadena de la polimerasa anidada. **Biomedica: Revista Del Instituto Nacional De Salud**, v. 38, n. 1, p. 128–135, 15 mar. 2018.

POINAR, H. N. et al. Molecular Coproscopy: Dung and Diet of the Extinct Ground Sloth *Nothrotheriops shastensis*. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 402–406, 17 jul. 1998.

POINAR, H. N. et al. Metagenomics to Paleogenomics: Large-Scale Sequencing of Mammoth DNA. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 392–394, 20 jan. 2006.

POWELL, M. L.; COOK, D. C. (EDS.). Treponematoses: inquires into the nature of a protean disease. In: **The myth of syphilis: the natural history of treponematoses in North America**. Ripley P. Bullen series. Gainesville: University Press of Florida, 2005. p. 9–62.

PRADIPTA, I. S. et al. Risk factors of multidrug-resistant tuberculosis: A global systematic review and meta-analysis. **The Journal of Infection**, 16 out. 2018.

PRUVOST, M. et al. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 3, p. 739–744, 16 jan. 2007.

QIAGEN. **QIAamp DNA Stool Mini Kit**, 2019a. Disponível em: <QIAamp DNA Stool Mini Kit Print>. Acesso em: 25 fev. 2019

QIAGEN. **QIAamp DNA Investigator Kit**, 2019b. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/qiaamp-dna-investigator-kit/#orderinginformation>>. Acesso em: 25 fev. 2019

QUILÈS, F.; BALANDIER, J.-Y.; CAPIZZI-BANAS, S. In situ characterisation of a microorganism surface by Raman microspectroscopy: the shell of *Ascaris* eggs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 386, n. 2, p. 249–255, 1 set. 2006.

REINHARD, K. J. et al. Food, parasites, and epidemiological transitions: A broad perspective. **International Journal of Paleopathology**, v. 3, n. 3, p. 150–157, set. 2013.

REQUENA, A. Evidencia de tuberculosis en la América Precolombina. v. 1, p. 141–164, 1945.

REY, L. Conceito ecológico e bioquímico de parasitismo. In: **Parasitologia**. 4ª ed. Guanabara Koogan, 2008a. p. 46–65.

REY, L. *Ascaris lumbricoides* e ascaríase. In: **Parasitologia**. 4. ed. Guanabara Koogan, 2008b. p. 585–597.

REY, L. *Trichuris*, *trichinella* e outros nematóides. In: **Parasitologia**. 4ª ed. Guanabara Koogan, 2008c. p. 676–683.

RIBEIRO, F. **Políticas Tenetehara e Tenetahara na política: Um estudo sobre as estratégias de uma campanha eleitoral direcionada a uma população indígena**. São Paulo University, 2009.

RIEDNER, G. et al. Single-Dose Azithromycin versus Penicillin G Benzathine for the Treatment of Early Syphilis. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 12, p. 1236–1244, 22 set. 2005.

RIVET, P. Relations commerciales precombiennes entre l’Océanie et l’Amérique. In: KOPPERS, W. (Ed.). **Festschrift Publication d’Hommage Offerte au P. W. Schmidt**. Viena, 1928. p. 583–609.

ROBERTS, C. A. Old World tuberculosis: Evidence from human remains with a review of current research and future prospects. **Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)**, v. 95 Suppl 1, p. S117-121, jun. 2015.

ROCHA, G. C. R. DA; SERRA-FREIRE, N. M. Paleoparasitology at “Place d’Armes”, Namur, Belgium: a biostatistics analysis of trichurid eggs between the Old and New World. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 03, p. 70–74, 2009.

RODRIGUES, C. **Lugares dos mortos na cidade dos vivos: tradições e transformações fúnebres no Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, RJ: Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro, Secretaria Municipal de Cultura, Departamento Geral de Documentação e Informação Cultural, Divisão de Editoração, 1997.

ROLLO, F. et al. Analysis of bacterial DNA in skin and muscle of the Tyrolean iceman offers new insight into the mummification process. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 111, n. 2, p. 211–219, fev. 2000.

ROLLO, F. et al. Otzi’s last meals: DNA analysis of the intestinal content of the Neolithic glacier mummy from the Alps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 20, p. 12594–12599, 1 out. 2002.

ROLLO, F. et al. Fine characterization of the Iceman’s mtDNA haplogroup. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 130, n. 4, p. 557–564, ago. 2006.

ROTHSCHILD, B. Infectious Processes around the dawn of Civilization. In: GREENBLATT, C.; SPIGELMAN, M. (Eds.). **Emerging pathogens: the archaeology, ecology, and evolution of infectious disease**. Oxford University Press, 2003. p. 103–116.

ROTHSCHILD, B. M. History of syphilis. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 40, n. 10, p. 1454–1463, 15 maio 2005.

ROTHSCHILD, B. M.; ROTHSCCHILD, C. Treponemal Disease in the New World. **Current Anthropology**, v. 37, n. 3, p. 555–561, 1996.

ROTHSCHILD, B.; ROTHSCCHILD, C. Evolution of osseous/radiologic signs of tuberculosis. In: PÁLFI, G. et al. (Eds.). **Tuberculosis past and present**. Golden Book Publisher Ltd, TB Foundation, 1999. p. 293–298.

RUFFER, M. Note on the presence of Bilharzia haematobia in Egyptian mummies of the Twentieth Dynasty (1250-1000 BC). v. 1, n. 16, 1910.

SADAOW, L. et al. Molecular identification of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* recovered from humans and pigs in Thailand, Lao PDR, and Myanmar. **Parasitology Research**, v. 117, n. 8, p. 2427–2436, ago. 2018.

SALAZAR, J. C. et al. Assessment of the Kinetics of *Treponema pallidum* Dissemination into Blood and Tissues in Experimental Syphilis by Real-Time Quantitative PCR. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 6, p. 2954–2958, jun. 2007.

SALDIVA, S. R. et al. Ascaris-Trichuris association and malnutrition in Brazilian children. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 13, n. 1, p. 89–98, jan. 1999.

SALO, W. L. et al. Identification of Mycobacterium tuberculosis DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 6, p. 2091–2094, 15 mar. 1994.

SANTOS, A. L.; GARDNER, M. T.; ALLSWORTH-JONES, P. Treponematoses in Pre-Columbian Jamaica: a biocultural approach to the human cranium found in Bull Savannah. **Journal of Archaeological Science**, v. 40, n. 1, p. 490–496, jan. 2013.

SANTOS, M. DE L. S. G. et al. Poverty: socioeconomic characterization at tuberculosis. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 15, n. SPE, p. 762–767, out. 2007.

SATO, M. et al. Ascaris lumbricoides found in ashore corpses from Korean peninsula to Japan. **Parasitology International**, v. 70, p. 1–4, 7 jan. 2019.

SCHUENEMANN, V. J. et al. Historic Treponema pallidum genomes from Colonial Mexico retrieved from archaeological remains. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 6, p. e0006447, 21 jun. 2018.

SEO, M. et al. Ancient Soil-Transmitted Parasite Eggs Detected from the Sixth Century Three Kingdom Period Silla Tomb. **Journal of Korean Medical Science**, v. 33, n. 6, 2018.

SHIN, D. H. et al. V-shaped Pits in Regions of Ancient Baekje Kingdom Paleoparasitologically Confirmed as Likely Human-Waste Reservoirs. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 52, n. 5, p. 569–573, 22 out. 2014.

SHIN, D. H. et al. Helicobacter pylori DNA obtained from the stomach specimens of two 17th century Korean mummies. **Anthropologischer Anzeiger**, p. 75–87, 1 fev. 2018.

SIGAUD, J. F. X. Doenças do pulmões - Tísica pulmonar. In: **Do clima e das doenças do Brasil ou estatística médica deste império**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2009a. p. 197–225.

SIGAUD, J. F. X. Das doenças dos índios e da medicina dos jesuítas. In: **Do clima e das doenças do Brasil ou estatística médica deste império**. 22^a ed. Fiocruz, 2009b. p. 108–118.

SIGAUD, J. F. X. Das doenças endêmicas. In: **Do clima e das doenças do Brasil ou estatística médica deste império**. 22^a ed. Fiocruz, 2009c. p. 136–140.

SIGAUD, J. F. X. Das doenças de pele. In: **Do clima e das doenças do Brasil ou estatística médica deste império**. 22^a ed. Fiocruz, 2009d. p. 257–273.

SIGAUD, J. F. X. Da longevidade e da mortalidade. In: **Do clima e das doenças do Brasil ou estatística médica deste império**. Fiocruz, 2009e. p. 303–308.

SIGAUD, J. F. X. Das doenças gerais e especiais. In: **Do clima e das doenças do Brasil ou estatística médica deste império**. 22^a ed. Fiocruz, 2009f. p. 287–292.

SILVA, J. P. DA; MARZOCHI, M. C. DE A.; SANTOS, E. C. L. DOS. Avaliação da contaminação experimental de areias de praias por enteroparasitas: pesquisa de ovos de Helminthos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 7, n. 1, p. 90–99, mar. 1991.

SIMOU, E.; BRITTON, J.; LEONARDI-BEE, J. Alcohol consumption and risk of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease**, v. 22, n. 11, p. 1277–1285, 1 nov. 2018.

ŠMAJS, D.; STROUHAL, M.; KNAUF, S. Genetics of human and animal uncultivable treponemal pathogens. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, v. 61, p. 92–107, 2018.

SMITH, N. H. et al. Myths and misconceptions: the origin and evolution of Mycobacterium tuberculosis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 537–544, jul. 2009.

SOARES DINIZ, E. Convívio e dependência. Os Tenetehara-Guajajara. **Journal de la société des américanistes**, v. 69, n. 1, p. 117–127, 1983.

SØE, M. J. et al. DNA Typing of Ancient Parasite Eggs from Environmental Samples Identifies Human and Animal Worm Infections in Viking-Age Settlement. **Journal of Parasitology**, v. 101, n. 1, p. 57–63, fev. 2015.

SØE, M. J. et al. Ancient DNA from latrines in Northern Europe and the Middle East (500 BC–1700 AD) reveals past parasites and diet. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195481, 25 abr. 2018.

SOPER, F. L. THE REPORT OF A NEARLY PURE ANCYLOSTOMA DUODENALE INFESTATION IN NATIVE SOUTH AMERICAN INDIANS AND A DISCUSSION OF ITS ETHNOLOGICAL SIGNIFICANCE. **American Journal of Epidemiology**, v. 7, n. 2, p. 174–184, 1 mar. 1927.

SPIGELMAN, M.; LEMMA, E. The use of the polymerase chain reaction (PCR) to detect Mycobacterium tuberculosis in ancient skeletons. **International Journal of Osteoarchaeology**, v. 3, n. 2, p. 137–143, 1 jun. 1993.

SREEVATSAN, S. et al. Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 18, p. 9869–9874, 2 set. 1997.

STEAD, W. W. et al. When did Mycobacterium tuberculosis infection first occur in the New World? An important question with public health implications. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, n. 4, p. 1267–1268, abr. 1995.

SUN, J. et al. Tracing the origin of Treponema pallidum in China using next-generation sequencing. **Oncotarget**, v. 7, n. 28, p. 42904–42918, 17 jun. 2016.

SUPPLY, P. et al. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of Mycobacterium tuberculosis. **Nature Genetics**, v. 45, n. 2, p. 172–179, fev. 2013.

SUZUKI, K. et al. Paleopathological evidence and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from archaeological skeletal remains of Nabe-kaburi (head-covered with iron pots) burials in Japan. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88356, 2014.

TAKATA, I. Experimental infection of man with *Ascaris* of man and the pig. **The Kitasato Archives of Experimental Medicine**, v. 23, n. 4, p. 151–159; English transl, 49–59, mar. 1951.

TAYLOR, G. M.; YOUNG, D. B.; MAYS, S. A. Genotypic analysis of the earliest known prehistoric case of tuberculosis in Britain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2236–2240, maio 2005.

TAYLOR, M. G. et al. DNA from *Mycobacterium tuberculosis* Identified in Mediaeval Human Skeletal Remains Using Polymerase Chain Reaction. **Journal of Archaeological Science**, v. 23, n. 5, p. 789–798, set. 1996.

TITO, R. Y. et al. Insights from Characterizing Extinct Human Gut Microbiomes. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51146, 12 dez. 2012.

TSOLAKI, A. G. et al. Genomic Deletions Classify the Beijing/W Strains as a Distinct Genetic Lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3185–3191, 1 jul. 2005.

TULLI, S. M. General principles of osteoarticular tuberculosis. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 398, p. 11–19, maio 2002.

TURNER, T. B.; HOLLANDER, D. H. Biology of the treponematoses based on studies carried out at the International Treponematoses Laboratory Center of the Johns Hopkins University under the auspices of the World Health Organization. **Monograph Series. World Health Organization**, n. 35, p. 3–266, 1957.

VALLE, M. B. et al. Trends of *Mycobacterium bovis* Isolation and First-Line Anti-tuberculosis Drug Susceptibility Profile: A Fifteen-Year Laboratory-Based Surveillance. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004124, 30 set. 2015.

VAN EMBDEN, J. D. et al. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 9, p. 2393–2401, maio 2000.

VAN SOOLINGEN, D. et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1236–1245, out. 1997.

VAN SOOLINGEN, D. et al. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1840–1845, jul. 1998.

VARGA, I. VAN D. A insustentável leveza do estado: devastação, genocídio, doenças e miséria nas fronteiras contemporâneas da Amazônia, no Maranhão. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 1, p. 85–100, 2008.

VAULET, L. G. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* isolates from Buenos Aires, Argentina: Frequent Nichols-like isolates and low levels of macrolide resistance. **PLOS ONE**, v. 12, n. 2, p. e0172905, 24 fev. 2017.

VERWEIJ, J. J. Application of PCR-based methods for diagnosis of intestinal parasitic infections in the clinical laboratory. **Parasitology**, v. 141, n. 14, p. 1863–1872, dez. 2014.

VLAMINCK, J. et al. Community Rates of IgG4 Antibodies to *Ascaris* Haemoglobin Reflect Changes in Community Egg Loads Following Mass Drug Administration. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004532, 18 mar. 2016.

VON HUNNIUS, T. E. et al. Digging deeper into the limits of ancient DNA research on syphilis. **Journal of Archaeological Science**, v. 34, n. 12, p. 2091–2100, dez. 2007.

WAGLEY, C.; GALVÃO, E. **The Tenetehara Indians of Brazil: A culture in Transition**. New York: AMS Press, 1949.

WALKER, D. et al. Evidence of skeletal treponematoses from the medieval burial ground of St. Mary Spital, London, and implications for the origins of the disease in Europe. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 156, n. 1, p. 90–101, jan. 2015.

WENHAI, L.; JIANZHONG, Z.; CAO, Y. Detection of *Treponema pallidum* in skin lesions of secondary syphilis and characterization of the inflammatory infiltrate. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, v. 208, n. 2, p. 94–97, 2004.

WHO. **Neglected tropical diseases - WHO renews efforts to achieve global eradication of yaws by 2020**, 2012. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/yaws_azithromycin_2012/en/>. Acesso em: 12 mar. 2012

WHO. **The End TB Strategy. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015**, 2015. Disponível em: <https://www.who.int/tb/strategy/End_TB_Strategy.pdf?ua=1>. Acesso em: 12 jan. 2019

WHO. **GLOBAL HEALTH SECTOR STRATEGY ON SEXUALLY TRANSMITTED INFECTIONS 2016–2021**. 2016 Disponível em: <https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14869:sti-syphilis&Itemid=3670&lang=en>.

WHO. **Global tuberculosis report 2018**.

WHO. **Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiases: numbers of people treated in 2017**. Disponível em: <https://www.who.int/neglected_diseases/resources/who_wer9350/en/>. Acesso em: 26 fev. 2019b.

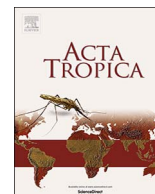
WHO. **Biologicals - BCG vaccine**. Disponível em: <<https://www.who.int/biologicals/areas/vaccines/bcg/en/>>. Acesso em: 9 fev. 2019a.

- WHO. **Yaws eradication - Epidemiological situation**, 2019b. Disponível em: <<https://www.who.int/yaws/epidemiology/en/>>. Acesso em: 12 mar. 2019
- WILBUR, A. K. et al. Diet, tuberculosis, and the paleopathological record. **Current Anthropology**, v. 49, n. 6, p. 963–977; discussion 977-991, dez. 2008.
- WILBUR, A. K. et al. Deficiencies and challenges in the study of ancient tuberculosis DNA. **Journal of Archaeological Science**, v. 36, n. 9, p. 1990–1997, 1 set. 2009.
- WILLIAMS, F. S. et al. Intestinal parasites from the 2nd-5th century AD latrine in the Roman Baths at Sagalassos (Turkey). **International Journal of Paleopathology**, v. 19, p. 37–42, 2017.
- WIRTH, T. et al. Origin, spread and demography of the Mycobacterium tuberculosis complex. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 9, p. e1000160, 19 set. 2008.
- WOOD, J. W. et al. The Osteological Paradox: Problems of Inferring Prehistoric Health from Skeletal Samples [and Comments and Reply]. **Current Anthropology**, v. 33, n. 4, p. 343–370, 1992.
- WRIGHT, J. E. et al. Current epidemiological evidence for predisposition to high or low intensity human helminth infection: a systematic review. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 65, 31 jan. 2018.
- XIE, Y. et al. Complete Mitochondrial Genomes of Chimpanzee- and Gibbon-Derived Ascaris Isolated from a Zoological Garden in Southwest China. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e82795, 17 dez. 2013.
- YOSHIDA, A. et al. Optimal ELISA antigen for the diagnosis of Ascaris suum infection in humans. **Parasitology Research**, v. 115, n. 12, p. 4701–4705, 1 dez. 2016.
- ZHOU, C. et al. Pig Ascaris: An important source of human ascariasis in China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1172–1177, 1 ago. 2012.
- ZHOU, C. et al. Genetic Diversity of Ascaris in China Assessed Using Simple Sequence Repeat Markers. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 56, n. 2, p. 175–181, abr. 2018.
- ZHU, X. et al. Characterisation of Ascaris from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 3, p. 469–478, mar. 1999.
- ZINK, A. et al. Genomic Correlates of Atherosclerosis in Ancient Humans. **Global Heart**, v. 9, n. 2, p. 203–209, jun. 2014.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica

New paleoparasitological investigations from the pre-inca to hispanic contact period in northern Chile



Mônica Vieira de Souza^{a,b}, Lucélia Guedes Ribeiro da Silva^b, Verónica Silva-Pinto^{c,d},
Pablo Mendez-Quiros^e, Sergio Augusto de Miranda Chaves^f, Alena Mayo Iñiguez^{b,*}

^a Laboratório de Paleoparasitologia, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fundação Oswaldo Cruz (DENSP/ENSP/FIOCRUZ), Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, 21041-210, Brazil

^b LABTRIP, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro, RJ, 21040-900, Brazil

^c Área de Antropología, Museo Nacional de Historia Natural, Casilla 787 Santiago de Chile, Chile

^d Department of Human Evolution, Max Planck Institute for Evolutionary Anthropology, Deutscher Platz 6, Leipzig, Germany

^e Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Prehistoria, Programa de Doctorado en Arqueología Prehistórica, Spain

^f Laboratório de Ecologia da Escola Nacional de Saúde Pública da FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões 1480, térreo-Manguinhos, 21041-210 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Paleoparasitology
Paleobotany
Helminth
Coprolite
Micro-remains
Inca empire

ABSTRACT

Paleoparasitological studies have demonstrated that changes in environment or culture are reflected in the patterns of parasitic infection diseases in populations worldwide. The advent of agriculture and animal domestication, with its accompanying reduction in human mobility and expanding population involves changes in or emergence of, parasites, the so-called first epidemiological transition. Cultural processes related to territory occupation contribute to both loss and acquisition of parasites. The archaeological site Lluta 57 in the Lluta Valley, Chile, provides a chronology of the transition from the pre-Inca or Late Intermediate Period (LIP), through the Late or Inca Period (LP), to the Hispanic Contact Period (HCP), providing the possibility of evaluating this epidemiological transition. The aim of this study was to conduct a paleoparasitological investigation of to gain insight into the dynamics of parasitism in Lluta people throughout the Inca expansion. Fourteen human coprolites from the three periods were rehydrated, submitted to spontaneous sedimentation, and examined by light microscopy for the presence of intestinal parasite eggs, pollen grains, and micro-remains. Eggs of four parasites: *Enterobius vermicularis*, *Trichostrongylus* sp., *Trichuris* sp., and *Eimeria macusaniensis* were recovered. Frequency, diversity, and number of parasite eggs per sample increased over the studied time period. *Trichostrongylus* sp. and *E. macusaniensis* were recorded in the region for the first time. *Enterobius vermicularis* eggs, absent in the LIP, were present as a hyper-infection in LP. The presence of *E. macusaniensis* is likely related to exploitation of llamas, which were used for food and transport and as sacrificial offerings. The paleobotanical analysis revealed ten families of pollen grains, as well as phytoliths and floral remains. In contrast to parasitological results, a diachronic pattern was not detected. Evolution of the settlements, with the advent of larger, more densely populated, villages, could have influenced the emergence and intensification of transmission of parasites in the region. The study showed that the Inca expansion influenced host-parasite-environment relationships in the Lluta Valley.

1. Introduction

Since the emergence of paleoparasitology, the study of parasites in archaeological or paleontological material has clarified many aspects of the origin and evolution of parasites (Araújo et al., 2003; Ferreira et al., 2011; Reinhard, 1990). The host-parasite-environment relationship is directly influenced by culture and behaviors, including diet and hygiene practices, factors that have molded the emergence of parasitic

infections (Hugot et al., 1999; Jaeger and Iñiguez, 2014; Reinhard 1992).

Cockburn (1971) postulated that changes in environment and culture are reflected in the patterns of infection diseases of the population. In particular, the advent of agriculture and animal domestication, involving reduction in human mobility, and the increase in population (Cockburn, 1971) are reflected in intensification and/or changes in human parasite infections, the so-called first epidemiological transition

* Corresponding author.

E-mail addresses: lucelia.fiocruz@gmail.com (L.G.R. da Silva), veronica.silva@mnhn.cl (V. Silva-Pinto), mendez.quiros@gmail.com (P. Mendez-Quiros), sdemirandachaves8@gmail.com (S.A. de Miranda Chaves), alenainguez@gmail.com, alena@ioc.fiocruz.br (A.M. Iñiguez).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.11.021>

Received 18 July 2017; Received in revised form 15 November 2017; Accepted 26 November 2017

Available online 27 November 2017

0001-706X/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Barret et al., 1998). In contrast to findings of the Old World, paleoparasitological studies in the Americas have not clearly demonstrated the strength of the first epidemiological transition (Reinhard et al., 2013) in the emergence and increase of parasitic infection, with three exceptions, which include the Inca expansion in Lluta Valley, Chile (Santoro et al., 2003).

During the pre-Inca or Late Intermediate Period (LIP) (1200–1400 CE), in the Lluta Valley, settlement reflected a segmented egalitarian society defined by interdependent communities with non-state political organization. During the LIP, the economy of these communities focused on agriculture, but foods and other products were available from nearby coastal areas and highlands through exchange. In the XV century, the Inca State began to expand in the area, defining the Inca or Late period (LP) (1400–1530 CE). A century under Inca influence brought changes to the way of life as a consequence of social and economic reorganization, resulting in political integration.

The first decades after the Hispanic conquest and the Inca State collapse (1530–1600 CE) represent the Hispanic contact period (HCP). During the HCP, the Inca pre-Hispanic lifestyle continued with little Hispanic influence in the rural areas, until people abandoned the ancient hamlets and villages.

An earlier paleoparasitological study evaluated the impact of the Inca Empire (Quechua: Tawantinsuyu) expansion on diet and health in the Lluta Valley (Santoro et al., 2003) and an increase of intestinal parasites from the LIP to LP related to changes in social and cultural changes was reported. Two helminths were important in this period: *Enterobius vermicularis* (pinworm) and *Adenocephalus pacificus* (syn *Diphyllobothrium pacificum*) (fish tapeworm) reported in 21% and 4%, respectively, of LP samples, contrasting with absence in LIP settlements. The authors suggested that the emergence and increase in prevalence of *Enterobius vermicularis* since the LP is an indicator and consequence of crowded villages. After the arrival of the Incas, the population experienced significant changes in community structure and gained access to a wider variety of foods. During the LP, patterns of infection and transmission of parasites were strongly influenced by growth of small settlements into larger, more densely populated, villages.

The diet composition of population subgroups from the Molle Pampa Este/Medio archaeological sites, Lluta Valley, established by isotope analysis, did not differ between the LIP and LP, consisting primarily of terrestrial plants, marine meat, and a small contribution of terrestrial meat (Aufderheide and Santoro 1999). Archaeological excavation of domestic structures determined that Molle Pampa Este was primarily occupied during the LP, while Molle Pampa Medio was exclusively occupied in the LIP. No evidence of differences in diet of the two subgroups was found. Dorsey-Vinton et al. (2009), evaluated the dietary changes during the expansion of the Inca State in Lluta Valley, using starch analysis. The high consumption of maize in LIP declined in LP, when tubers were introduced into the Lluta valley communities, probably due to a tax on maize production by the Inca. This would have led to a dramatic difference in diet in the two periods.

In this study, we present a paleoparasitological and paleobotanical investigation of human coprolites collected from the Lluta 57 site, a Pre-Hispanic village of the Lluta Valley. This archaeological site represents a chronology of the transition from the pre-Inca, through the Inca, to the Hispanic Contact Period, providing the potential to evaluate the impact of the first paleo-epidemiological transition and to gain insight into the dynamics of parasitic infections following the Inca expansion.

2. Materials and methods

2.1. Study site

The Lluta 57 archaeological site is located in the hydrographic basin of the Lluta Valley, Arica, Northern Chile (18.4° S) of length exceeding 150 km. The site is dated from 1268 to 1624 cal AD, corresponding to the prehistoric periods (Mendez-Quiros and Silva-Pinto, 2015): the LIP

from 1268 to 1431 CE, and the LP, from 1428 CE plus a brief span of historic time encompassing the incorporation of the territory into the Inca Empire (HCP) (Dorsey-Vinton et al., 2009).

Late Intermediate Period settlements were characterized by dwellings on slopes, scattered villages, and exchange with coastal and highland communities. According to Santoro et al. (2000), the LP was distinguished by settlement in large communities and villages, changes in house construction technology, and extensive agricultural production. The Lluta 57 site represents a large village specializing in maize production and husbandry of camelids and *Cavia porcellus*, elements strongly represented in the archaeological site. Lluta 57 has a large cemetery with several sets of burials distributed throughout the area, including orthogonal cist graves, cairn burials, simple burials, and a single possible *chullpa*, a funerary tower (Mendez-Quiros and Silva-Pinto, 2015).

The Lluta River drains the region, producing several areas of arable soils and native vegetation in the Atacama Desert (Mendez-Quiros and Silva-Pinto, 2015; Santoro et al., 2003). The food resources of the region is the foundation of a long history of human occupation in pre-historic times, from the Chinchorro hunter-gatherers (Archaic Period) to the Inca agriculturalists, in diverse ecosystems (Santoro et al., 2003).

2.2. Paleoparasitological and paleobotanical analyses

Fourteen coprolites collected from Lluta site 57 were examined for the presence of intestinal parasite eggs, pollen grains, and micro-remains (Table 1). Coprolites were collected from the domestic areas of the site, except one (CH03) taken from a burial. Based on calibrated radiocarbon dating, four coprolites were from LIP, five from LP, and four from HCP (Table 1). Sample CH03 could not be dated. Coprolites were catalogued and processed individually in the Paleogenetic Laboratory (LABTRIP/IOC/FIOCRUZ, Brazil) using LABTRIP standard procedures to avoid modern contamination, degradation, and cross-contamination as described elsewhere (Iñiguez, 2011; Jaeger and Iñiguez, 2014). The surface of the coprolites was removed, and samples were irradiated with UV light as described by Iñiguez et al. (2003, 2006). A 2 g sample of each coprolite was separately rehydrated for 72 h in an aqueous solution of 0.5% trisodium phosphate (Callen and Cameron, 1960). After rehydration, the samples were submitted to spontaneous sedimentation (Lutz, 1919). Microscope slides were loaded with 20 µL each of sediment and glycerin under a cover slip and sealed. Twenty slides of each sample were examined by light microscopy at 100 x and 400 x as recommended by Araújo et al. (1998). Parasite eggs were photographed and measured using Image Pro™ software, and their dimensions and morphology were compared with the literature to identify to the lowest possible taxon. Micro-remain identification was based on Chaves (1996).

3. Results

3.1. Paleoparasitological identification

The human origin of Lluta 57 coprolites was determined based on size, morphology, color, and location in the archaeological site (Jouy-Avantin, 2003; Sutton et al., 2006). Findings of human-specific *E. vermicularis* eggs also confirmed the origin of some samples. The parasites from the 14 coprolites included eggs of three helminths and cysts of one protozoan (Table 1; Fig. 1).

Twenty-seven oxyurid eggs were found (Fig. 1a) in samples from the LP and HCP. The eggs were ovoid and asymmetrically flattened and measured 58.56–62.96 µm in length ($60.19 \pm 1.79 \mu\text{m}$; $n = 27$) and 28.31–35.34 µm in width ($31.97 \pm 2.26 \mu\text{m}$; $n = 27$), characteristics consistent with *Enterobius vermicularis* L., 1758, which measure (50–60 × 20–30 µm) (Roberts and Janovy, 2008).

Four trichurid nematode eggs, having characteristics consistent with *Trichuris* sp. Roederer 1761, were found in a sample from the HCP

Table 1
Paleoparasitological results of human coprolites collected from the archaeological site Lluta 57, Arica, Chile.

Period	Coprolites		Parasites eggs	n	Measurements						
	Level	Layer			Length (µm)			Width (µm)			
					Range	Mean	SD	Range	Mean	SD	
LIP	CH02	4	5	Negative	–	–	–	–	–	–	–
LIP	CH07	3	3	<i>Trichostrongylus</i> sp.	1	87.23	–	–	39.17	–	–
LIP	CH14	–	88	Negative	–	–	–	–	–	–	–
LIP	CH15	3	4	Negative	–	–	–	–	–	–	–
LIP or LP	CH03	–	Rec sup	Negative	–	–	–	–	–	–	–
LP	CH04	10	8	Negative	–	–	–	–	–	–	–
LP	CH06	12	11	<i>Eimeria macusaniensis</i>	1	92	–	–	67	–	–
LP	CH08	9	7	<i>Enterobius vermicularis</i>	1	63.43	–	–	33.76	–	–
LP	CH09	1	5	Negative	–	–	–	–	–	–	–
LP	CH10	7	2	<i>Enterobius vermicularis</i>	10	58.87–63.41	60.14	60.14 ± 1.44	28.31–34.65	31.42	31.42 ± 2.63
HCP	CH05	9	6	<i>Trichostrongylus</i> sp.	7	89.56–91.19	90.11	90.11 ± 0.94	33.44–38.3	35.36	35.36 ± 2.59
HCP	CH11	15	6	Negative	–	–	–	–	–	–	–
HCP	CH12	11	6	<i>Enterobius vermicularis</i>	16	58.56–62.96	60.02	60.02 ± 1.90	29.33–35.34	32.20	32.20 ± 2.06
HCP	CH13	11	6	<i>Trichuris</i> sp.	4	59.41–74.92	68.55	68.55 ± 8.54	34.03–42.14	37.74	37.74 ± 3.55

(Fig. 1b). The identification of *Trichuris* sp. eggs was based on the lemon shape with prominent polar plugs and absence of ornamentation on the surface (Roberts and Janovy, 2008). No content was observed in the *Trichuris* sp. eggs, and only one exhibited polar plugs (Fig. 1B). Eggs

were 59.41–74.92 µm in length and 34.03–42.14 µm in width (Table 1). *Trichuris* sp. eggs were of mean length 68.55 ± 8.54 (n = 4) and mean width 37.74 ± 3.55 (n = 4) (Table 1), suggestive of *Trichuris trichiura* (Yoshikawa et al., 1989; Confalonieri et al., 1988). This identification

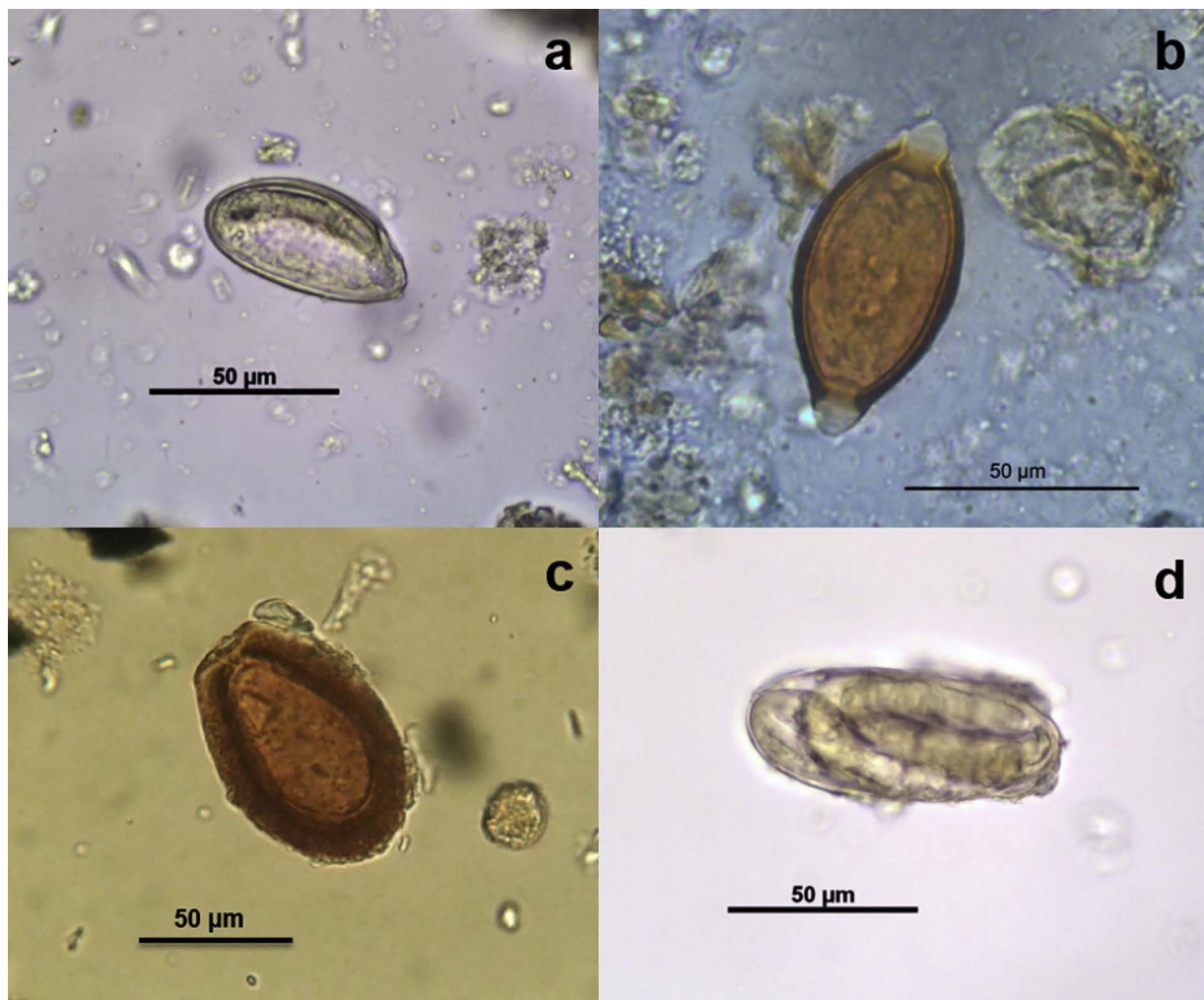


Fig. 1. Intestinal parasites in human coprolites from Lluta 57 archaeological site, Arica, Chile. a. *Enterobius vermicularis*; b. *Trichuris* sp.; c. *Eimeria macusaniensis*; d. *Trichostrongylus* sp. 40x.

was reinforced by the finding of *E. vermicularis*, a human-specific parasite, at the same level and archaeological layer as these eggs (Table 1). However, *Trichuris* species that infect camelids, such as *T. tenuis*, of size ($64 \times 32 \mu\text{m}$) (Foreyt and Foreyt, 2001) comparable to those found in this study, cannot be ruled out.

One eimerid protozoan oocyst was identified as *Eimeria macusaniensis* (Fig. 1c), based on its piriform shape and thick wall, measuring $92 \times 67 \mu\text{m}$, characteristic of this species [$93.6 (81\text{--}107) \times 67.4 \mu\text{m} (61\text{--}80)$] [36]. Differential diagnosis included *Eimeria ivitaensis*, which has also been identified in camelids from South America (Cafrune et al., 2009) and is of similar length, $88.8 \mu\text{m}$ ($83.5\text{--}98.6$). However, the oocysts of this species are ellipsoidal, thin walled, and with a mean width of $51.8 \mu\text{m}$ ($49.3\text{--}59.1$) (Leguía and Casas, 1998), so can be rejected (Fig. 2).

Two samples contained nematode eggs that were translucent and thin shelled as well as larvae morphologically and morphometrically consistent with Trichostrongylidae, probably *Trichostrongylus* Looss 1905 (Fig. 1d). This genus infects humans (Roberts and Janovy, 2008; Silveira et al., 1974) and has been found in human coprolites of the Americas. We cannot rule out the possibility that the eggs could be from *Ostertagia* or *Haemonchus*, since it is not possible to differentiate the eggs of these three genera (Silveira et al., 1974). There are no reports of *Ostertagia* or *Haemonchus* presence in human coprolites or feces. The eggs were $87.23\text{--}91.19 \mu\text{m}$ in length (89.39 ± 1.63 ; $n = 4$) and $28.31\text{--}34.65 \mu\text{m}$ in width (36.31 ± 1.63 ; $n = 4$).

3.2. Frequency and diversity of parasites with respect to chronology

Three samples were positive for *E. vermicularis* eggs, two for

Trichostrongylus sp. eggs, one for *T. trichiura* eggs, and one was positive for *E. macusaniensis* eggs. One of four LIP samples was positive (one parasite species), and six of nine samples were infected after the LIP (four species). In the LP and HCP, three of five (two species) and three of four (3 species) samples were parasitized, respectively, showing an increase in parasite frequency and diversity from the LP to the HCP, albeit in a small sample. A chronological increase was also observed in egg numbers (Table 1). *Enterobius vermicularis* was absent in the LIP samples, 1–10 eggs were found in LP samples, and 16 in the single HCP sample. The number of *Trichostrongylus* sp. eggs increased from one in the LIP to seven in a sample from the HCP.

3.3. Paleobotanical results

Micro-remains, including pollen grains, were found in all but one coprolite (Table 2). In general, the samples had a low occurrence of pollen grains. Sample CH11 was the most diverse, with more than 200 pollen grains from Onagraceae (*Oenothera*-type), Fabaceae, Chenopodiaceae, Poaceae, Malvaceae, Umbelliferae, Euphorbiaceae (*Euphorbia* sp.), and Asteraceae. Plant residues such as tracheids, phytolith, and floral parts were identified, with no observable pattern among samples or historic periods. Floral remains were most abundant in LP samples CH06 and CH08. All observed phytoliths were from the family Poaceae, although no maize pollen grains were observed (Table 2). A diachronic pattern in the diet was not observed.

4. Discussion

Pinworms are directly influenced by human behavior, adapting to

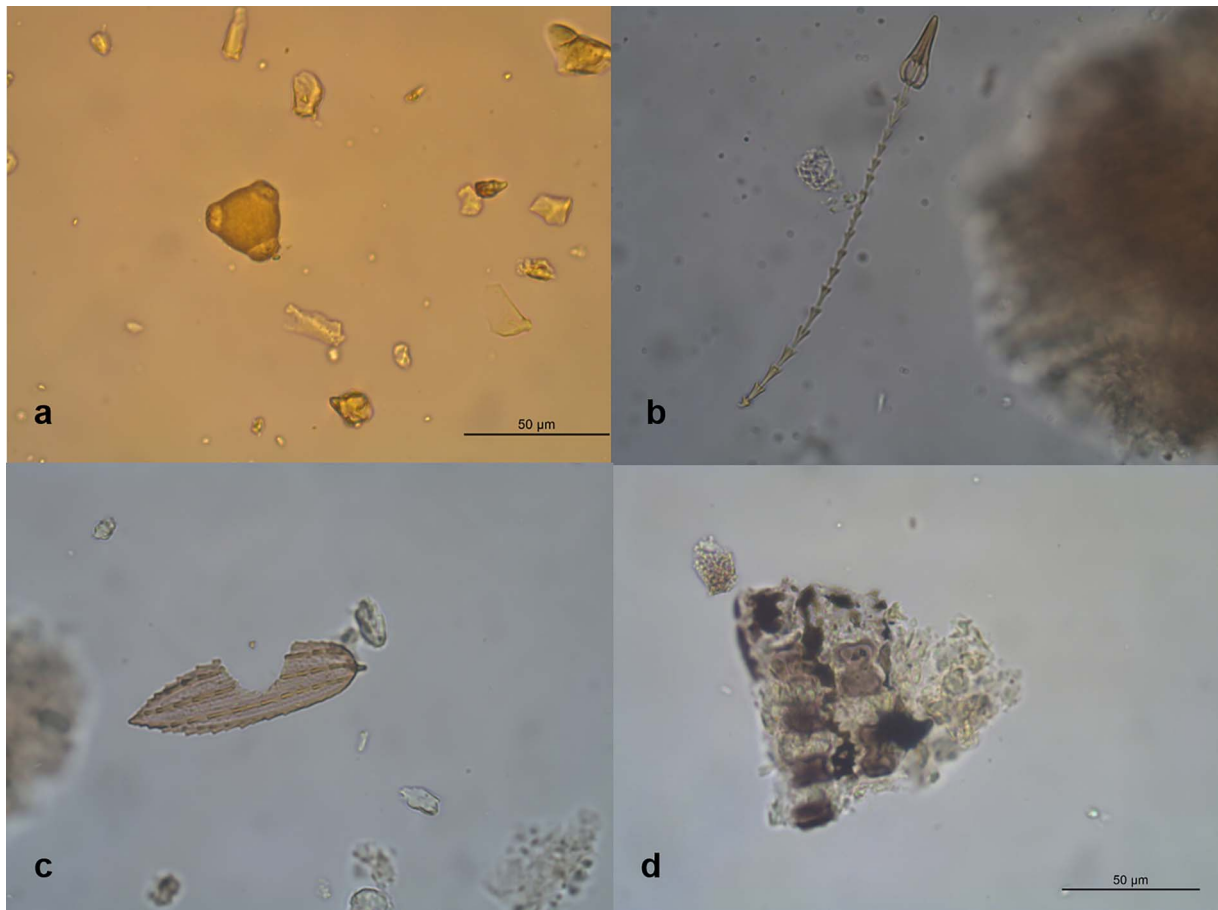


Fig. 2. Food particles and micro-remains found in 14 human coprolites from Lluta 57 archaeological site, Arica, Chile. a-pollen grain from *Oenothera*-type; b and c- floral remains; d- phytolith from Poaceae.

Table 2

Diet and microremains results of human coprolites collected from the archaeological site Lluta 57, Arica, Chile.

Period	Coprolites	Paleoparasitological results	Pollen Grains	Microremains
LIP	CH02	Negative	–	Floral remains, acari
LIP	CH07	<i>Trichostrongylus</i> sp.	Chenopodiaceae	Tracheids
LIP	CH14	Negative	–	–
LIP	CH15	Negative	Poaceae	Tracheids
LIP or LP	CH03	Negative	–	Floral remains phytoliths,
LP	CH04	Negative	Fabaceae	Phytoliths, tracheids
LP	CH06	<i>Eimeria macusaniensis</i>	Urticaceae	Floral remains
LP	CH08	<i>Enterobius vermicularis</i>	Poaceae	Floral remains, tracheids
LP	CH09	Negative	–	Phytoliths, tracheids
LP	CH10	<i>Enterobius vermicularis</i>	Fabaceae	Tracheids
HCP	CH05	<i>Trichostrongylus</i> sp.	Fabaceae	Tracheids
HCP	CH11	Negative	Onagraceae (<i>Oenothera</i> -type) Papiilonaceae, Chenopodiaceae, Poaceae, Malvaceae, Umbelliferae, Euphorbiaceae (<i>Euphorbia</i> sp.), Asteraceae	–
HCP	CH12	<i>Enterobius vermicularis</i>	–	Phytoliths, tracheids
HCP	CH13	<i>Trichuris</i> sp.	Poaceae	Phytoliths, tracheids

changes imposed by their host in their macro-environment (Ferreira et al., 1989, 2011; Reinhard, 1990). Paleoparasitological records of *E. vermicularis* date it to 10,000 years ago in North America (Fry and Moore, 1969). *Enterobius vermicularis* eggs were more frequent in samples from the LP. This was similar to findings of Santoro et al. (2000), who interpreted it as a consequence of transition from living in isolated hamlets to larger, more densely populated, villages. In small and dispersed human groups, the frequency of infection by pinworms remains low (Hugot et al., 1999; Reinhard, 1992; Reinhard et al., 1997). The increase or decrease of parasite infection rates is affected by interactions of their host with the environment. In contrast to that of other helminths, *E. vermicularis* transmission is not influenced by soil temperature and humidity (Araújo and Ferreira, 1995; Ferreira et al., 1989; Reinhard, 1990).

In Lluta 57, 21% of analyzed coprolites of the LP and HCP were positive for *E. vermicularis*. A similar rate was found in LP coprolites in a previous paleoparasitological study of the Lluta Valley, which also reported no pinworm eggs in LIP coprolites (Santoro et al., 2003). The authors stated that 21% *E. vermicularis* prevalence could be considered a pinworm hyper-infection. Pinworms are transmitted by direct person-to-person contact, by retro-infection, and through air-borne environmental contamination. Overcrowding facilitates transmission and, consequently, increases prevalence (Hugot et al., 1999; Reinhard, 1992; Reinhard et al., 1997; Santoro et al., 2003). The numbers of *E. vermicularis* eggs found increased chronologically in Lluta Valley, suggesting development of an environment suitable for transmission. Since females release eggs onto the perianal area of the host, *E. vermicularis* eggs are not usually observed in feces or coprolites, even using parasitological enrichment techniques (Jaeger and Iñiguez, 2014). Only 5–10% of eggs are revealed in conventional stool examinations (Rey, 2008; Roberts and Janovy, 2008). Our results reinforced the scenario of an *E. vermicularis* hyper-infection in the Lluta Valley population during the LP. In South America, paleoparasitological data has mostly demonstrated absence or low frequency of pinworms. The exception is the early-pastoralist Tulán 54 site in northern Chile, with the extraordinary prevalence of 65–69% (Ferreira et al., 1989; Iñiguez et al., 2003), and interestingly, circulation of a unique *E. vermicularis* genotype (Iñiguez et al., 2006).

The second helminth of importance in the Atacama coastal region commonly found in coprolites, *Adenocephalus pacificus* (syn. *Diphyllobothrium pacificum*), is acquired by consumption of raw or undercooked fish. This helminth has usually been found in Pre-Columbian samples, and, in the Lluta Valley, Santoro et al. (2000) reported it only in the LP at low prevalence (4%). In this study of the Lluta 57 site, *A. pacificus* was absent, possibly reflecting low fish consumption relative to other sites in the Lluta Valley, or fish preparation may have eliminated the parasite cyst. Tapeworm infection has been reported in LIP

sites of the Chiribaya culture, Peru (Martinson et al., 2003). However, the high number of *A. pacificus*-positive coprolites in two Chiribaya archaeological sites, as well as results showing high marine product consumption, contrasted with rare findings in the Chiribaya Alta site. The data were interpreted as reflecting reduced reliance on fish and/or fish handling practices that prevented parasite transmission.

Eggs of *Trichuris trichiura* are slightly smaller (Rey, 2008; Sloss and Kemp 1978) than those found in the present study, but according to Yoshikawa et al. (1989), there is a large variation in egg size over the developmental period. Therefore, we can not rule out this species. Furthermore, *T. trichiura* are distributed worldwide, and appear in paleoparasitological records of both the Old and the New World, having originated in the ancestral pre-hominid (Ferreira et al., 2011; Gonçalves et al., 2003). Santoro et al. (2000) demonstrated *T. trichiura* presence in the Lluta Valley at low prevalence in both LP (8%) and LIP (7%). The authors suggested that this helminth infection was not affected by social and cultural changes in the region. In Lluta 57, we found only one sample positive for *T. trichiura* in the LP. Since infection by *T. trichiura* is strongly related to poor sanitary conditions, the increase in population density imposed by the Inca system may have brought about a decline in sanitation and hygiene, contributing to parasite transmission.

Trichuris tenuis, found in camelids, with eggs $64 \times 32 \mu\text{m}$, cannot be ruled out (Foreyt and Foreyt, 2001) and may be supported by the strong relationship of the Lluta Valley inhabitants with camelids and the finding of a camelid-specific parasite, *E. macusaniensis*. A *Trichuris* sp. from cervids, found in coprolites from northeastern Brazil, can also be considered, since it is of similar size ($53.28\text{--}69.93 \times 29.97\text{--}36.63 \mu\text{m}$), despite the difference in the thickness of the egg shell (Sianto et al., 2012). This size of the eggs observed in the present study is also consistent with *Trichuris suis* ($71.2 \times 46.6 \mu\text{m}$) (Beer 1976), but this possibility was rejected, since its natural host is the domestic pig *Sus scrofa domestica*, which has no records in the region during the early HCP. Eggs of *Trichuris muris* in rodents are slightly larger than those found in this study ($83.0\text{--}63.7 \times 38.7\text{--}31.3 \mu\text{m}$) (Koyama 2013), and the morphology differs, especially in the opening of the plugs. In addition, food remains indicating the consumption of rodents, or other evidence of these animals, were not observed in the site.

The oocyst of *E. macusaniensis*, a parasite of camelids, is an interesting find in Lluta 57. *Eimeria macusaniensis* was reported in mummified llamas of the Chiribaya culture from southern Peru (Leguía and Casas, 1999). In the Patagonian region, Beltrame et al. (2010) and Fugassa et al. (2010) reported the parasite in three of four human coprolites analyzed in the Cerro Casa de Piedra (CCP) site, Argentina. Most recently, oocysts of *E. macusaniensis* were described by Valenzuela et al. (2015) in camelid coprolites from the CCP site dating from 9600 to 3400 BP. *Eimeria macusaniensis* was found in Argentina and Peru by Leguía et al. (1998) and Fugassa (2007). These studies demonstrated

that the parasite has followed the host dispersion through South America since ancient times. This study represents the first record of *E. macusaniensis* in Chile. In the Andes, camelids constitute a high proportion of the diet, with animals housed near, or even in, homes, indicative of a close relationship with humans (Valenzuela et al., 2015). Camelids were traditionally an important protein source and means of transportation, with llama cargo caravans used to transport goods from the lowlands to the highlands. Camelids were killed for domestic consumption and as offerings in ceremonies (Aufderheide and Santoro, 1999; Santoro, 1995). Consumption of undercooked viscera is the most probable explanation for *E. macusaniensis* presence in humans; intestine of camelid is a traditional food in Andean region. However, soil, water, or food contamination cannot be ruled out. In any case, the possibility of a true human infection should be rejected, since *E. macusaniensis* is a strict parasite of camelids (Santoro, 1995).

Trichostrongylus sp. eggs have been observed in human coprolites collected only from archaeological sites in the New World, with the oldest, dating from 6800 to 4800 BP, reported in Utah, USA. *Trichostrongylus* sp. are commonly present in the small intestine of all classes of vertebrates, especially ruminants, causing economic losses. The infection in humans is associated with diet and the presence of moist soil favorable to the development of the parasite life cycle (Reinhard et al., 1985; Reinhard and Hevly, 1987). The few cases of human disease have been associated with the ingestion of water or food, especially raw vegetables, contaminated with infective-stage larvae, which complete their life cycle in the intestine of the host (Roberts and Janovy, 2008). The presence of adult parasites in humans is often asymptomatic, but may cause digestive disorders and anemia. Individuals in direct contact with farm animals are generally the most susceptible (Acha and Szyfres, 2003). Paleoparasitological records are restricted to the Americas, and exist in USA (Reinhard et al., 1985, 1987), México (Reinhard et al., 1989), Brazil (Araújo et al., 1984), and Argentina (Gonçalves et al., 2003). In Chile *Trichostrongylus* sp. have been found in archaeological sites from San Pedro de Atacama (Gonçalves et al., 2003), but have not been previously reported in the Lluta Valley. Although species identification is not possible based on the egg, *Trichostrongylus* sp. was the only parasite present in both LIP and LP in the present study, demonstrating continuity of the source of human infection over time. However, since the trichostrongylid reservoir is both domestic and wild ruminants, true or false *Trichostrongylus* sp. infection cannot be discriminated.

This study demonstrated that the frequency, richness, and number of parasite eggs increased chronologically over the time periods studied. We suggest that Inca expansion and the early HCP way of life may have influenced transmission, leading to an increase in human parasite infections, effecting a paleo-epidemiological transition. Due to the low number of samples, the results should be interpreted with caution. More sampling from Pre-Inca and Inca periods is necessary to support this hypothesis. Jovani and Tella (2016) suggested that the accuracy of prevalence data is reduced with sample size < 15. If we combine the data from the present study with that of Santoro et al. (2003) from the LIP (n = 29) and LP (n = 19), pinworm infection reached a prevalence of 24% in the LP period in the Lluta Valley. The combined data also reveal that parasite species richness increased from 3 to 4 species following the LIP period. The finding of six parasite species in the Lluta Valley is greater than in other populations of South America.

The complexity of the population subsistence structure in the LP period was shown by Dorsey-Vinton et al. (2009). During the LIP, foods were obtained locally in a region of small settlements. However, during the LP, trade in food products was established, mainly maize and potato. In this study, findings of maize (Poaceae) pollen grains were absent, at odds with the corn-based diet usually assumed for the area based on starch analysis, as well as with the abundance of Poaceae phytoliths observed. Pollen grains in addition to those of the Poaceae as well as floral micro-residues were found. Since most samples were from the domestic sector of the site, the floral remains are not considered the

result of offerings (Mendez-Quiros and Silva-Pinto, 2015). The results suggest interpretations related to the fertility of the valley and intensification of agriculture. In contrast to the overall low occurrence of pollen grains, one sample from the HCP revealed high frequency and diversity, probably reflecting open and shrubby vegetation. Onagraceae and Chenopodiaceae are indicators of atrophic vegetation. *Oenothera* sp. are now used as food, with leaves ingested as greens. *Chenopodium* sp. was used for its medicinal, including anthelmintic, properties (Chaves and Reinhard, 2006; Spotted-Bird, 2000), and *Chenopodium quinoa* was grown as part of the Andean diet. The increase in the variety of families in samples from the LIP to the HCP was based on a low number of individual samples, and substantive changes cannot be verified. The results disagree with Dorsey-Vinton et al. (2009) who proposed a considerable difference in dietary patterns of the LIP and the LP. The data from this work suggest that diet was only slightly influenced by the cultural transition of the periods studied. We did not conduct a detailed starch analysis, which would have provided a valuable source of dietary information and a complete dietary profile of Lluta 57. In addition to infrequent observations of pollen, no additional samples were available for comparison or confirmation (Chaves and Reinhard, 2006; Reinhard et al., 2007). The palynological data reported here are preliminary and descriptive, with several possible interpretations.

5. Conclusions

Several factors may be the source of the increase in parasite infections: intensification of agriculture and animal husbandry, population growth, decreased mobility, overcrowding, and the proximity of domestic animals to human habitations.

Changes in the settlements, with the advent of larger, more densely populated, villages, may have influenced the emergence and intensification of transmission of some parasites in the region. The study showed how the Inca expansion influenced host-parasite-environment relationships in the Lluta Valley.

Parasite infection seems to have been a serious problem for the inhabitants of the Lluta Valley after the Inca conquest, compared with other regions and cultures of Chile. With respect to the investigated periods, the diversity of parasites in Lluta Valley is the largest documented in South America.

Funding

This work was funded by Consejo Regional de la Cultura y las Artes (Arica, Chile). This work was supported by fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (AMI, grant number < gn2 > 307932/2014-1 < /gn2 >); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES (MVS, AMI, grant number < gn3 > 847/15 < /gn3 >); Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro, FAPERJ (AMI, grant number CNE < gn4 > 2/2016 < /gn4 >).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

A special thanks to the late Adauto Araújo, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, who began this collaboration, for his generosity, tutorship, and support, our love forever. We are also very grateful to The Lucidus Consultancy for English correction and suggestions. Thanks to MAA Consultores for their invaluable help in beginning this research and to Consejo de Monumentos Nacionales, which provided authorization to provide samples to Fiocruz. Finally, a special thanks to the community of Poconchile for their interest and participation in the project.

References

- Acha, P.N., Szyfres, B., 2003. Oonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Parasitoses, 3rd ed. Pan American Health Organization, Washington, DC.
- Araújo, A., Ferreira, L.F., 1995. Oxiuridae e migrações pré-históricas. *História. Ciências, Saúde – Manguinhos* II (1), 99–109.
- 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., Reinhard, K., Bastos, O.M., Costa, L.C., Pirmez, C., Iñiguez, A., et al., 1998. Paleoparasitology: perspectives with new techniques. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 40, 371–376.
- Araújo, A., Jansen, A.M., Bouchet, F., Reinhard, K., Ferreira, L.F., 2003. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I), 5–11.
- Aufderheide, A., Santoro, C.M., 1999. Chemical paleodietary reconstruction: human populations at late prehistoric sites in the Lluta valley of northern Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 72, 237–250.
- Barrett, R., Kuzawa, C.W., McDade, T., Armelagos, G.J., 1998. Emerging and Re-emerging infectious diseases: the third epidemiologic transition. *Annu. Rev. Anthropol.* 27, 247–271.
- Beer, R.J.S., 1976. The relationship between *Trichuris trichiura* (Linnaeus 1758) of man and *Trichuris suis* of the pig. *Res. Vet. Sci.* 20, 47–54.
- Beltrame, M., Fugassa, M.H., Sardella, N.H., 2010. First paleoparasitological results from late holocene in patagonian coprolites. *J. Parasitol.* 96 (3), 648–651.
- Cafune, M.M., Marín, R.E., Rigalt, F.A., Romero, S.R., Aguirre, D.H., 2009. Prevalence of *Eimeria macusaniensis* and *Eimeria ivitaensis* in south american camélidos of northwest Argentina. *Vet. Parasitol.* 162, 338–341.
- Callen, E.O., Cameron, T.W.M., 1960. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *Rev. New. Sci.* 8, 35–40.
- Chaves, S.A.M., Reinhard, K.J., 2006. Critical analysis of coprolite evidence of medicinal plant use piauí, Brazil. *palaeogeography, palaeoclimatology, Palaeoecology* 237, 110–118.
- Chaves, S.A.M., 1996. Étude pollinique de coprolithes humains recueillis dans le gisement préhistorique de Pedra Furada – Piauí, Brésil: apport paléolithologique. Second Congrès Des Etudiants En 3ème Cycle Du Muséum National d'Histoire Naturelle. *Résumés. Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris*, pp. 92.
- Cockburn, T.A., 1971. Infectious diseases in ancient populations. *Curr. Anthropol.* 12 (1), 45–62.
- 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., Araújo, A., Confalonieri, U.E. (Eds.), *Paleoparasitologia No Brasil. PEC/ENSP, Rio de Janeiro*.
- Dorsey-Vinton, S., Perry, L., Reinhard, K.J., Santoro, C.M., Teixeira-Santos, I., 2009. Impact of empire expansion on household diet: the inka in northern Chile's atacama desert. *PLoS One* 4 (Issue11), e8069.
- Ferreira, L.F., Araújo, A., Confalonieri, U., Nuñez, L., 1989. Infecção por *Enterobius vermicularis* em populações agro-pastoris pré-colombianas de San Pedro de Atacama, Chile. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84 (IV), 197–199.
- Ferreira, L.F., Reinhard, K., Araújo, A., 2011. Origem Dos Parasitos Humanos. In: Ferreira LF, Reinhard KJ, Araújo A. *Fundamentos Da Paleoparasitologia. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, pp. 121–139.
- Foreyt, W.J., Foreyt, B., 2001. *Veterinary Parasitology Reference Manual*, 5th ed. Wiley-Blackwell Malden, pp. 235.
- Fry, G.F., Moore, J.G., 1969. *Enterobius vermicularis*: 10,000 year old human infection. *Science* 166, 1620.
- Fugassa, M.H., Beltrame, M.O., Sardella, N.H., Civalero, M.T., Aschero, C., 2010. Paleoparasitological results from coprolites dated at the Pleistocene–Holocene transition as source of paleoecological evidence in Patagonia. *J. Archaeol Science* 37 (4), 880–884.
- Fugassa, M.H., 2007. Camélidos parásitos y ocupaciones humanas: registros paleoparasitológicos en Cerro Casa de Piedra 7 (Parque Nacional Perito Moreno, Santa Cruz Argentina). *Intersecciones en Antropología* 8, 265–269.
- Gonçalves, M.L.C., Araújo, A., Ferreira, L.F., 2003. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I), 103–118.
- Hugot, J.P., Reinhard, K.J., Gardner, S.L., Morand, S., 1999. Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. *Parasite* 6, 201–208.
- Iñiguez, A.M., Reinhard, K., Araújo, A., Ferreira, L.F., Vicente, A.C.P., 2003. *Enterobius vermicularis*: ancient DNA from north and south american human coprolites mem. *Inst. Oswaldo Cruz*. 98 (I), 67–69.
- Iñiguez, A.M., Reinhard, K., Gonçalves, M.L.C., Ferreira, L.F., Araújo, A., Paulo Vicente, A.C., 2006. SL1 RNA gene recovery from enterobius vermicularis ancient DNA in pre-Columbian human coprolites. *Int. J. Parasitol.* 36 (13), 1419–1425.
- Iñiguez, A.M., 2011. *Paleoparasitologia Molecular*. In: Ferreira LF, Reinhard KJ, Araújo A. *Fundamentos Da Paleoparasitologia. Fundação Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro*, pp. 27–41.
- Jaeger, L.H., Iñiguez, A.M., 2014. Molecular paleoparasitological hybridization approach as effective tool for diagnosing human intestinal parasites from scarce archaeological remains. *PLoS One* 9 (8), e105910.
- Jouy-Avantin, F., 2003. A standardized method for the description and study of coprolites. *J. Archaeol. Sci.* 30, 367–372.
- Jovani, R., Tella, J.L., 2016. Parasite prevalence and sample size: misconceptions and solutions. *Trends Parasitol.* 22 (5), 214–218.
- Koyama, K., 2013. Characteristics and incidence of large eggs in *Trichuris muris*. *Parasitol. Res.* 112, 1925–1928.
- Leguía, G., Casas, E., 1998. *Eimeria ivitaensis* n. sp. (Protozoa: eimeriidae) en alpacas (Lama pacos). *Rev. Peruana Parasitol.* 13, 59–61.
- Leguía, P.G., Casas, E., 1999. *Paleoparasitología*. In: Leguía, P.G., Casas, E. (Eds.), *Enfermedades Parasitarias Y Atlas Parasitológico De Camélidos Sudamericanos*. Editorial de Mar, Lima Peru, pp. 127–132.
- Lutz, A., 1919. O Schistosomum mansoni e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 11, 121–155.
- Martinson, E., Reinhard, K.J., Buikstra, J.E., Dittmar de la Cruz, K., 2003. Pathoecology of chirimba parasitism. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I), 195–205.
- Mendez-Quiros, P., Silva-Pinto, V. (Eds.), 2015. *Poblados Maiceros Y Arquitectura Funeraria En El Valle De Lluta (1200–1600 d.C.)*. Iquique-Leipzig.
- Reinhard, K.J., Ambler, J.R., McGuffie, M., 1985. Diet and parasitism at Dust Devil cave. *Am. Antiq.* 50 (4), 819–824.
- Reinhard, K.J., Hevly, R.H., Anderson, G.A., 1987. Helminth remains from prehistoric Indian coprolites on the Colorado Plateau. *J. Parasitol.* 73 (3), 630–639.
- Reinhard, K.J., Brooks, R.H., Brooks, S., Largent Jr., F.B., 1989. Diet and environment determined from analysis of prehistoric coprolites from an archaeological site near Zape Chico Durango Mexico. *J. Paleopathol. Monograph*. 1, 151–157.
- Reinhard, K.J., Araújo, A., Camillo-Coura, F., Ferreira, L.F., 1997. Paleoparasitology of oxyuriasis. *An. Acad. Med.* 157, 20–24.
- Reinhard, K.J., Byrant Jr., V.M., Vinton, S.D., 2007. Reinterpreting the Pollen data from dos Cabezas. *Int. J. Osteoarchaeol.* 38, 1–11.
- Reinhard, K.J., Ferreira, L.F., Bouchet, F., Sianto, L., Dutra Iniguez, A., et al., 2013. Food, parasites, and epidemiological transitions: a broad perspective. *Int. J. Paleopathol.* 3 (3), 150–157.
- Reinhard, K.J., 1990. *Archaeoparasitology in north america*. *Amer. J. Phys. Anthropol.* 82, 145–163.
- Reinhard, K.J., 1992. The impact of diet, and parasitism on anemia in the prehistoric West. In: Stuart-McAdam, P., Kent, S. (Eds.), *Diet, Demography and Disease: Changing Perspectives of Anemia*. Aldine de Gruyter, New York, pp. 219–258.
- Rey, L., 2008. *Parasitologia*, 4th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Roberts, L.S., Janovy Jr, J., 2008. *Foundations of Parasitology* Boston, 8th ed. McGraw-Hill Professional Publishing, pp. 736p.
- Santoro, C., Romero, A., Rosello, E.N., Standen, V.G., < .BT > , Santos, M., Torres, A., 2000. *Catastro De Sitios Arqueológicos Del Valle De Lluta*. Informe Final Projeto FONDECYT 597. Manuscrito na Biblioteca do CONICYT, Santiago.
- Santoro, C., Dorsey-Vinton, S., Reinhard, K.J., 2003. Inka expansion and parasitism in the Lluta valley: preliminary data. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I), 161–163.
- Santoro, C., 1995. *Late Prehistoric Regional Interaction and Social Change in a Coastal Valley of Northern Chile* PhD Thesis. Department of Anthropology, University of Pittsburgh.
- Sianto, L., Duarte, A.N., Chame, M., Magalhães, J., Vieira de Souza, M., Ferreira, L.F., et al., 2012. *Trichuris* sp. from 1,040±?/± 50-year-old cervidae coprolites from the archaeological site furma do estrago, pernambuco, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107 (2), 1–3.
- Silveira, L.T.P., Azevedo, A.V., Santiago, M.A.M., 1974. *Infestação do homem por Trichostrongylus* sp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 8 (4), 199–201.
- J. Spotted-Bird, *Ethnobotanical Information, Chihuahuan Desert Gardens, Centennial Museum*, Edited by A. H. Harris an Informal, Non-refereed Electronic Publication of the Centennial Museum Number University of Texas at El Paso 2000.
- Sutton, M.Q., Orfila, R.S., Huerta, B., Martz, P., 2006. Analysis of possible paleofecal samples from Pellejo Chico Alto, Peru: results and lessons. *J. Archaeol. Sci.* 33, 1600–1604.
- Valenzuela, D., Santoro, C.M., Capriles, J.M., Quinteros, M.J., Peredo, R., Gayo, E.M., et al., 2015. Consumption of animals beyond diet in the Atacama Desert, northern Chile (13,000–410 BP): Comparing rock art motifs and archaeofaunal records. *J. Anthropol. Archaeol.* 40, 250–265.
- Yoshikawa, H., Yamada, M., Matsumoto, Y., Yoshida, Y., 1989. Variations in egg size of *Trichuris trichiura*. *Parasitol. Res.* 75, 649–654.