

Daniela Leles

GUIA PRÁTICO

Protocolos Para
Estudo de DOENÇAS
INFECTO-PARASITÁRIAS
em Amostras de
Acervo e Coleções

Copyright 2016

**GUIA PRÁTICO - Protocolos Para Estudo de DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS
em Amostras de Acervo e Coleções**

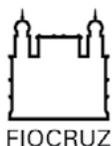
Este é um produto do Projeto INOVA-ENSP (Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca-Fundação Oswaldo Cruz) intitulado “Estudos sobre a origem e evolução das doenças: Desenvolvimento de protocolos aplicáveis em material de acervos e coleções” coordenado pelo Dr. Sérgio Augusto de Miranda Chaves, que também envolveu a participação da Universidade Federal Fluminense e fomento da FAPERJ.

Organizadora:

Daniela Leles - Professora e Pesquisadora da Universidade Federal Fluminense, Instituto Biomédico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia.

Contato:

dleles@id.uff.br



Coordenação editorial:

Luiz Felipe Cruz

Revisão:

Carolina Lacerda

Diagramação:

Diniz Gomes

Capa:

Ingo Bertelli

ISBN: 978-85-68878-45-3



Editora Albatroz | Rio de Janeiro-RJ
editoraalbatroz@gmail.com
www.editoraalbatroz.com.br



Sumário

| | |
|--|----|
|  Introdução: Análise do DNA parasitário antigo | 4 |
|  Capítulo 1: Trabalhando com DNA parasitário de ossos e tecidos moles: modelo experimental com o protozoário <i>Toxoplasma gondii</i> | 5 |
|  Capítulo 2: Trabalhando com DNA parasitário de ossos e tecidos moles: protozoários do gênero <i>Leishmania</i> spp. | 13 |
|  Capítulo 3: Trabalhando com DNA parasitário de coprólitos: modelo experimental com o helminto intestinal <i>Echinostoma</i> sp. | 19 |
|  Capítulo 4: Quando o estabelecido em modelos experimentais não se reproduz com o mesmo sucesso no material arqueológico: parasitos difíceis de trabalhar, o exemplo do protozoário intestinal <i>Giardia duodenalis</i> | 29 |
|  Capítulo 5: Estudo de material arqueológico altamente degradado: “sambaquis” como modelo experimental para recuperação de DNA parasitário | 38 |
|  Capítulo 6: Principais dificuldades encontradas no trabalho com DNA parasitário antigo | 45 |



Introdução:

Análise do DNA parasitário antigo

O estudo de infecções parasitárias em material antigo pela análise do seu DNA tem ganhado cada vez mais espaço em publicações da área. Há uma vasta literatura científica sobre o tema e há proposta de protocolos diversos tanto em artigos científicos como em livros temáticos. O intuito aqui não é passar uma “receita de bolo” ou apresentar nossos protocolos como sendo melhores do que os outros encontrados na literatura, mas sim proporcionar ao leitor nossa experiência acumulada ao longo dos anos, agora aplicada principalmente a modelos experimentais e o que tem ou não dado certo durante este tempo.

Trabalhando com DNA parasitário de ossos e tecidos moles: modelo experimental com o protozoário *Toxoplasma gondii*

Autores:

1-Daniela Leles, 2-Amanda Lobo, 1-Taís Rhodes, 1-Patricia Riddell Millar, 2- Regina Amendoeira e 2-Adauto Araújo*

1- Universidade Federal Fluminense-RJ

2- Fiocruz-RJ

**in memoriam*

Toxoplasma gondii

Toxoplasmose é o nome da infecção causada por esse protozoário de distribuição cosmopolita que pode infectar diversas espécies de mamíferos e aves. Embora a maior parte da população seja assintomática, casos graves estão associados a gestantes e imunocomprometidos, nestes últimos podendo haver a reagudização da toxoplasmose, inclusive com o comprometimento ocular. A infecção pode ser adquirida pela espécie humana de diversas formas: ingestão de carne mal cozida ou crua, leite não pasteurizado, contato com as fezes de gatos infectados ou indiretamente, quando estas contaminam água ou alimentos, e também transplante de órgãos, transfusão de sangue, transplacentária, dentre outras situações.

Contudo, quase nada se conhece sobre a toxoplasmose em tempos passados. A primeira abordagem metodológica no intuito de uma aproximação para o seu estudo em material antigo foi feito por Terra et al. (2004), onde os autores propõem o diagnóstico molecular a partir de tecidos experimentalmente dessecados de roedores infectados com *T. gondii*. Mas, após esse período, nenhuma pesquisa deu prosseguimento a estudos que visassem o diagnóstico de *T. gondii* em material arqueológico ou de acervo e coleções. Somente em 2013, embora o protozoário não fosse o foco da pesquisa, encontrou-se, pela primeira vez, material genético de *T. gondii* em um estudo metagenômico feito com múmias egípcias (Khairat et al., 2013), o que reforça as possibilidades do seu encontro em material antigo e, quiçá, uma perspectiva de estudo paleoepidemiológico.

Dificuldades para o encontro de *Toxoplasma gondii* em material de acervo e coleções

Em parte a escassez de estudos se deve ao ciclo do parasito e, consequentemente, baixa probabilidade do seu encontro neste tipo de amostra. Um dos materiais mais disponíveis para o estudo paleoparasitológico são coprólitos (fezes fossilizadas ou dessecadas). Contudo, na toxoplasmose a única espécie capaz de eliminar estruturas do parasito em suas fezes são os felinos. Porém, somente gatos jovens eliminam os oocistos ou, excepcionalmente, em idade adulta associado a algum grau de imunocomprometimento, limitando ainda mais o seu encontro. Sendo assim, a principal fonte de estudo para toxoplasmose estaria nos tecidos mumificados que corresponderiam a estruturas evolutivas encontradas nos hospedeiros intermediários. Nesta situação basicamente duas formas parasitárias poderiam ser encontradas no hospedeiro intermediário, incluído-se a espécie humana: a forma livre circulante (chamada de taquizoíta) e característica de fase aguda da infecção, e a forma mais encontrada na população (chamada bradizoíta). Esta forma pode encistar-se em diversos tecidos: coração, cérebro, fígado, baço, pulmão, dentre outros. A predileção por determinado tecido dependerá de condições do hospedeiro e da “linhagem ou cepa do protozoário”.

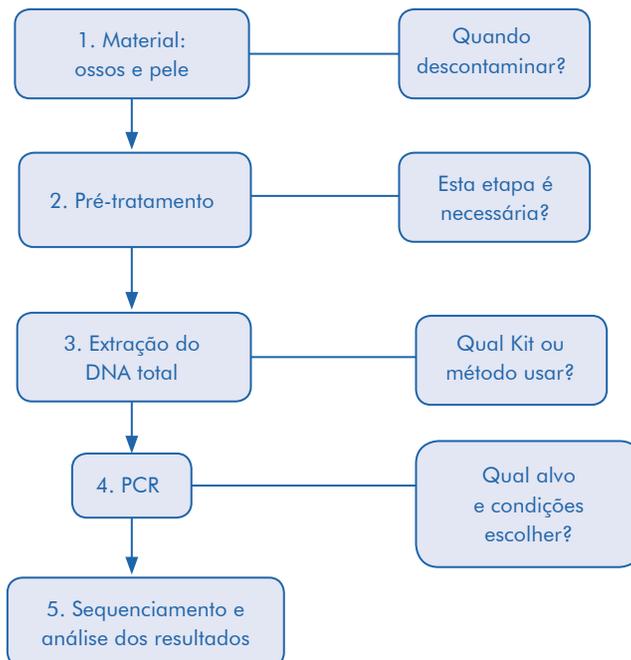
Qual material estudar?

Levando-se em conta o ciclo biológico do protozoário, *T. gondii* poderia ser diagnosticado em coprólitos exclusivamente de felinos, mas principalmente em diversos tecidos moles, tanto de material de origem humana quanto animal (outros mamíferos e aves). Porém, seria de se esperar que tecidos moles preservados, principalmente o visceral e cerebral com *T. gondii*, fossem encontrados principalmente em múmias que se conservaram por mumificação natural, material este que pode ser considerado raro se comparado a outros encontrados nos sítios arqueológico. Assim, nosso intuito aqui foi o de eleger e avaliar material arqueológico que pudesse ser obtido em maior quantidade para estudos quando comparado aos demais. Definimos, então, que estudar pele e ossos poderia trazer novas perspectivas para o estudo desta protozoose.

Condução do Experimento

Metodologia

Figura 1: Síntese de um Ensaio molecular



Legenda da Figura 1:

1. A descontaminação de qualquer tecido mole é temerosa, principalmente quando o objetivo é a recuperação de protozoários teciduais e sanguíneos, pois a descontaminação do material pode, em contrapartida, também estar destruindo o pouco DNA que restaria destes parasitos na amostra. Quanto aos ossos, há a possibilidade de raspar a parte que ficou exposta ou em contato com o ambiente e expor a peça ao UV (ultra-violeta) em toda sua face e, complementando a descontaminação, mergulhá-la em hipoclorito diluído. Este procedimento tem sido principalmente utilizado para o estudo do DNA antigo humano. Mesmo que minimizado, também nos ossos há o risco da perda do DNA parasitário. Caberá ao pesquisador analisar qual a possibilidade real da peça estar contaminada com DNA parasitário moderno de interesse. Na maior parte das vezes não haverá a possibilidade de contaminação, pois estes parasitos não sobreviveriam livres no ambiente. Pensando em *T. gondii* esta situação só ocorreria se o material arqueológico a ser estudado estivesse contaminado com fezes de um felino infectado, ou se alguma víscera de algum hospedeiro intermediário infectado estivesse contaminando o material. Dependendo do contexto arqueológico em que a amostra foi encontrada, esta situação seria pouco provável.
2. As amostras de ossos e tecidos moles precisam se tornar manipuláveis, com isso o pré-tratamento é necessário. Tanto os ossos quanto tecidos moles podem estar tão friáveis que apenas com grau e pistilo se conseguirá pulverizar a amostra. Contudo, em alguns casos, é necessário o uso de instrumento que possibilite a quebra da peça (dê preferência a instrumentos que possam ser autoclavados: ex. martelo inteiramente de aço como os usados em clínicas odontológicas) ou que sejam descartáveis; em outros casos o uso de nitrogênio líquido pode deixar o material a ponto de pulverizar (principalmente tecidos). Adicionalmente, recentemente tem surgido no mercado equipamentos próprios para pulverização de material desta natureza. A grande parte dos protocolos incubam as amostras (em tampões de digestão diversos), variando o tempo e temperatura de incubação.

3. A extração do DNA será feita de acordo com a natureza da amostra e o alvo do diagnóstico. Assim, há vários protocolos manuais como também kits comerciais para extração de DNA a partir de: sangue, ossos, dentes e até mesmo para amostras antigas. Muitas vezes o DNA obtido apresentará uma coloração escura, o que será um indicativo da presença de inibidores da reação de PCR, sendo, portanto, necessário purificações adicionais do DNA, até que esteja translúcido.
4. Nesta etapa a escolha do alvo é primordial. Devido à fragmentação do DNA antigo, a maioria das pesquisas considera ser possível recuperar fragmentos de no máximo 500pb. Assim como pela escassez do DNA antigo na amostra, deve-se dar preferência a alvos multicópias que poderão tanto estar no núcleo da célula quanto na mitocôndria, dependendo do organismo.
5. Nem sempre a amplificação do material é garantia de uma sequência de qualidade. Existem disponíveis vários programas de bioinformática gratuitos que possibilitam a edição e análises das sequências, as quais deverão ser comparadas a bancos mundiais de sequências.

Confecção do modelo experimental:

- Na confecção do modelo experimental foram usados pele e ossos de camundongo com taquizoítas circulantes e de outro camundongo com a cepa cistogênica (cisto com bradizoítas).
- Após dissecação dos camundongos para retiradas das amostras, cada uma delas foi separada em duas para que uma das partes fosse armazenada em freezer, a ser utilizada como controle, e a outra destinada a sofrer processo de dessecação em estufa, simulando uma mumificação.
- Prosseguiu-se os ensaios conforme apresentado no protocolo (quadro 1).

Quadro 1: Síntese do protocolo proposto para o diagnóstico de *Toxoplasma gondii* em material experimentalmente dessecado.

Protocolo proposto para o diagnóstico de *Toxoplasma gondii*

1. Não recomendamos a descontaminação do material para recuperação do DNA de *T. gondii*.
2. As amostras de ossos e pele foram pulverizadas com auxílio de grau e pistilo. Para melhorar a consistência da amostra e facilitar sua manipulação foi adicionada “água *nuclease free*” e esta solução foi incubada em banho seco por 30 minutos a 37°C.
3. Após o pré-tratamento acima usamos para extração do DNA total o kit comercial Purelink Genomic DNA Kit (Invitrogen®) usando o protocolo para “Mammalian Tissue and Mouse/Rat Tail” com as seguintes modificações: o DNA foi eluído em 50µL.
4. Usamos *primers* já descritos na literatura (Hurtado et al., 2001), que amplificam um fragmento de DNA nuclear de 214pb da região ITS1 (*Internal Transcribed Spacer 1*) a qual é multicópia. TgNP1 (*forward*): 5'-GTGATAGTATCGAAAGGTAT-3' e TgNP2 (*reverse*): 5'ACTCTCTCTCAATGTTCCCT-3'. A condição usada na PCR foi: Tampão [1x]; Mg [2mM]; dNTP [0.2mM]; *primer* [100ng de cada]; 2.5U *Taq platinum* (Invitrogen®); 5µL DNA. Ciclagem: 5min94°C; 40 ciclos [20s94°C, 20s 55 °C , 30s72°C]; 7min72°C.
5. Os produtos amplificados foram purificados e sequenciados. As sequências foram analisadas e editadas com auxílio de programas de Bioinformática e comparadas às depositadas no *Genbank*.

⁴Leles et. al 2016

Resultados

Foi possível o diagnóstico nas amostras de todas as naturezas: pele e ossos, tanto nas amostras dessecadas quanto nas congeladas em ambos os camundongos: com taquizoítas e bradizoítas, porém, como era de se esperar a intensidade da amplificação foi menor nas amostras dessecadas.

Principais conclusões

- A detecção do protozoário em material ósseo dessecado abre novas perspectivas para estudos paleoparasitológicos ao passo que este é muito mais abundante nas coleções e acervos do que tecido visceral.
- Surpreendentemente foi possível a detecção da cepa cistogênica nos ossos. Cresce a expectativa do estudo da toxoplasmose, pois assim como ocorre atualmente é muito mais provável o encontro de indivíduos em fase crônica da infecção. Porém, não se pode deixar de levar em consideração que concomitantemente com a forma cistogênica houvesse, naquele camundongo, a cepa circulante.

Dificuldades e limitações da pesquisa

Além do trabalho com modelos animais ser laborioso, o pequeno tamanho dos roedores aqui usados e, conseqüentemente, de suas peças anatômicas dificultaram algumas análises. Talvez fosse necessário novas pesquisas em modelos animais maiores. Embora a amplificação do DNA de *T. gondii* tenha sido possível no material intencionalmente dessecado, observou-se uma baixa qualidade das seqüências obtidas quando comparada às modernas, porém, essa não impediu a análise da seqüência e confirmação do agente etiológico.

Extrapolando para o estudo de amostras modernas

No Brasil, ainda há locais longínquos de difícil acesso em que muitas vezes o diagnóstico ou a confirmação deste não pode ser feita no local uma vez que o transporte da amostra em condição refrigerada não é possível. Devido à importância desta parasitose e do seu diagnóstico precoce, principalmente durante a gestação, este estudo apresenta uma potencial alternativa para o estudo de amostras desta natureza, embora mais estudos devam ser realizados. Abre-se a possibilidade para o diagnóstico da parasitose em amostra seca em estufa e transportada em temperatura ambiente.

Referências:

1. KHAIRAT, Rabab et al. First insights into the metagenome of Egyptian mummies using next-generation sequencing. *Journal Applied Genetics*, v. 54, n. 3, p. 309-325, ago. 2003.
2. HURTADO, Ana et al. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. *Veterinary Parasitology* v. 102, n. 1-2, p. 17-27, dez. 2001.
3. TERRA, Marcia Andreia Bargel Loução et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA by Polymerase Chain Reaction in Experimentally Desiccated Tissues, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 2, p. 185-188, mar. 2004.
4. LELES, Daniela et al. Recovery of *Toxoplasma gondii* DNA in experimentally mummified skin and bones: Prospects for paleoparasitological studies to unveil the origin of toxoplasmosis, *Experimental Parasitology*, jun. 2016 (*in press*). S0014-4894(16)30115-1. doi: 10.1016/j.exppara.2016.06.003.

Capítulo 2:

Trabalhando com DNA parasitário de ossos e tecidos moles: protozoários do gênero *Leishmania* spp.

Autores:

1-Shênia Patrícia Corrêa Novo, 2- Daniela Leles e 1-Adauto Araújo*

1- Fiocruz-RJ

2-Universidade Federal Fluminense-RJ

**in memoriam*

Os protozoários do gênero *Leishmania*

Estes parasitos são protozoários zoonóticos intracelulares obrigatórios e agentes causadores das leishmanioses. Os protozoários são transmitidos pela picada de insetos flebotomíneos fêmea infectadas. Há diversas espécies de *Leishmania* associadas à doença humana e, dependendo da espécie, estas podem provocar diferentes manifestações clínicas as quais poderão ser mais ou menos graves: podem se apresentar sob as formas cutânea e/ou mucocutânea e visceral. É endêmica em diversos países, afetando milhares de pessoas em todo o mundo, incluindo o Brasil (Coura 2005).

Qual material estudar?

Levando-se em consideração o habitat deste parasito no hospedeiro humano, células do sistema fagocítico mononuclear que estarão presentes nos mais diversos tecidos, no caso das leishmanioses cutâneas e/ou mucocutâneas espera-se que o parasito possa ser recuperado da pele, e no caso da visceral que este possa ser recuperado em tecidos ou órgãos viscerais ou mesmo ossos, principalmente na medula. Sendo assim, a principal fonte para estudo da leishmaniose visceral no material arqueológico estaria nos ossos ou em tecidos de múmias que se conservaram por meio de mumificação natural, pois geralmente as mumificações intencionais envolvem a evisceração do corpo. No caso das leishmanioses cutâneas ou mucocutâneas, mesmo as múmias que passaram por processo de mumificação intencional também poderiam ser estudadas, podendo se associar à observação de lesões características com a busca direta do protozoário, mas vale salientar a importância de se analisar, inclusive, tecidos sem lesões, uma vez que nem sempre estas estarão presentes.

Porque estudar este protozoário em material arqueológico?

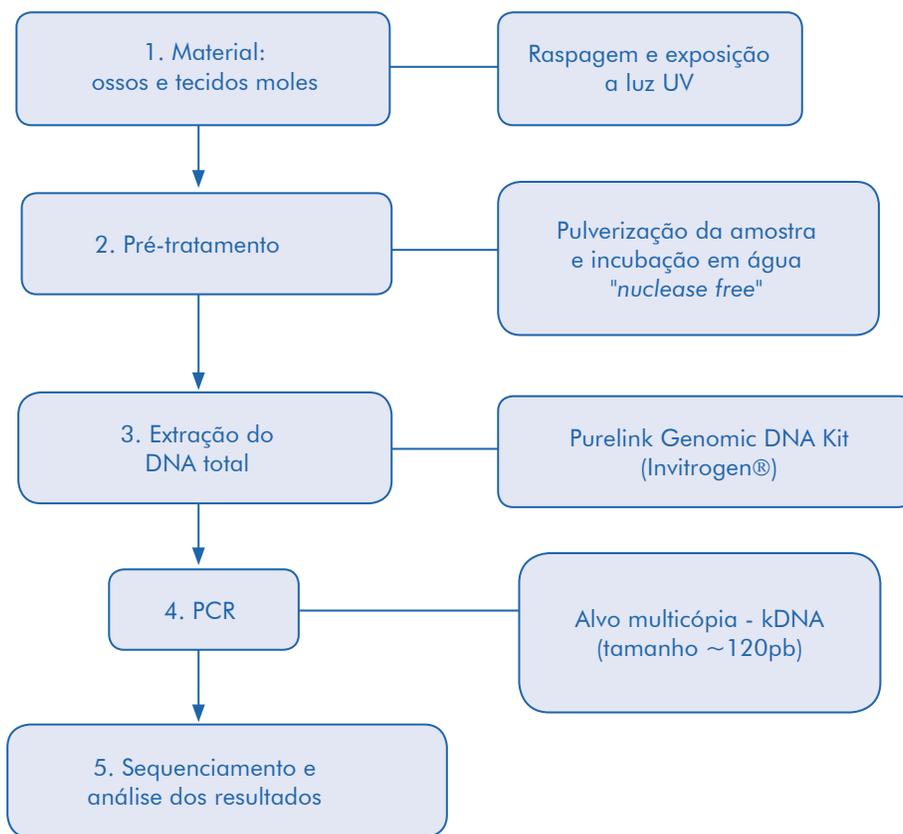
A alta prevalência, grande distribuição geográfica, gravidade da doença e particularidades das espécies deste protozoário que estabeleceu uma relação de longa duração com humanos e animais, torna de grande importância os estudos da leishmaniose em materiais arqueológicos.

Sabe-se atualmente que pelo menos uma das leishmanioses existe muito antes da chegada dos europeus na América (Guillen & Allison, 2005). Com isso, é de extrema relevância a realização de estudos em materiais antigos que datem tanto do pós-contato como do pré-contato, possibilitando, assim, a análise da distribuição e comportamento do parasito ao longo do tempo. Algumas pesquisas obtiveram sucesso na recuperação de DNA antigo de *Leishmania* sp., como, por exemplo, em múmias egípcias ou em personagens importantes na história mundial, como Eleonora de Toledo (1522-1562), esposa de Cosimo I de Medici, membro de uma das famílias de maior influência política do período Renascentista italiano (Zink et al. 2006, Nerlich et al. 2012).

Propõe-se neste guia prático um protocolo alternativo mais rápido, o que reduz o tempo de exposição da amostra tanto à degradação do DNA quanto à contaminantes modernos. Salienta-se que foi realizado com reagentes de menor custo (Figura 1, Quadro 1).

Metodologia

Figura 1. Síntese do ensaio molecular para *Leishmania* spp.



Legenda Figura 1:

As mesmas considerações feitas na legenda da Figura 1 do capítulo 1 para *T. gondii* também devem ser levantadas para este protozoário; ressaltamos que este parasito também não vive livre no ambiente, com isso as chances de contaminação com DNA moderno de *Leishmania* spp. são minimizadas.

Quadro 1: Síntese do protocolo proposto para o diagnóstico de DNA de protozoários do gênero *Leishmania* em material arqueológico.

Protocolo proposto para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em material antigo

1. Para ossos rígidos recomendamos a descontaminação do material com a raspagem da camada externa e exposição à luz UV por 15min em cada face da peça; preferencialmente após este procedimento a peça poderá ser aberta e raspada a medula. Como um critério de autenticidade poderá ser analisado o material do raspado mais externo e compará-lo com o obtido da medula óssea. Para tecidos moles não recomendamos descontaminação.
2. As amostras de ossos e tecidos moles são pulverizadas com auxílio de grau e pistilo. Para melhorar a consistência da amostra e para facilitar sua manipulação é adicionada “água *nuclease free*”, sendo esta solução incubada em banho seco por 30min a 55°C.
3. Após o pré-tratamento acima utilizamos, para extração do DNA, total o kit comercial Purelink Genomic DNA Kit (Invitrogen®) usando o protocolo para extração de tecidos com as seguintes modificações: o DNA foi incubado em tampão de digestão e proteinase K durante 2 horas e eluição final de 50 µl.
4. Utilizamos dois pares de *primers* já descritos na literatura que amplificam um fragmento com 120pb de DNA extra-nuclear da região conservada da molécula do minicírculo do DNA cinetoplasmático de *Leishmania* spp.: 13A (5'-GGGGAGGGGCGTTCTGCGAA-3') e 13B (5'-SSSCMCTATWTTACACCAACCCC-3') segundo Degrave et al. (1994); e 13A (5'-GTGGGGGAGGGGCGTTCT - 3' e 13B (5' -ATTTTACACCAACCCCCAG - 3') segundo Rodgers et al. (1990). A condição usada na PCR foi: solução tampão [1x], dNTPs [0,2 mM], *primers* [200 ng de cada], *Taq Platinum* (Invitrogen®) [2,5 U], 5 µL do DNA extraído (aDNA); Mg [2 mM] para o par de *primers* segundo Rodgers et al. (1990) e Mg [1,5 mM] para o par de *primers* segundo Degrave et al. (1994); para um volume final de 50µl. A ciclagem utilizada foi a mesma recomendada pelos autores supracitados com 45 ciclos de amplificação.
5. Os produtos amplificados foram purificados e diretamente sequenciados. As seqüências foram analisadas e editadas com auxílio de programas de bioinformática e comparadas as depositadas no *Genbank*.

Resultados

O diagnóstico de fragmentos de DNA antigo parasitário foi possível tanto em amostras de tecido mole como em amostras ósseas. Embora as ampliações de DNA antigo tenham baixa intensidade, ressaltamos que esta foi maior com a utilização do par de *primers* segundo Degraeve et al. (1994). Estes resultados se encontram publicados (Novo et al. 2015).

Principal conclusão

Estabelecemos um protocolo mais rápido e de baixo custo comparado aos que vinham sendo empregados até o momento, o que trará novas contribuições para paleoparasitologia das leishmanioses, onde mais amostras poderão ser estudadas, mesmo com projetos com orçamento limitado.

Dificuldades e limitações da pesquisa

- Muitas vezes o material ósseo arqueológico se encontra muito frável e a raspagem e exposição a luz UV não é possível.
- Ainda que a preservação da peça seja prioritária, obtivemos melhores resultados com o uso da medula óssea, onde nem sempre é possível preservar a sua integridade.
- Por se tratar de material antigo, o DNA parasitário, quando presente, apresenta-se bastante degradado, com isto a qualidade das sequências nem sempre é comparável à qualidade de uma sequência moderna, o que muitas vezes limita algumas análises.

Referências:

1. COURA, José Rodrigues. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro; p. 697, 2005.
2. DEGRAVE, Wim et al. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 89, n. 3, p. 463-469, jul-set. 1994.
3. GUILLEN, Allison. An early case of South American Leishmaniasis in Peru. In:_____. Anais do 1st Paleopathology Association Meeting in South America, 2005. Rio de Janeiro: Paleopatology Association, v.1, p. 61, 2005.
4. NERLICH Andreas et al. Visceral Leishmaniasis during italian Renaissance, 1522-1562. Emerging Infectious Diseases, v. 18, n. 1, p. 184-186, jan. 2012.
5. NOVO, Shênia Patrícia et al. *Leishmania tarentolae* molecular signatures in a 300 hundred-years-old human Brazilian mummy. Parasites & Vectors. , v.8, p.72, fev. 2015.
6. RODGERS Mark , et al. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of *Leishmania*. Experimental Parasitology, v. 71, n. 3, p. 267-275, out. 1990.
7. ZINK, Albert et al. Leishmaniasis in ancient Egypt and Upper Nubia. Emerging Infectious Diseases, v. 12, n. 10, p. 1616-1617, out. 2006.

Capítulo 3:

Trabalhando com DNA parasitário de coprólitos: modelo experimental com o helminto intestinal *Echinostoma* sp.

Autores:

1-Daniela Leles, 1-Andressa Freire, 2-Amanda Lobo, 2-Arnaldo Maldonado Jr., 2-Juberlan Garcia, 1-Ana Beatriz Monteiro e 2-Adauto Araújo*.

1- Universidade Federal Fluminense-RJ

2- Fiocruz-RJ

**in memoriam*

Coprólitos: um universo de informações

Não resta dúvida que os “coprólitos”, que nada mais são que fezes antigas, estão entre os materiais mais disponíveis e mais estudados pela paleoparasitologia. O seu tipo de preservação, ou seja, se este passou por processo de dessecação ou se sua matriz foi substituída por minerais, influenciará diretamente nas técnicas parasitológicas a serem usadas. Os coprólitos estão entre as amostras mais ricas do ponto de vista de informações a serem obtidas. A análise deste tipo de amostra permite não somente revelar aspectos sobre doenças infecto-parasitárias, como também informações sobre dieta, sobre o hospedeiro, sobre microbiota saprófita, sobre a vegetação local dentre várias outras informações.

Quais parasitos podem ser analisados?

Normalmente as infecções pesquisadas serão parasitoses intestinais as quais poderão ser concomitantes a parasitoses extra-intestinais. O que não exclui a possibilidade de estudar casos de falso-parasitismo, ou seja, quando o hospedeiro gerador do coprólito ingeriu algum outro animal que, de fato, é quem estava verdadeiramente parasitado e, neste caso, poderia até mesmo não ser uma parasitose intestinal. Mas em todas estas situações uma condição é fundamental, que o parasito tenha deixado “pistas” de sua existência. Os parasitos possuem vários estágios evolutivos e, dentre estes, produzem estruturas parasitárias de resistência que normalmente passam para as fezes do hospedeiro e podem resistir a condições adversas do ambiente. Assim os helmintos produzem ovos e os protozoários produzem cistos e oocistos: estas serão então as estruturas a serem encontradas nos coprólitos, e menos provavelmente larvas ou mesmo parasitos adultos e trofozoítas, que são estruturas mais frágeis e propensas a degradação. E é principalmente através da preservação destas estruturas de resistência dos parasitos que a paleoparasitologia tem revelado que várias doenças infecto-parasitárias que ainda constituem verdadeiros problemas para saúde coletiva já estavam presentes em tempos passados como: ascaridíase, tricuriíase, capilaríase, ancilostomíase, teníase, enterobíase, echinostomíase, giardíase, amebíase, dentre tantas outras.

Técnicas rotineiramente usadas em paleoparasitologia para a análise de infecções intestinais

Sir Armand Ruffer foi um dos pioneiros na área da paleoparasitologia ao revelar ovos de *Schistosoma hematobium* em rins de múmias egípcias na segunda década do século XX, embora esta ciência ainda não fosse assim denominada. Passou-se um longo período até que, na década de 60, Callen & Cameron (1961) introduziram na análise dos coprólitos a reidratação em fosfato trissódico a 0,5%, ainda que a intenção destes pesquisadores não fosse a análise dos parasitos. Porém, a adição desta solução tem por finalidade

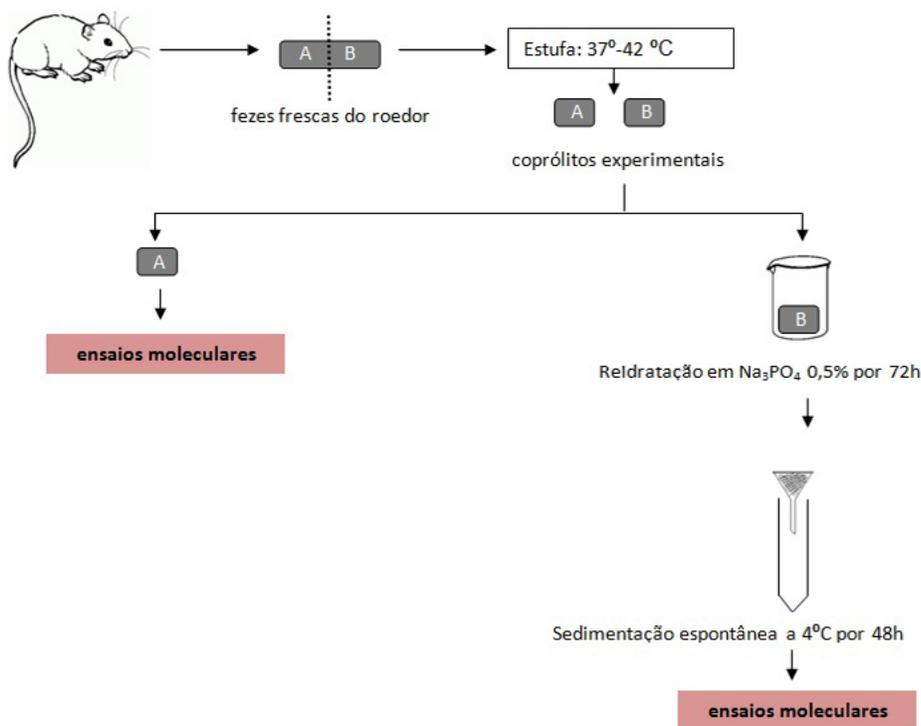
fazer com que os vestígios orgânicos presentes na amostra retomem sua forma original. Assim, estruturas evolutivas dos parasitos também retomariam a sua forma original e também poderiam ser identificadas pela microscopia. Após o uso de solução reidratante as técnicas coproparasitológicas tradicionais puderam ser empregadas, talvez a mais utilizada seja a sedimentação espontânea desenvolvida por Lutz (1914). Assim, um dos principais protocolos usados pela paleoparasitologia envolve a reidratação da amostras por 72h e sedimentação espontânea por mais 48h. Atualmente o processo é todo feito em ambiente refrigerado a 4°C para evitar a proliferação de microorganismos ao invés da adição de conservante químico como o Railliet & Henry, por exemplo, como era feito antigamente. Embora a finalidade primeira da reidratação seja para microscopia, as pesquisas de paleoparasitologia molecular com coprólitos também costumam usar a reidratação do material, seja utilizando fosfato trissódico a 0,5% por 72 horas, Glicerol a 5% por 1 semana, ddH₂O ou TE buffer (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0), seguida da sedimentação que tem por finalidade concentrar as formas parasitárias, o que conseqüentemente também poderia concentrar o DNA. Portanto, o que tem sido utilizado para extração do DNA antigo é o sedimento resultante deste procedimento.

Hipótese

Segundo o exposto acima resolvemos testar se o uso de uma destas soluções reidratantes, “o fosfato trissódico”, seguido da sedimentação espontânea, era mesmo necessário aos ensaios destinados a recuperação do DNA parasitário ou mesmo se poderia influenciar na sua recuperação.

Desenho do experimento

Figura 1: Confeção dos coprólitos experimentais e pré-tratamento da amostra antes do ensaio molecular.



Legenda da Figura 1:

Um total de 15 amostras fecais sabidamente positivas para o helminto *Echinostoma* sp. provenientes de 15 diferentes roedores foram analisadas. Cada amostra fecal foi dividida em partes iguais (a e b). Cada alíquota foi para estufa onde permaneceu até não mais haver perda de peso. Uma parte de cada coprólito foi diretamente para as análises moleculares e a outra alíquota correspondente passou pelas técnicas tradicionalmente empregadas em paleoparasitologia, conforme demonstrado na figura 1, e só então foram para os ensaios moleculares.

Metodologia

Quadro 1: Síntese dos ensaios moleculares realizados com os coprólitos experimentais.

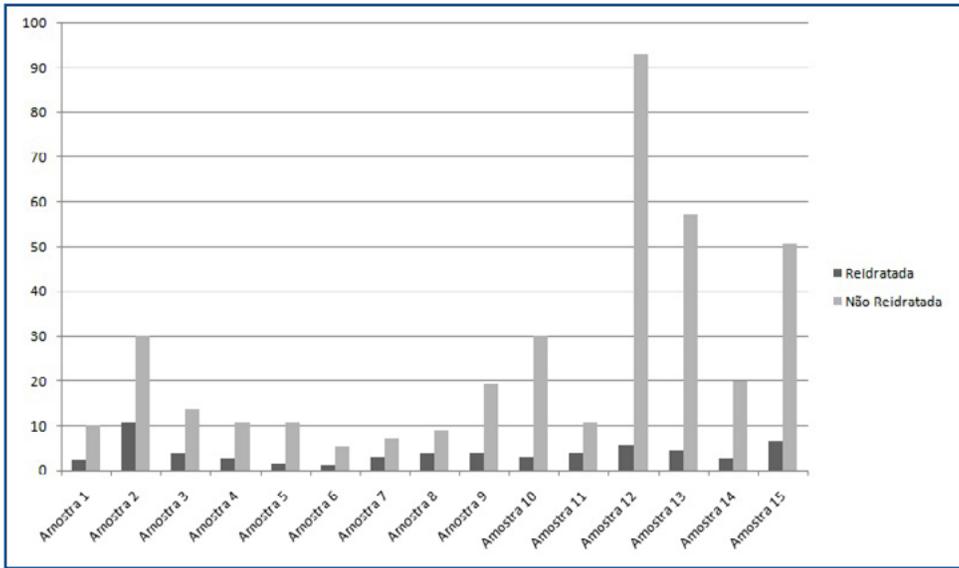
| Protocolo para o diagnóstico molecular de parasitos em coprólitos | Observações |
|--|--|
| 1. Descontaminação: raspagem da camada externa e radiação com luz ultravioleta. | Este passo dependerá da natureza da amostra e da espécie de parasito que se espera encontrar, a qual está relacionada ao ciclo biológico do mesmo. Não recomendamos a descontaminação de solo ou sedimento, pois esta também poderia destruir as estruturas parasitárias. Como alguns parasitos são encontrados na superfície do bolo fecal, a descontaminação também não seria recomendada. |
| 2. Pré-tratamento: choque-térmico (94°C por 3min em banho seco e 30s em nitrogênio líquido) com o microtubo sempre fechado. | Alguns ovos, cistos e oocistos de parasitos são muito resistentes sendo, portanto, necessário o uso de algum artifício para o rompimento da sua casca ou camada cística e “liberação” do DNA ali presente. Sendo usados sonicação, choque-térmico, agitação com pérolas de vidro, dentre outros. |
| 3. Extração do DNA: neste ensaio usamos o kit comercial Qiamp mini stool (Qiagen®) segundo protocolo descrito pelo fabricante; com incubação com proteinase k por 2h e eluição final em 50µL. O DNA total foi quantificado no equipamento Nanodrop 2000. | Recomendamos um kit próprio para fezes, pois estes já contem substâncias para remoção de inibidores de PCR, substâncias estas presentes em material de origem fecal. Se a amostra apresentar coloração escura ao final desta etapa, há o indício de que os inibidores não foram removidos, sendo necessário purificações adicionais. |

| | |
|--|---|
| 4. PCR: usamos primers e condições já descritos na literatura para o parasito <i>Echinostoma</i> sp. (Leles et al., 2014), que amplificam um fragmento do gene mitocondrial <i>cox1</i> de 126 pb. | Como já mencionado em outros capítulos deste guia prático, recomenda-se o uso de alvos multicópias e menores que 500pb. |
| 5. Análise dos amplicons: os produtos amplificados foram analisados em programas de imagem que estimam a quantidade (concentração) do DNA presente nos amplicons. | Foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 2,5%. O gel foi fotodocumentado e analisado com o Programa LabImage 1D que estima a quantificação/concentração das amplificações por comparação com produtos amplificados com concentração já conhecida. |
| 6. Análise estatística: um método não paramétrico foi escolhido para análise (Teste de Wilcoxon com nível de significância de 5%). | A análise estatística foi aplicada com os números obtidos da quantificação do DNA total e parasitário (proveniente das amplificações). |
| Obs: Este protocolo pode ser extrapolado para análise de solo e sedimento arqueológico. | |

Resultados

A recuperação do DNA total foi maior e estatisticamente significativa em todas as amostras não reidratadas (Figura 2).

Figura 2: Gráfico da concentração total do DNA extraído dos coprólitos experimentais reidratados e não reidratados. Os valores foram estatisticamente significante ($p < 0,001$).



- Embora não estatisticamente significante, a recuperação do DNA parasitário também foi maior em 11 das 15 amostras não reidratadas (tabela 1).

Tabela 1: Comparação da concentração do DNA parasitário para o alvo mitocondrial *cox1* (citocromo c oxidase 1) em coprólitos experimentais reidratados e não reidratados.

| Amostras | Alvo <i>cox1</i> | |
|----------|-------------------------|---------------------|
| | Não reidratada (Pixels) | Reidratada (pixels) |
| 1 | 1253,54* | 1041,41 |
| 2 | 1959,32* | 1917,07 |
| 3 | 2448,37* | 2247,50 |
| 4 | 2494,13* | 2268,43 |
| 5 | 2217,09* | 2079,18 |
| 6 | 2354,54* | 2198,02 |
| 7 | 2000,17* | 1901,37 |
| 8 | 400,677 | 720,218* |
| 9 | 1247,46* | 968,904 |
| 10 | 1660,92 | 1804,43* |
| 11 | 1999,49* | 1941,84 |
| 12 | 2094,66 | 2287,64* |
| 13 | 2128,84* | 1981,85 |
| 14 | 1864,45* | 1710,52 |
| 15 | 231,605 | 380,213* |

Legenda: *Amostras que apresentaram maior concentração do DNA parasitário.

Observação: os resultados parciais desta pesquisa foram previamente publicados (Freire et al. 2015, Freire 2015).

Principais conclusões

- Considerando a maior recuperação do DNA nas amostras não reidratadas, o menor tempo de execução da técnica e, consequentemente, sua menor exposição a contaminantes modernos, recomendamos que, para análise molecular, a amostra não seja reidratada.

- A microscopia continua a ser um poderoso recurso no estudo das parasitoses. Assim, sugerimos que amostras de solo, sedimento e coprólitos sejam divididas: uma parte destinada a microscopia e outra destinada a análise molecular para que não haja influências negativas na execução e resultados obtidos com ambas as técnicas.

Dificuldades e limitações da pesquisa

- Enfatizamos que qualquer melhora no rendimento de protocolos com DNA antigo são de suma importância, dada a raridade do material que muitas vezes constituem amostras únicas. Porém, ainda que as amostras tenham sido divididas em partes iguais, não há como garantir que a quantidade inicial de ovos em cada uma das partes seja a mesma e, conseqüentemente, o DNA parasitário disponível, ainda que a análise estatística tenha sido empregada para minimizar este efeito e tenha dado estatisticamente significativo em uma das análises.
- Embora o DNA total tenha sido maior em todas as amostras não reidratadas, a análise deste, se extrapolada para amostras antigas, não necessariamente reflete somente DNA antigo. DNA moderno também pode ser co-extraído durante o processo, mascarando em parte os resultados obtidos. Porém, a análise estatística teve por finalidade diminuir este viés.

Aplicabilidade em amostras modernas

A dessecação intencional pode ser usada como um método de conservação de amostras fecais quando outros não forem possíveis. Ainda assim, algumas formas parasitárias poderão ser futuramente observadas pela microscopia, como também seu DNA poderá ser recuperado. Este protocolo para análise do DNA parasitário também pode ser aplicado a fezes recentes provenientes de regiões geográficas com clima quente e seco, onde a amostra se preserva por dessecação natural.

Referências:

1. CALLEN, CAMERON . A pre historic dietas revealed in coprolites. *New Scientist*, v. 8, p. 35-40. 1960.
2. FREIRE, Andressa. Paleoparasitologia da echinostomíase no Brasil. Dissertação de Mestrado em Microbiologia e Parasitologia Aplicada. Niterói: Universidade Federal Fluminense, 2015.
3. LUTZ, Adolfo. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 11, p. 121-150.1914.
4. LELES, Daniela et al. Insights about echinostomiasis by paleomolecular diagnosis. *Parasitology International* v. 63, n. 4, p.646-649, ago. 2014.
5. FREIRE, Andressa et al. It is needless to rehydrate archeological samples to extract ancient DNA. *Parasitology International*, v. 64, n. 5, p.303-304, out. 2015.

Quando o estabelecido em modelos experimentais não se reproduz com o mesmo sucesso no material arqueológico: parasitos difíceis de trabalhar, o exemplo do protozoário intestinal *Giardia duodenalis*.

Autores:

1-Liesbeth Frías, 1-Valmir Laurentino Silva, 2-Beatriz Brener,
2-Adriana P. Sudré, 1-Adauto Araújo*, 2-Daniela Leles.

1- Fiocruz-RJ

2-Universidade Federal Fluminense

**in memoriam*

Giardiase

A infecção causada pelo protozoário intestinal *Giardia duodenalis* (sinonímia *Giardia intestinalis*, *Giardia lamblia*) vem sendo estudada há cerca de 300 anos, desde que o cientista holandês Antonie van Leeuwenhoek constatou sua presença pelo exame das suas próprias fezes usando um microscópio que ele mesmo havia construído. A giardiase apresenta uma distribuição global e é considerada atualmente uma zoonose (infecção transmitida entre a espécie humana e outros animais). Embora figure entre as mais importantes parasitoses de veiculação hídrica, muitas vezes diretamente relacionada a quadros diarreicos e principalmente ao menor desenvolvimento em crianças, ainda é considerada uma doença negligenciada. Seu mecanismo de infecção é pela ingestão de água e alimentos contaminados, o protozoário coloniza em geral o intestino delgado do hospedeiro, que elimina em suas fezes os cistos, que constituirão a estrutura infectante para outros hospedeiros.

Métodos de diagnóstico

Por muito tempo o diagnóstico mais empregado na identificação deste parasito era a microscopia óptica, porém, o surgimento de kits comerciais de imunodiagnóstico baseados na análise de coproantígenos popularizou o seu uso também na rotina de laboratórios de análises clínicas. Contudo, a identificação dos genótipos zoonóticos hoje conhecidos só foram possíveis mediante o diagnóstico molecular: atualmente são reconhecidos 8 genótipos (A-H) sendo os genótipos A e B considerados zoonóticos.

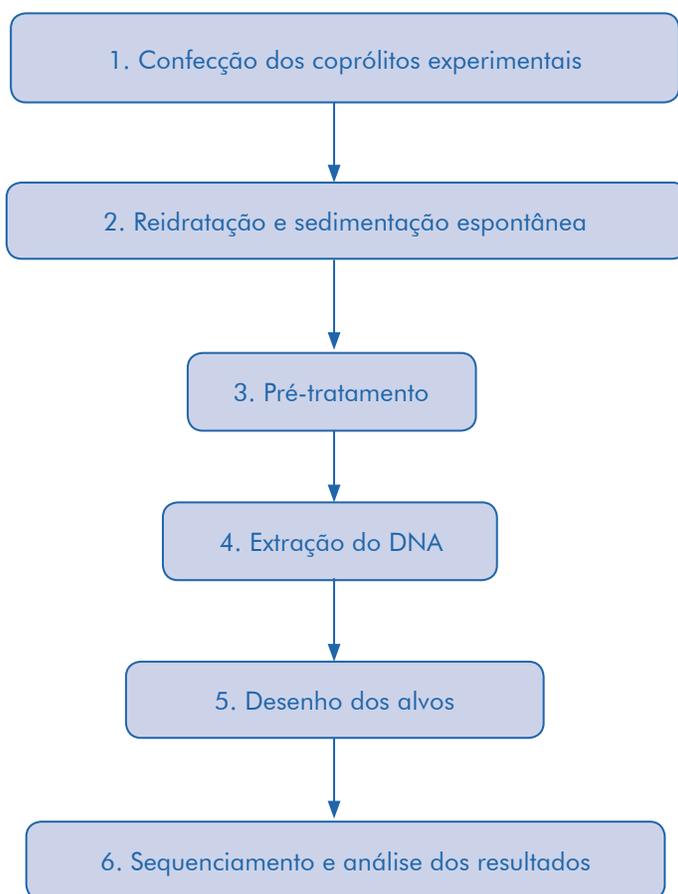
Achados em material arqueológico: limitações e perspectivas

Em recente revisão sobre protozoários recuperados de material antigo Frías et al. (2013) chama a atenção para escassez de estudos com protozoários entéricos em detrimento dos protozoários sistêmicos como *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. e *Plasmodium* spp. Os raros estudos da giardíase em material antigo foram feitos usando-se como metodologia de diagnóstico a microscopia óptica, mas infelizmente não existem registros fotográficos destes achados nos trabalhos, e a grande maioria tem utilizado o imunodiagnóstico como ELISA e Imunofluorescência. Um destes achados em particular corrobora a documentação histórica sobre relatos de diarreia crônica entre os soldados das Grandes Cruzadas (Mitchell et al. 2008). Amostras de sedimento, provenientes de fossas e latrinas de um hospital em Israel foram analisadas e, através de imunodiagnóstico, foram encontradas *G. duodenalis* juntamente com *Entamoeba histolytica*. Em outros sítios arqueológicos da Europa Medieval também se detectou este protozoário, além de sítios arqueológicos da América do Sul (para uma revisão ler Frías et al 2013). Todos estes trabalhos tiveram como objetivo a análise de amostras humanas, ao passo que a metodologia utilizada também não permitiria encontrar isolados zoonóticos. O diagnóstico molecular é fundamental para melhor estabelecer as dinâmicas de transmissão existentes no passado, reconhecendo potenciais reservatórios para esta protozoose,

além desse ser o único capaz de genotipar os isolados e identificar aqueles com potencial zoonótico. Porém, como não existia na literatura até o presente momento diagnóstico paleoparasitológico molecular para giardíase, na dissertação de Liesbeth Frías (2013) foi proposto uma metodologia de diagnóstico molecular para *Giardia duodenalis* em modelos experimentais, e que posteriormente foi aplicada ao material arqueológico.

Desenho do experimento

Figura 1: Síntese do desenho experimental realizado com os coprólitos experimentais positivos para *Giardia duodenalis*.



Legenda da Figura 1:

1. Fezes humana e de felino positivas para *Giardia duodenalis* previamente identificadas pela microscopia óptica foram colocadas em estufa a 37°C para dessecação experimental para mimetizar o processo de dessecação pelo qual passam os coprólitos. Quando não foi mais observado perda de peso prosseguiu-se com os experimentos.
2. Os coprólitos passaram pelo processo de reidratação em fosfato trissódico 0,5% por 72h e sedimentação espontânea em refrigerador 4°C por 48h. À época ainda não havíamos realizado o experimento descrito no capítulo 3 deste Guia Prático.
3. Assim como os ovos de helmintos, os cistos de protozoários também apresentam resistência; protocolos para material moderno já haviam demonstrado a necessidade do rompimento do cisto para posterior extração do DNA parasitário. Sendo assim, o sedimento coletado em microtubo foi submetido a 3 ciclos de choque térmico (94°C por 3min e 1min em nitrogênio líquido).
4. A extração do DNA foi feita usando-se o kit comercial *Qiamp mini stool* (Qiagen®) segundo protocolo descrito pelo fabricante. Com incubação com proteinase K por 2h e eluição final em 50µl.
5. Conforme já mencionado em DNA antigo devemos priorizar alvos multicópia. Porém, *Giardia duodenalis* possui um gene de cópia única específico (gene B-giardina) que tem sido amplamente usado na literatura para material moderno, sendo assim resolvemos incluí-lo nas análises. Mas, também foi usado o alvo multi-cópia (gdh). Os alvos foram desenhados a partir da sequência do genoma completo do parasito, depositada no *GenBank*; os mesmos foram idealizados principalmente para os genótipos zoonóticos A e B, mas também para alguns genótipos animais. Sendo assim, algumas bases foram degeneradas para ampliar o número de genótipos a serem detectados. Para o gene conservado B-giardina, foi desenhado um par de *primers* que amplifica um fragmento de 324 pb e um *primer* interno àquele que amplificam um fragmento de

147pb (semi-nested PCR) para aumentar a sensibilidade e especificidade da reação, este alvo amplificaria os genótipos A e B. Para o alvo *gdh* foram desenhados um par de *primers* para amplificar os genótipos A e B e outro par de *primers* para amplificar alguns genótipos animais. As PCRs foram acompanhadas de controle negativo e controle positivo (DNA já extraído de cultura de trofozoítas cepa WB). Para condições da PCR e descrição dos alvos ver dissertação disponível *on line* Liesbeth Frías 2013.

Resultados

- Os alvos desenhados para *Giardia duodenalis*, quando aplicados ao DNA da cultura, se mostraram altamente sensíveis e específicos.
- Quando os alvos foram aplicados às amostras fecais e coprólitos experimentais, embora fosse possível observar ampliações na altura esperada, também havia ampliações inespecíficas com alguns alvos, mesmo alterando as condições de PCR. Porém, observou-se que as combinações de *primers* (para os genótipos zoonóticos e de animais) foram importantes para se obter melhores ampliações segundo a origem do material. No momento do desenho dos alvos, os programas de bioinformática não mostravam em sua listagem que tantos outros organismos pudessem também ser amplificados com a combinação de *primers* proposta em cada análise.
- Quando sequenciados os “*amplicons*” que estavam na altura correta confirmaram o diagnóstico de *Giardia duodenalis* e também o genótipo do protozoário, tanto nas amostras frescas quanto nos coprólitos experimentais.

Aplicação da metodologia padronizada no material arqueológico

Quando o desenho experimental delineado nas amostras modernas e coprólitos experimentais foram aplicados ao material arqueológico não tivemos o rendimento esperado. Como previsto, obtivemos mais amplificações com o alvo multicópia *gdh* do que com o alvo cópia única (*B-giardina*). Assim como já havíamos observado nas fezes frescas e coprólitos experimentais, amplificações inespecíficas também foram observadas no material arqueológico, mas também amplificações na altura esperada. Contudo, ao contrário do que ocorreu nas amostras modernas, quando as amplificações que estavam na altura correta foram sequenciadas e confirmaram ser de *G. intestinalis*, exceto para uma amostra arqueológica, as demais não eram o protozoário intestinal. A maioria das amplificações eram de outros organismos, incluindo bactérias específicas da região geográfica de onde as amostras foram coletadas. Observa-se a importância de DNA co-extraído exógeno à amostra, como no caso de organismos que estavam no solo e em contato direto com o coprólito, neste caso o DNA co-extraído de outros organismos pode ter competido desfavoravelmente mascarando eventuais amostras positivas para *Giardia duodenalis*, pois, ainda que amplificações inespecíficas tivessem sido observadas nas amostras modernas, mesmo assim o protozoário foi identificado, o que não ocorreu nas amostras arqueológicas. Ademais foram amplificados outros organismos que de fato poderiam ser endógenos à amostra, mas não correspondiam ao protozoário intestinal *G. duodenalis*.

Interpretando os diferentes resultados com o emprego de diferentes abordagens metodológicas

- Todas as amostras arqueológicas foram analisadas previamente pela microscopia, onde não foi possível a identificação de cistos do protozoário em nenhuma amostra. A análise de amostra recente que apresentava cistos do protozoário e posteriormente foi transformada em coprólito experimental, já havia mostrado as dificuldades de

se identificar os cistos do protozoário devido as drásticas alterações morfológicas causadas pela dessecação, a qual é um dos fatores primordiais para preservação da maioria dos coprólitos.

- Estas mesmas amostras arqueológicas passaram por ensaios de imunodiagnóstico: ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática) e Imunofluorescência, onde nem sempre os resultados foram concordes. O ELISA foi o método diagnóstico em que mais amostras foram identificadas como positivas para *Giardia duodenalis*; para imunofluorescência poucas amostras foram positivas e pelo diagnóstico molecular apenas uma.
- Fica evidente ao menos a importância de mais testes em modelos experimentais, na tentativa de avaliar falsos-positivos e falsos-negativos, considerando que amostras arqueológicas muitas vezes apresentam organismos incomuns a amostras recentes e que podem mascarar o desempenho de alguns métodos diagnósticos. Isso se torna ainda mais difícil de ser avaliado, pois faltam estudos em modelos experimentais e validações metodológicas até mesmo em material recente; ensaio em modelos experimentais também tem sido pouco explorados pela paleoparasitologia.

Principais conclusões

- Não temos como deixar de colocar como uma das conclusões algo que todos já concluíram nas mais diversas pesquisas com material antigo: a importância da utilização de diferentes abordagens metodológicas.
- O ensaio imunoenzimático ELISA é mais sensível para detectar o protozoário *Giardia duodenalis*, embora não permita a detecção dos isolados zoonóticos. É importante ressaltar que há possibilidade com este teste de falsos positivos, dada a discordância obtida entre as diferentes metodologias diagnósticas.

- Ainda que a metodologia molecular aplicada tenha sido capaz de detectar DNA do protozoário nos modelos experimentais, consideramos que ela teve um baixo rendimento quando aplicada ao material arqueológico, se de fato os resultados obtidos com o ELISA no material arqueológico não forem falso-positivos.
- Mesmo que os modelos experimentais sejam uma ótima alternativa e essenciais na padronização de metodologias, os materiais arqueológicos representam materiais únicos, podendo apresentar outros organismos que não são comuns ou encontrados em material recente. Consequentemente, estes não aparecerão nas análises de modelos experimentais, ou não serão percebidos ao se desenhar alvos moleculares diminuindo o nosso valor preditivo de eventuais problemas a serem enfrentados com as amostras antigas.

Porque este capítulo existe?

Pensamos que na maior parte das vezes nós, pesquisadores, optamos por só relatar aquilo que deu certo nas nossas pesquisas, ou suprimimos que foram necessários 10 ou mais tentativas até que se chegasse a um protocolo ideal ou satisfatório, ou muitas vezes não chegamos a esse protocolo, ou mesmo não reconhecemos que estávamos com um “desenho experimental” falho. Quantos de nós já não seguimos “à risca” aquela metodologia relatada em determinado artigo, e não conseguimos reproduzir aqueles resultados. Pensamos, portanto, que talvez esse seja o capítulo mais importante desse guia prático (e algumas vezes nada prático), e que sirva como um incentivo para que os demais pesquisadores relatem “as pedras no caminho” ou aquilo que não deu certo! Outros profissionais também podem estar passando pelos mesmos percalços ou ter tido resultados similares, e quem sabe aí não está justamente uma “nova ideia” ou inspiração para uma “nova pesquisa”?

Referências:

1. FRÍAS, Liesbeth. Protozoários intestinais em material arqueológico. Dissertação de Mestrado em Epidemiologia em Saúde. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca-Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
2. FRÍAS, Liesbeth et al. Studies on protozoa in ancient remains. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 108, n. 1, p. 1-12, fev. 2013.
3. MITCHELL, Piers et al. Dysentery in the crusader kingdom of Jerusalem: an ELISA analysis of two medieval latrines in the City of Acre (Israel). Journal Archaeological Science, v. 35, p. 1849-1853, 2008.

Estudo de material arqueológico altamente degradado: “sambaquis” como modelo experimental para recuperação de DNA parasitário

Autores:

1-Morgana Camacho, 1-Adauto Araújo*, 1-Sheila Mendonça,
2-Daniela Leles.

1- Fiocruz

2-Universidade Federal Fluminense

**in memoriam*

Sambaquis

Sambaquis são sítios arqueológicos que foram ocupados principalmente pelos primeiros habitantes do litoral brasileiro, mas há também sítios lacustres no interior. São “montes ou montanhas” construídas artificialmente pelos humanos, podendo ser de pequeno ou grande tamanho. Sua constituição em camadas é diversificada, mas em geral é composta por grande quantidade de ossos de peixes, conchas, dentre outros. Alguns foram usados para moradia, outros para enterramentos, portanto, não é incomum encontrar nestes sítios esqueletos humanos.

Dificuldades para o encontro de parasitos em sambaquis

Dependendo da dimensão do sítio haverá dificuldades para encontrar ou saber onde os parasitos poderiam estar. Como são sítios a céu aberto estão sujeitos a alterações abióticas como as variações climáticas como sol e chuva, e também a fatores bióticos, ação no solo de microrganismos e até mesmo de outros animais incluindo a espécie humana que tem entrado em contato com estes sítios mesmo após os primeiros anos de sua ocupação. Ou seja, tanto o solo quanto ossos encontrados nestes sítios podem estar altamente degradados, dependendo do tipo de análise que se queira fazer. Assim, não há relatos, por exemplo, que coprólitos já tenham sido encontrados nestes sítios, sendo necessários para o estudo de parasitos intestinais a análise do solo arqueológico presente na região pélvica de esqueletos quando estes estão presentes no sítio, ou no ambiente ao redor. No caso dos ossos, há também a possibilidade do estudo de parasitos teciduais ou sanguíneos. Portanto, não é surpreendente que existam poucos achados ou mesmo estudo de parasitos em sambaquis quando comparados a outros tipos de sítios arqueológicos.

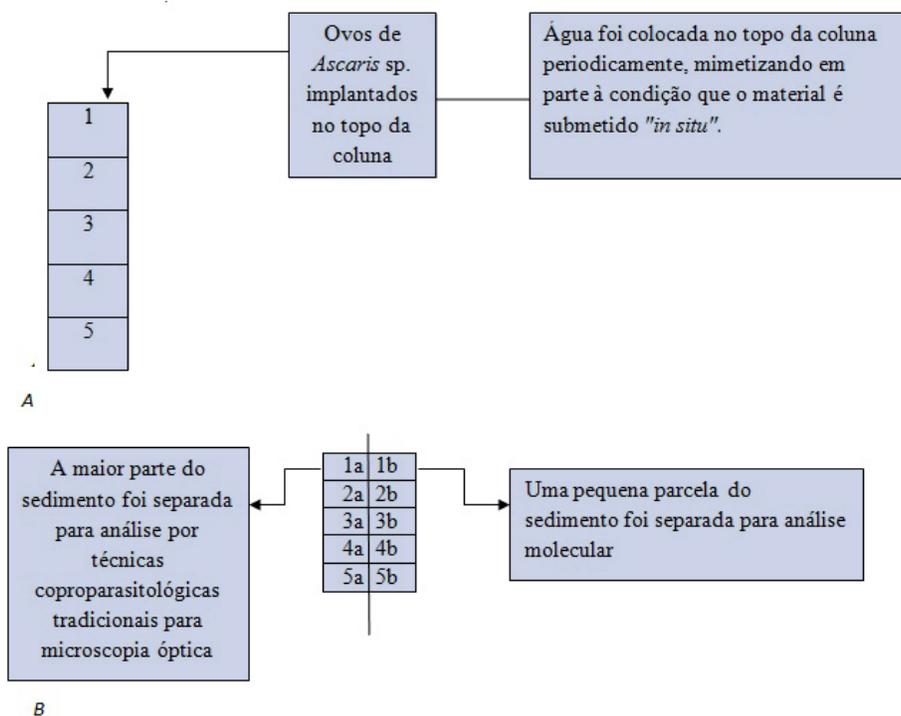
Autenticidade dos achados colocadas a prova

Para parasitos intestinais principalmente a estrutura parasitária, que poderá ser identificada pela paleoparasitologia, sairá nas fezes de seus hospedeiros. Por se tratar de sítios a céu aberto, animais ou o próprio homem que defequem no topo do sítio poderão contaminar o ambiente, sendo difícil estabelecer se isto ocorreu durante as primeiras ocupações do sítio ou em tempos recentes, considerando-se que com a ação da chuva este material pudesse percolar para camadas inferiores. A percolação do DNA para camadas inferiores já foi demonstrada em outras situações para outros tipos de sítios arqueológicos (Haile et al. 2007). Sendo assim, surgem dois problemas: a contaminação entre as próprias camadas antigas do sítio e entre as camadas antigas e material atual. É importante também ressaltar que, devido à grande parte dos parasitos intestinais também envolver o ciclo no

solo e sair nas fezes do hospedeiro, é difícil saber se a infecção estava no indivíduo ou se esta circulava no ambiente, exceto se você encontra o parasito em sedimento da região pélvica e não o encontra em material coletado ao redor do sepultamento (Sianto et al. 2013). Felizmente, em um modelo experimental não “*in situ*” Morgana Camacho, em sua dissertação de mestrado, verificou que a percolação de estruturas parasitárias não aconteceu, minimizando, portanto, as chances de contaminação das camadas mais antigas do sítio com material recente (Camacho 2013).

Desenho do experimento

Figura 1: Delineamento dos experimentos realizados com o sedimento proveniente do sambaqui.



Legenda Figura 1:

Na primeira etapa (A) foram removidos do sítio arqueológico (sambaqui) um pequeno perfil do solo, o qual foi retirado preservando suas camadas originais. Já no laboratório foi adicionado no topo deste perfil quantidade conhecida de ovos de *Ascaris* sp. (um helminto intestinal). Constantemente era adicionado água no topo deste perfil, simulando a ação da chuva. Para detalhes desse procedimento ver Camacho 2013.

Na segunda etapa (B), após passado o tempo estipulado para realização do experimento, a coluna foi aberta para remoção das diferentes camadas do perfil estratigráfico. Cada camada foi subdividida para análises microscópicas e moleculares.

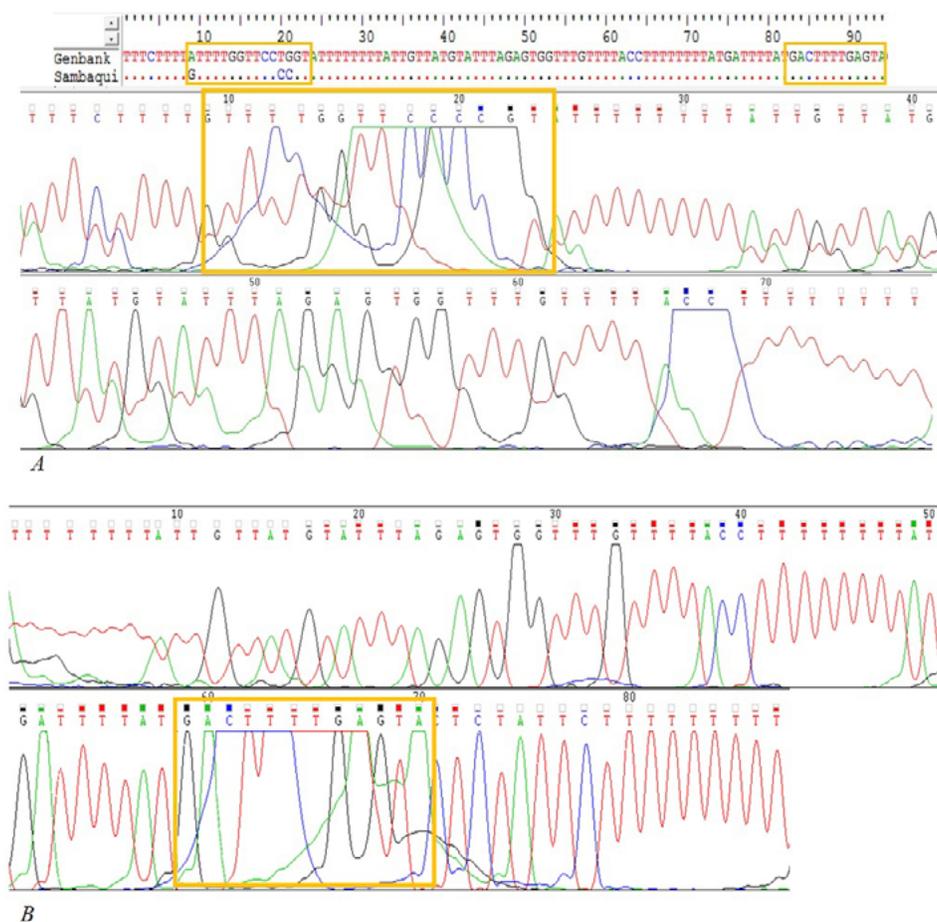
Metodologia

A metodologia aqui empregada foi a mesma descrita no capítulo 3 para coprólitos reidratados, porém com alvos específicos para *Ascaris* sp. (para condições da PCR ver Leles 2010).

Resultados

Neste capítulo descreveremos somente os resultados referentes à análise do DNA e não os microscópicos. Foi possível a recuperação de DNA antigo (aDNA) de *Ascaris* sp. de poucas amostras e todas correspondiam às camadas iniciais do perfil onde os ovos haviam sido colocados, mostrando que não houve migração do DNA parasitário para camadas inferiores. Porém, diferentemente do que estávamos acostumados, este tipo de amostra mostrou uma grande quantidade de inibidores de PCR, e quase todas as amostras precisaram de purificações adicionais, o que também encareceu a pesquisa. Adicionalmente a qualidade de algumas sequências ou trechos das sequências foram de baixa qualidade refletindo a natureza degradada do material (Figura 2).

Figura 2: Cromatograma de uma sequência nucleotídica de *Ascaris* recuperada do “sambaqui experimental”.



Interpretando a Figura 2:

- No alinhamento a sequência de *Ascaris* sp. recuperada do “sambaqui experimental” foi comparada a uma sequência de *Ascaris* sp. depositada no Genbank (número de acesso: X54253).
- Em A está representado o cromatograma obtido com o primer *reverse* e em B o obtido com o primer *forward*.

- Removido os primers da análise, podemos observar nas figuras A e B que, ainda que se tenha trechos bons para análise em outros (principalmente os marcados em amarelo), não é possível afirmar quais seriam as bases nucleotídicas corretas nestas posições.

Observações:

- Vale ressaltar que estratégias como, por exemplo, a clogagem do material ou repetição do sequenciamento e/ou PCR podem ser realizadas com o material para tentar se obter uma sequência de melhor qualidade.
- Normalmente o material antigo não fornece sequências com a mesma qualidade que o material moderno, mas este fato muitas vezes não impede sua análise e a identificação do agente etiológico. Porém, para o caso do material proveniente do “sambaqui experimental”, a quantidade de sequências de baixa qualidade foi mais recorrente do que observamos em estudos anteriores com material antigo.

Principais conclusões e dificuldades da pesquisa

- O ditado popular “procurar agulha no palheiro” talvez seja a máxima para este tipo de material no que diz respeito à pesquisa de DNA antigo principalmente de parasitos intestinais.
- Além do exposto acima, embora tenha sido demonstrado que o risco de contaminação com material moderno é limitado, a grande dificuldade do sambaqui continua a ser a autenticidade dos resultados, principalmente para os parasitos de transmissão fecal-oral.
- Por mais que o modelo experimental seja necessário, ele jamais conseguirá reproduzir a realidade do sambaqui, considerando-se principalmente a sua grande dimensão e inúmeras outras variáveis que deixam de ser consideradas em um experimento controlado.
- Contudo, como os paleoparasitologistas estão entre os profissionais mais otimistas, não queremos aqui desanimar aqueles que queiram estudar DNA parasitário em sambaquis, pois não é impossível sua recuperação e tanto este modelo experimental quanto outras pesquisas em paleoparasitologia molecular (Leles 2010) mostraram isso.

Referências:

1. CAMACHO, Morgana. Subsídios para a paleoparasitologia: avaliação da percolação de ovos de *Ascaris lumbricoides* e análise paleoparasitológica de sambaquis do Rio de Janeiro, Brasil. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz, 2013.
2. HAILE, James et al. Ancient DNA Chronology within Sediment Deposits: Are Paleobiological Reconstructions Possible and Is DNA Leaching a Factor? *Molecular Biology Evolution*, v. 24, n. 4, p.982-989, abr. 2007.
3. LELES, Daniela. Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer 1761). Doutorado em Saúde Pública. Rio de Janeiro. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca - Fundação Oswaldo Cruz, 2010.
4. SIANTO, Luciana et al. Coleta de amostras para exames paleoparasitológicos In:_____. Abordagens Estratégicas em Sambaquis. Erechin: Habilis, p. 251-260, 2013.

Capítulo 6:

Principais dificuldades encontradas no trabalho com DNA parasitário antigo

1- Autores: Elisa Pucu, Paula Cascardo e Daniela Leles

1- Universidade Federal Fluminense – RJ

Introdução

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

Conservação e degradação

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

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

Contaminação

Pré-contaminação

A pré-contaminação é considerada aqui desde o momento de deposição da amostra, escavação, até o início do estudo molecular. Talvez o tipo de contaminação que ocorreu em período anterior a escavação seja o mais difícil de prever ou identificar. Cuidados na manipulação de amostras, seja durante a escavação ou em laboratório, é especialmente crítico para estudos de aDNA humano (Pilli et al. 2013). Porém, na paleoparasitologia a intenção é recuperar o aDNA parasitário e por isso deve-se preocupar principalmente com a contaminação ambiental. É importante o uso de luvas (sem amido) durante a manipulação do material paleoparasitológico evitando contaminação deste com amido que poderia ser considerado como parte da dieta daqueles indivíduos, falseando os resultados, ou particularmente para ensaios de PCR em que pode agir como um inibidor da reação. Para coprólitos recomenda-se o armazenamento em ambientes secos ou congelados para evitar reidratação prematura e não controlada (Dittmar 2011).

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

Descontaminação

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

Pós-contaminação

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

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

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

Critérios para autenticação de resultados moleculares

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

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

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

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

Quadro: Modificado de Cooper & Poinar (2000)

Problemas na reação de PCR

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

Alvos moleculares e seus problemas

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

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

Conclusões finais

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

Perspectivas

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

Referências:

1. GOLENBERG, Edward et al. Effect of highly fragmented DNA on PCR. *Nucleic Acids Research*. v. 24, n. 24, p.5026-5033, 1996.
2. FULTON, Tara. Setting Up an Ancient DNA Laboratory. In: *Ancient DNA – Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Beth Shapiro, Michael Hofreiter, editors. New York: Publisher Humana Press, 840: 1-11, p. 247, 2012.

3. PÄÄBO, Svante et al. Genetic analyses from ancient DNA. *Annual Review of Genetics*, v.38, p. 645-679, 2004.
4. DITTMAR, Katharina. Paleoparasitologia e DNA antigo. In: *Fundamentos da Paleoparasitologia*. Luiz Fernando Ferreira, Karl Reinhard e Aduino Araújo (org). Editora FIOCRUZ. pp.287-299, 2011.
5. PRUVOST, Mélanie et al. Freshly excavated fossil bones are best for amplification of ancient DNA. *Proceedings Natural Academy Science USA*, v.104, n.3: 739-44, 2007.
6. PILLI, Elena et al. Monitoring DNA Contamination in Handled vs Directly Excavated Ancient Human Skeletal Remains. *PLOS ONE*, v.8, n.1, p.1-6, 2013.
7. SIANTO, Luciana et al. Coleta de amostras para exames paleoparasitológicos. In: *Abordagens Estratégicas em Sambaquis*. Madu Gaspar e Sheila Mendonça (org.). Erechin: Habilis, p. 251-260, 2013.
8. WILLERSLEV, Eske. Ancient DNA. *Proceedings of The Royal Society*, v.272, p. 3-16, 2005.
9. GILBERT, M. Thomas P. et al. Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *Journal of Archaeological Science*, v. 32, p. 785-793, 2005.
10. GILBERT, M. Thomas P. et al. Insights into the Processes behind the Contamination of Degraded Human Teeth and Bone Samples with Exogenous Sources of DNA. *International Journal of Osteoarchaeology*, v.16, p.156-164, 2006.
11. SAMPIETRO, María Lourdes et al. Tracking down Human Contamination in Ancient Human Teeth. *Molecular Biology and Evolution*, v.23, n.9, p.1801-1807, 2006.

12. COOPER, Alan et al. Ancient DNA: Do It Right or Not at All. *Science*, vol. 289 n.5482, p.1139, 2000.
13. HOFREITER, Michael et al. Ancient human DNA: phylogenetic applications. *Encyclopedia of the Human Genome*, p.1-4, 2003.
14. HANDT, Oliva et al. Ancient DNA: methodological challenges. *Experientia*, v.50, n.6, p. 524-529, 1994.
15. LEONARD, Jennifer A. et al. Animal DNA in PCR reagents plagues ancient DNA research. *Journal of Archaeological Science*, v.34, pp. 1361-1366, 2007.
16. BARNES, Ian et al. Evaluating bacterial pathogen DNA preservation in Museum osteological collections. *Proceedings of the Royal Society*, v.273, p.645-653, 2006.
17. HÄNSCH, Stephanie et al. The *pla* gene, encoding plasminogen activator, is not specific to *Yersinia pestis*. *BMC Research Notes*, vol. 8, p. 535, 2015.
18. LINDERHOLM, Anna. Ancient DNA: the next generation – chapter and verse. *Biological Journal of the Linnean Society*, v.117, p. 150-160, 2016.

