

FERNANDO SÉRGIO BARBOSA

POTENCIAL ZOONÓTICO DA ASCARIDIOSE HUMANA E
SUÍNA: ASPECTOS MOLECULARES, MORFOLÓGICOS E
FILOGENÉTICOS DAS ESPÉCIES
Ascaris lumbricoides e *Ascaris suum*

Belo Horizonte

2015

FERNANDO SÉRGIO BARBOSA

POTENCIAL ZOONÓTICO DA ASCARIDIOSE HUMANA E
SUÍNA: ASPECTOS MOLECULARES, MORFOLÓGICOS E
FILOGENÉTICOS DAS ESPÉCIES
Ascaris lumbricoides e *Ascaris suum*

Trabalho de tese apresentado ao programa de
Pós - Graduação em Parasitologia do
Departamento de Parasitologia do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Helminologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Belo Horizonte

2015

Tese desenvolvida no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

À minha família

AGRADECIMENTOS

À minha família que me apoiou durante toda essa caminhada: Minha mãe, Lina Maria Nogueira Barbosa e meu pai José Barbosa. A Mariana Teixeira de Faria pelo amor, carinho, paciência e que em muitas vezes me auxiliou em experimentos, ficando sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e aconselhando. Aos irmãos, José Barbosa Júnior, Jeferson Alcântara Barbosa, Denise Cristina Nogueira Barbosa e Daniele Alcântara Barbosa; minhas sobrinhas, Bruna, Júlia, Lívia e Isabela, meu sobrinho Arthur; minhas cunhadas Daniela e Jú. Meus cunhados Marcelo e Léo. A toda minha família, que mesmo eu estando ausente em vários momentos, sempre me deu força e estímulo.

Ao meu orientador, Ricardo Toshio Fujiwara, pela liberdade e oportunidade para minha formação científica, suas opiniões, discussões e disponibilidade para a realização deste estudo.

Ao grande amigo Sebastião Ferreira, pelo companheirismo, ajuda, pelas opiniões sinceras e pelos momentos de descontração.

A amiga Michele Matos pela ajuda no laboratório e sua disponibilidade em resolver problemas a qualquer momento.

Ao amigo Thiago Mendes, pela disponibilidade, auxílio em alguns experimentos e discussões científicas compartilhadas durante minha permanência no laboratório.

A amiga Natália Satchiko, pela disposição e ajuda em alguns experimentos deste estudo.

Aos amigos do “Grupo *Ascaris*”: Chiara Amorim, Denise Nogueira, Nathália Resende, Luciana Maria, Pedro Gazzinelli, Pedro Filogônio, Ana Gazzinelli, Caroline Cavalcanti e Flaviane Nunes pelos momentos agradáveis, apoio, ajuda inigualável, competência nos experimentos, auxílio e discussões construtivas. Sinto-me privilegiado por fazer parte deste grupo.

Ao amigo Hugo pelo apoio, ajuda e descontração.

Ao amigo Lucas, pelas conversas agradáveis em momentos difíceis.

Aos amigos de Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos da UFMG, pela atenção e carinho durante o período que permaneci no laboratório. Foi maravilhoso conviver com vocês.

Aos amigos e colaboradores Nathália, Danielly, Jeannelly, Lucas, Áurea, Douglas, Rogério e Sérgio, pelo auxílio nas infecções experimentais em suínos e sua dedicação.

Ao prefeito de Iguatama – MG, Leonardo Muniz, e aos diretores da Faculdade de Iguatama – MG, Stênio Rosa e Marcos Cunha pela colaboração e apoio.

Aos moradores de Iguatama que contribuíram para parte deste trabalho.

Aos amigos de Iguatama que de alguma forma incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

As amigas Sumara Ferreira e Sibele Abreu, pelo carinho, amizade e disponibilidade em resolver problemas a qualquer momento.

Aos amigos do curso de Pós Graduação em Parasitologia da UFMG, pelos inigualáveis momentos de descontração, que nossa cooperação e amizade se prolonguem por muitos anos.

Aos professores do curso de Pós Graduação em Parasitologia da UFMG, que contribuíram pelo meu aprendizado e formação.

A Capes pela concessão da bolsa de Doutorado.

Aos amigos do Departamento de Parasitologia da UFMG e as memoráveis conversas agradáveis.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, na pessoa de seu atual coordenador Professor Dr. Ricardo Toshio Fujiwara, pela oportunidade para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente na execução e conclusão desta etapa, muito obrigado.

RESUMO

Ascaris lumbricoides, Linnaeus, 1758 e *Ascaris suum*, Goeze, 1782, são nematódeos parasitos que foram descritos primariamente infectando humanos e suínos respectivamente. *A. lumbricoides* é o parasito mais prevalente em seres humanos, constituindo um grave problema de saúde pública, principalmente em países subdesenvolvidos. Já *A. suum* é considerado o helminto mais importante em suínos, causando perda de peso e atraso no crescimento destes animais. Embora *A. lumbricoides* e *A. suum* infectem preferencialmente e respectivamente humanos e suínos, a natureza zoonótica destes parasitos não está esclarecida. Neste contexto, o presente trabalho objetivou diferenciar estes parasitos pelos seus aspectos morfológicos e moleculares, avaliar a infecção natural de humanos por *A. suum* e analisar a filogenia destes parasitos em diferentes regiões do Brasil e em Lima, no Peru. Além disso, o trabalho também objetivou avaliar o potencial da infecção de suínos por *A. lumbricoides* e a infecção em humanos por *A. suum*. Para análise morfológica das espécies, dentículos serrilhados presentes na borda dos lábios foram analisados por microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. Foi observado que os dentículos presentes em *A. lumbricoides* apresentam extremidades côncavas, enquanto em *A. suum* apresentam extremidades triangulares. Para análise molecular foram desenhados iniciadores específicos para os genes mitocondriais COXI e Its1 de *Ascaris* spp., que permitiram, após amplificação dos segmentos esperados, diferenciar *A. lumbricoides* de *A. suum*. Para o encontro de humanos naturalmente infectados por *A. suum*, foram visitadas residências próximas a criadores de suínos e amostras de fezes destes moradores foram coletadas. Após análise morfológica e molecular dos parasitos, foi constatada a infecção de um indivíduo por *A. suum*. Finalmente, a análise filogenética dos exemplares coletados demonstrou a homogeneidade entre as duas espécies. Os resultados observados no presente trabalho contribuem para a distinção das espécies que podem acometer o ser humano e principalmente, para a compreensão da epidemiologia desta parasitose.

Palavras chave: *Ascaris* spp.; molecular; morfologia; infecção; suínos; humanos.

ABSTRACT

Ascaris lumbricoides, Linnaeus, 1759 and *Ascaris suum*, Goeze, 1782, are nematode parasites that were described primarily infecting humans and swines. *A. lumbricoides* it is the most prevalent parasite in humans, and it is part of a severe public health, mainly in subdeveloped countries. Already *A. suum* is considered one of the most important helminthes in swines, causing loss of weight and late development of those animals. Although *A. lumbricoides* and *A. suum* infect preferably and respectively humans and swines, the zoonotic nature of those parasites is not clarified. On this context, the current research aimed differ those parasites through and morphologic and molecular aspects, evaluate the natural infection of humans by *A. suum* and analyze the phylogeny of those parasites in different regions of Brazil and in Lima, Peru. Furthermore, the research also aimed to evaluate the potential of swine experimental infection by *A. lumbricoides* and human experimental infection by *A. suum*. In the morphological analysis of those parasites, the serrated denticles present on the edge of the parasite lips were analyzed in scanning electron microscopy and optical microscopy. It was observed that the serrated denticles in *A. lumbricoides* presented concave extremities and in *A. suum* the denticles presented triangular extremities. In the molecular analysis was drawn specific primers for the mitochondrial genes COXI and ITS1 of *Ascaris* spp., which allowed , after amplification of the expected segments, differentiate *A. lumbricoides* of *A. suum*. In the process of finding humans naturally infected by *A. suum*, residences nearly swines farms were visited and samples of faeces from the dwellers were collected. After morphological and molecular analysis of parasites, it was found that one individual was infected with *A. suum*. Finally, phylogenetic analysis of the collected specimens demonstrated homogeneity between the two species. The results observed in this study contribute to the distinction of the species that can affect humans and especially, for the understanding of the epidemiology of parasitosis.

Key words: *Ascaris* spp.; molecular; morphology; infection; swines; humans.

LISTA DE ABREVIATURAS

AM: Amazonas
Al: *Ascaris lumbricoides*
As: *Ascaris suum*
BA: Bahia
C: Controle
CAI: Controle *Ascaris lumbricoides*
CAs: Controle *Ascaris suum*
CDC: Centro para Controle de Doenças
CE: Ceará
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
COXI: Citocromo oxidase
DPI: Dias pós a infecção
EUA: Estados Unidos da América
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial
ITS1: Espaço interno transcrito
Kb: Marcador de peso molecular
L1: Larva de primeiro estágio
L2: Larva de segundo estágio
L3: Larva de terceiro estágio
L4: Larva de quarto estágio
MG: Minas Gerais
MT: Mato Grosso
mtDNA: DNA mitocondrial
OMS: Organização Mundial de Saúde
OPG: Ovos por grama de fezes
pb: Pares de base
PB: Paraíba
PBS: Tampão fosfato de sódio
PNSB: Pesquisa Nacional de Saneamento Básico

pH: Potencial hidrogênico

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RS: Rio Grande do Sul

sp.: Espécie

SP: São Paulo

TO: Tocantins

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Distribuição geográfica da ascaridiose e prevalências mundiais (Cavallero et al. 2013).....21
- Figura 2: Ciclo biológico de *A. lumbricoides*: Adaptado do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Image_Library.htm.....24
- Figura 3: Processo para obtenção de ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum* (a, b): Parasito, (c): Parasito fixado nas extremidades, (d): Corte longitudinal do parasito, (e): Retirada do útero, (f, g): Maceração do útero, (h): Processo para purificação dos ovos em Tamis, (i): Ovos em garrafa de cultura contendo ácido sulfúrico a 0,2 molar.....32
- Figura 4: (a): Baias teladas onde os animais foram mantidos durante os experimentos, (b): Animais mantidos na baia durante o experimento.....37
- Figura 5: Diferenças morfológicas e moleculares entre *A. lumbricoides* e *A. suum* (a, b, c): Morfologia dos dentículos de *A. suum* em microscopia eletrônica de varredura, apresentando extremidades triangulares, (d, e, f): Morfologia dos dentículos em microscopia eletrônica de varredura de *A. lumbricoides*, apresentando bordas côncavas, (g): Morfologia dos dentículos em microscopia óptica de *A. lumbricoides*, apresentando bordas côncavas, (h): Morfologia dos dentículos em microscopia óptica de *A. suum*, apresentando bordas triangulares, (i): Desenho em câmera clara, em detalhe região onde foi realizado o corte para análise dos dentículos, (j): Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando primer IST1 (primer 2), (k): Gel de agarose utilizando primer IST1 (primer 1), (l): Gel de agarose, primer COXI.....43
- Figura 6: (a): Mapa do Brasil, em destaque o Estado de Minas Gerais. Em vermelho o município de Iguatama e a casa onde moradores criavam suínos no peridomicílio, onde foi encontrado humanos naturalmente infectados por *A. suum*, (b): Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando primer IST1 (primer 2), sendo possível observar a diferença entre as espécies de *Ascaris* sp. Canaleta 1: Marcador de peso molecular de 1kb, canaleta 2:

Controle negativo, canaleta 3: Controle de *A. lumbricoides*, canaleta 4: Controle de *A. suum*, nas três canaletas seguintes, parasito com perfil molecular de *A. lumbricoides*, recuperados do primeiro indivíduo, nas duas canaletas seguintes, parasito com perfil molecular de *A. lumbricoides* recuperados do segundo indivíduo, nas cinco últimas canaletas, parasito com perfil molecular de *A. suum*, recuperados do terceiro indivíduo, (c): Parasito recuperado no primeiro paciente, morfologia dos dentículos, em microscopia óptica, apresentando bordas côncavas típico da espécie *A. lumbricoides*, (d): Parasito recuperado no segundo paciente, morfologia dos dentículos, em microscopia óptica, apresentando bordas côncavas típico da espécie *A. lumbricoides*, (e): Parasito recuperado no terceiro paciente, morfologia dos dentículos, em microscopia óptica, apresentando bordas triangulares típico da espécie *A. suum*.....45

Figura 7: Análise filogenética árvore de Neighbor-Joining de parasitos recuperados das infecções experimentais em suínos (a): Utilizando o primer COXI, (b): Utilizando a região ITS1 (primer 1), (c): Utilizando a região ITS1 (primer 2) Al = *A. lumbricoides* As = *A. suum*.....48

Figura 8: Locais onde foram recuperados parasitos em suínos naturalmente infectados por *Ascaris* sp. Em verde, o mapa do Brasil em destaque as cidades brasileiras onde foram obtidas as amostras, sendo: Manaus (AM), Palmas (TO), Barra do Garças (MT), Belo Horizonte (MG), Contagem (MG), Formiga (MG), Arcos (MG), Iguatama (MG) e Porto Alegre (RS). Em amarelo o mapa do Peru, em destaque a cidade de Lima.....49

Figura 9: Análise filogenética; árvore de Neighbor-Joining de parasitos recuperados de diferentes localidades e dos parasitos recuperados dos suínos infectados experimentalmente. (a): Utilizando a região COXI, (b): Utilizando a região ITS1 (primer 2). Al = *A. lumbricoides* As = *A. suum*.....50

Figura 10: Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando a região ITS1 (primer 2), demonstrando os parasitos recuperados em diferentes localidades em suínos naturalmente infectados. Canaleta 1: Peso molecular de 1kb, canaleta 2: Controle negativo, canaleta 3: Controle de *A. lumbricoides*, canaleta 4: Controle de *A. suum*, nas canaletas seguintes amostras recolhidas em Manaus (AM), Palmas (TO), Barra do Garças (MT), Contagem (MG), Belo Horizonte (MG), Formiga (MG), Iguatama (MG), Arcos(MG), Porto

Alegre (RS), (Brasil) e de Lima no Peru, respectivamente. Todas as amostras foram identificadas com o mesmo perfil molecular da espécie *A. suum*.....51

Figura 11: (a-d) Raio x de tórax demonstrando a migração pulmonar das larvas nos indivíduos após o décimo segundo dia de infecção com ovos embrionados de *A. suum*. Notar infiltrado celular do interstício peribroncovascular devido à migração pulmonar das larvas.....53

Figura 12: Período em relação aos dias e a sintomatologia dos voluntários, infectados com ovos embrionados de *A. suum*.....54

Figura 13: Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando o Primer ITS1 (Primer 2), demonstrando o perfil dos parasitos recuperados em infecções de humanos experimentalmente infectados com ovos embrionados de *A. suum*. Na canaleta1: Peso molecular de 1kb, na canaleta 2: Controle negativo, na canaleta 3: Controle da espécie *A. lumbricoides*, na canaleta 4: Controle da espécie *A. suum*, na canaleta 5: Parasito recuperado do voluntário “A”, na canaleta 6: Parasito recuperado do voluntário “B”, na canaleta 7: Parasito recuperado do voluntário “C”, na canaleta 5: Parasito recuperado do voluntário “D”. Todas as amostras obtidas apresentavam perfil molecular referente a espécie *A. suum*.....55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Percentual de domicílios atendidos por rede geral de esgoto, em ordem decrescente, segundo as Unidades da Federação (IBGE, 2010).....22

Gráfico 2: (a): Peso dos suínos em relação a idade: Aos 30 dias de idade, aos 50 dias¹ de idade, quando os animais foram infectados, exceto o grupo controle, aos 60 dias² de idade, quando os animais estavam com dez dias de infecção, e aos 98 dias³ de idade, quando os animais estavam infectados à quarenta e oito dias, (b): Período pré patente dos suínos infectados experimentalmente, utilizando ovos embrionados de *A. lumbricoides* e *A. suum*, e ovos misto (c): Ovos recuperados por grama de fezes, método de Kato-Katz, dos suínos infectados experimentalmente, com ovos embrionados de *A. lumbricoides* e *A. suum*, (d): Parasitos recuperados nas infecções experimentais em suínos, utilizando ovos embrionados de *A. lumbricoides*, *A. suum* e ovos mistos.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição da infecção por parasitos na população, dividido por gênero, dos pacientes analisados em Iguatama, MG.....	44
Tabela 2: Espécies de parasitos encontrados em exames parasitológico de fezes, pelo método de sedimentação espontânea, na amostra de residentes de Iguatama, MG, em 2015.....	44
Tabela 3: Parasitos recuperados nas infecções humanas por <i>A. suum</i> e número de ovos por grama de fezes (OPG).....	55

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Iniciadores específicos, desenhados para os genes COXI E ITS1 de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> utilizados nos estudos experimentais para a identificação molecular destas espécies.....	33
---	----

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Géis de agarose 1%, corados com brometo de etídio e perfil molecular dos parasitos recuperados na infecção experimental mista (ovos embrionados de <i>A. lumbricoides</i> e de <i>A. suum</i>).....	76
Apêndice 2: Microscopia óptica dos dentículos de <i>Ascaris</i> sp. recuperados nas infecções experimentais mistas (ovos embrionados de <i>A. lumbricoides</i> e de <i>A. suum</i>).....	77
Apêndice 3: Planilha confeccionada para os voluntários infectados experimentalmente com ovos embrionados de <i>A. suum</i> , para anotação de sinais clínicos após a infecção.....	78
Apêndice 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, participantes maiores de 18 anos.....	79
Apêndice 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, participantes de 06 a 17 anos.....	83
Apêndice 6: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, participantes de 02 a 06 anos.....	87

LISTA DE ANEXO

Anexo 1: Depósito de Patente “Composições, processo, uso e kit para identificação e diferenciação molecular de duas espécies do gênero <i>Ascaris</i> ”	91
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Obtenção de parasitos <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i>	30
4.2 Obtenção de ovos de <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i>	30
4.2.1 Purificação dos ovos para infecções experimentais.....	31
4.3 Identificação dos parasitos.....	33
4.3.1 Identificação molecular dos parasitos.....	33
4.3.2 Identificação morfológica pela microscopia óptica.....	34
4.3.3 Identificação morfológica pela microscopia eletrônica de varredura.....	34
4.4 Coleta de parasitos em humanos naturalmente infectados.....	35
4.5 Sequenciamento do DNA e análise filogenética.....	36
4.6 Infecção experimental em suínos.....	36
4.6.1 Recuperação de parasitos em suínos experimentalmente infectados.....	38
4.7 Recuperação de parasitos em animais naturalmente infectados.....	38
4.8 Infecção experimental em humanos utilizando ovos embrionados de <i>A. suum</i>	38
4.8.1 Recuperação de parasitos em humanos experimentalmente infectados.....	39
4.9 Análises estatísticas.....	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1CAPÍTULO 1.....	42
5.1.1 Identificação morfológica e molecular de <i>Ascaris</i> sp.....	42
5.1.2 Infecção natural em humanos por <i>Ascaris</i> sp. e recuperação dos parasitos, para a identificação molecular da espécies encontradas.....	44

5.1.3 Infecção experimental em suínos.....	46
5.2 CAPÍTULO 2.....	48
5.2.1 Análise filogenética de parasitos recuperados nas infecções experimentais em suínos.....	48
5.2.2 Análise filogenética de parasitos recuperados em diferentes cidades do Brasil, e em Lima, no Peru e dos parasitos recuperados nas infecções experimentais em suínos.....	49
5.3 CAPÍTULO 3.....	52
5.3.1 Infecção experimental em humanos.....	52
5.3.2 Análise molecular dos parasitos recuperados em infecções experimentais em humanos.....	55
6. DISCUSSÃO.....	56
7. CONCLUSÕES.....	63
8. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Dentre os parasitos intestinais, *Ascaris lumbricoides*, Linnaeus, 1758, está entre os mais prevalentes em seres humanos; estima-se que mais de um bilhão de pessoas estejam infectadas (Shao et al. 2014). Os índices mais elevados de infecção por *A. lumbricoides* ocorrem no sudeste da Ásia, África, sul da Índia, América Central e algumas regiões da América do Sul (Cavallero et al. 2013) (Figura 1). Mesmo com elevada prevalência, muitas vezes a ascaridiose não é considerada prioritária pelas autoridades de saúde, sendo considerada uma parasitose negligenciada. Esta parasitose, porém, constitui um grande problema de saúde pública, particularmente em países subdesenvolvidos, onde a alta prevalência é decorrente das más condições de vida em camadas populacionais mais carentes, contribuindo negativamente para problemas econômicos, sociais e médicos (Fonseca et al. 2010, Frei et al. 2008, Silva et al. 2012).

Diversos fatores podem interferir na prevalência da ascaridiose, como a área geográfica, hábitos de higiene da população, nível socioeconômico, acessibilidade a bens de serviço, idade e predisposição à infecção parasitária (Andreazzi et al. 2007, Campos et al. 2002, Ferreira et al. 2006). Estudos em escolares e em moradores de bairros periféricos de cidades do Brasil como em Crato CE, Salvador e Barreiras BA, e Campina Grande PB, demonstram altas prevalências do parasito associadas à baixa renda, falta de escolaridade e precárias condições de vida (Ferreira et al. 2013, Silva et al. 2010, Vasconcelos et al. 2011). As crianças são as mais acometidas apresentando repercussões clínicas mais significantes, associadas à desnutrição, comprometendo o desenvolvimento físico e intelectual da faixa etária mais jovem da população (Campos et al. 2002, Seixas et al. 2011, Silva et al. 2011). Estudos mostram que além da idade, o número de pessoas que vivem em um domicílio e a relação do grau de estudo é fator importante na determinação da distribuição do parasito entre famílias, pois o nível de educação é decisivo em qualquer contexto para evitar a contaminação no que se refere às condições de higiene ao apontá-las como importante fator de risco (Ludwig et al. 1999, Tshikuka et al. 1995).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o saneamento básico como medidas prioritárias para a saúde pública e os investimentos nesta área representam uma economia em gastos com prestações de saúde. A oferta de saneamento básico é fundamental para a qualidade de vida, pois sua ausência acarreta em poluição do meio ambiente, trazendo

prejuízo à saúde da população, principalmente o aumento da morbidade infantil (Barbosa, 2010). A alta prevalência de *A. lumbricoides* é considerada indicativa de saneamento básico inadequado, comumente observado em áreas rurais (Ferreira et al. 1991). Medidas de saneamento foram responsáveis pelo declínio de sua incidência em algumas regiões, entretanto, pode haver reinfecções, representando um problema de saúde pública, sendo frequentes relatos desta parasitose em áreas urbanas semelhantes ou mesmo superior a de áreas rurais (Ferreira et al. 1991).

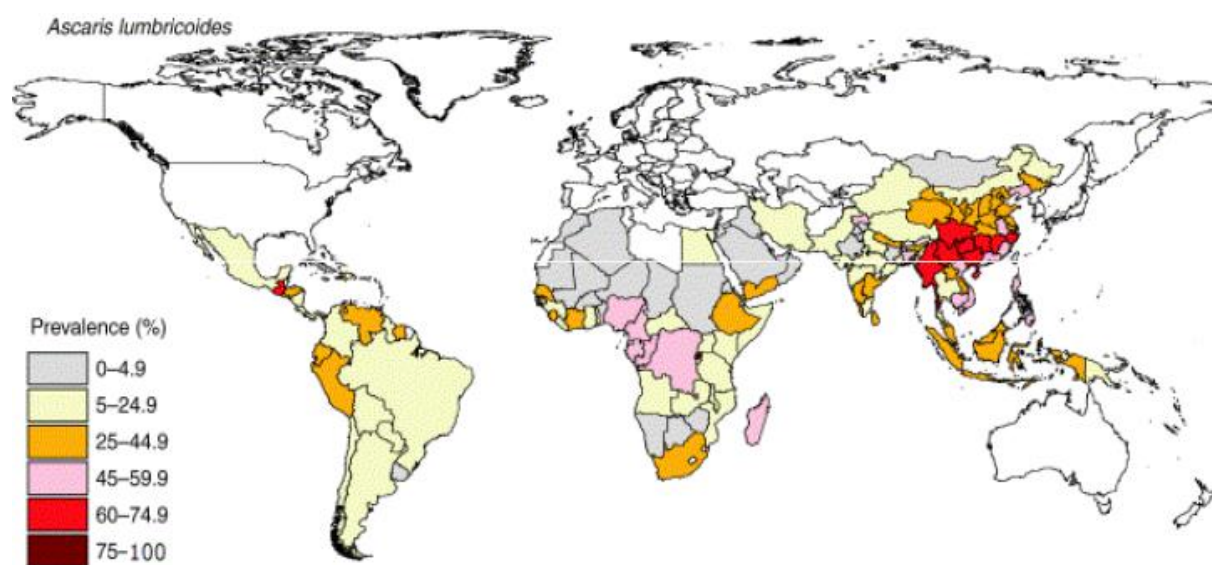


Figura 1: Distribuição geográfica da ascaridiose e prevalências mundiais (Cavallero et al. 2013) .

No Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, PNSB (2010), dos municípios brasileiros 55,2% contam com serviço de esgotamento sanitário por rede coletora, sendo a maioria concentrada na região sudeste, onde 69,8% dos domicílios tem acesso à rede geral de esgoto, a região Centro Oeste 33,7%, a região Sul 30,2%, no Nordeste 22,4% e a região Norte apenas 3,8% tem acesso a este serviço (IBGE, 2010). Porém, apenas 10% do total de esgotos produzidos recebem algum tratamento, ou seja, 90% são despejados *in natura* nos solos, rios, córregos e nascentes, constituindo a maior fonte de degradação do meio ambiente e de proliferação de doenças infecciosas e parasitárias dentre elas a ascaridiose (Santos et al. 2010).

Como a infecção causada por *Ascaris* spp. tem o ciclo de transmissão fecal-oral, boas condições de saneamento básico e higiene pessoal são essenciais para seu controle, uma vez que a falta de saneamento básico está diretamente relacionada não só a ascaridiose, mas também a epidemiologia de diversas doenças parasitárias (Busato et al. 2014, Giatti et al.

2004). No gráfico 1 é possível observar o percentual de domicílios com oferta de saneamento básico por estados no Brasil. Quanto menor a oferta de saneamento básico, maior é o índice epidemiológico de doenças parasitárias (IBGE, 2010). Ludwig et al. (1999), realizaram o levantamento parasitológico em moradores na cidade de Assis SP, correlacionando as condições de saneamento básico à ocorrência de parasitoses intestinais, encontrando uma prevalência geral de 23,3%. Os autores estabeleceram uma relação entre as condições de saneamento básico, expressos pelo número de ligações de água e esgoto e a frequência de parasitoses. Houve queda na frequência de parasitoses, coincidindo com o aumento do número de ligações de água e esgoto nestas regiões (Ludwig et al. 1999). De um modo geral, foi verificado um decréscimo na prevalência de enteroparitoses no período analisado. De fato quando ocorre um aumento da estrutura relacionado a rede de esgoto as doenças parasitárias decaem (Ferreira & Andrade, 2005, Lopes et al. 2014, Oliveira & Chiuchetta, 2010).

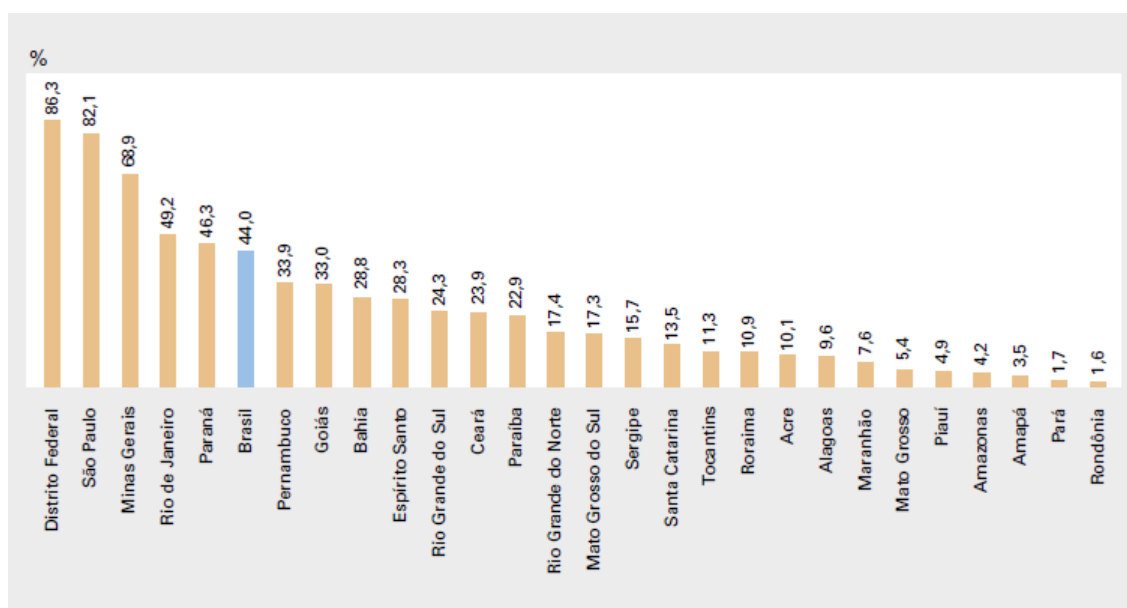


Gráfico 1: Percentual de domicílios atendidos por rede geral de esgoto, em ordem decrescente, segundo os Estados da Federação (IBGE, 2010).

Outro fator preocupante está relacionado a inundações. Como na maioria dos municípios brasileiros o esgoto não é tratado, quando ocorre inundações ou alagamentos há um aumento de parasitoses, dentre elas *Ascaris* sp. (Barbosa, 2010). Como a infecção por *Ascaris* sp. ocorre pela ingestão de ovos embrionados procedentes do solo, água ou alimentos contaminados (Massara et al. 2003), as inundações também podem estar envolvidas nas infecções de humanos, caso estes indivíduos utilizem desta água para o consumo. Todos estes fatores contribuem para o ciclo biológico do *Ascaris* sp., pois a elevada prevalência envolve

fundamentalmente o setor da população que vive em precárias condições de saneamento, por razões socioeconômicas e culturais (Chieffi et al. 1988).

O ambiente também exerce um importante papel na transmissão de *Ascaris* sp., uma vez que seus ovos são eliminados junto com as fezes e ainda não apresentam capacidade de infecção, que só é adquirida após o processo evolutivo que dura cerca de três semanas, necessitando para isso locais úmidos, quentes e sombreados, pela qual a água e alimentos podem ser contaminados, e, se ingeridos pode acarretar na infecção (Campos et al. 2002).

O ciclo biológico de *A. lumbricoides* (Figura 2) ocorre quando humanos ingerem ovos embrionados contendo no seu interior larvas de terceiro estágio, principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados (Costa-Macedo et al. 1999). A eclosão da larva ocorre no intestino delgado devido a fatores e estímulos do hospedeiro, como pH, temperatura, sais, umidade e concentração de dióxido de carbono. Após a eclosão, as larvas de terceiro estágio migram pelos tecidos do hospedeiro suscetível. Nesse percurso as larvas passam por mudas ocorrendo transformações fisiológicas e morfológicas (Hunter & McKay, 2004). As larvas migram pelo fígado, posteriormente pelos pulmões, onde passam para o estágio de L4 e são carregadas por movimentos ciliares e pelo muco, ascendem pela árvore brônquica, caso sejam deglutidas alcançam o trato gastrointestinal, se desenvolvem em adultos, preferencialmente no jejuno e íleo (Yetim et al. 2009). As fêmeas geralmente são maiores que os machos e podem medir até 40 cm, já os machos chegam a 25 cm de comprimento. Após 8 a 11 semanas da ingestão das formas infectantes, é possível observar a presença de ovos nas fezes, sendo que cada fêmea pode ovipor até duzentos mil ovos por dia. O embrionamento ocorre no meio ambiente, onde a larva passa pelos estádios L1, L2 e L3, tornando-se infectante (Coelho et al. 2001, Ferreira et al. 1991).

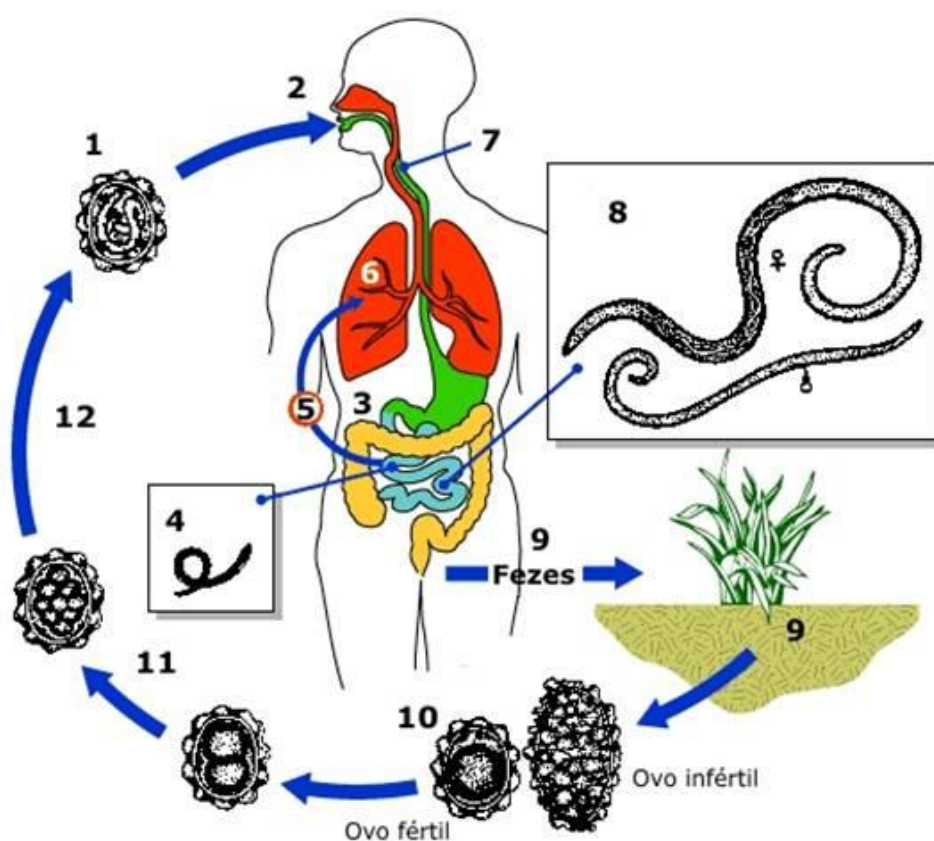


Figura 2: Ciclo biológico do *A. lumbricoides*: Adaptado do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Image_Library.htm.

(1): Ovo embrionado infectante contendo larva L3, (2): Ingestão do ovo, (3): Eclosão e liberação da larva, (4): Invasão da larva pela mucosa intestinal, (5): Carreamento da larva pelo sistema porta, (6): Larva nos pulmões e transformação para larva L4, (7): Larva ascende a árvore brônquica sendo deglutida, (8): Parasitos jovens no intestino delgado onde se desenvolvem em adultos, e acasalam, (9): Fêmea começa a postura de ovos para serem eliminados junto as fezes, para o embrião no meio ambiente (10): Ovo infértil (direita) e ovo fértil (esquerda), (11): Ovo L1, (12): Ovo L2.

A ação patogênica deste parasito pode estar envolvida na fase de invasão larvária, onde as lesões traumáticas produzidas pela ação das larvas no parênquima hepático irão causar focos hemorrágicos e necrose, bem como reação inflamatória, levando em alguns casos, aumento do volume do fígado (Jesus et al. 2008). Nos pulmões as reações são mais pronunciadas, com pontos hemorrágicos, causado pela passagem das larvas dos capilares para os alvéolos. As paredes do órgão apresentam edemas inflamatórios com grande infiltrado de linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, descamação do epitélio alveolar e presença de exsudato nos alvéolos, assim como bronquíolos dilatados, que podem levar a uma pneumonite difusa, podendo ser fatal em crianças ou pessoas com hipersensibilidade (Jesus et al. 2008).

As complicações da ascaridiose são mais prováveis em infestações maciças. Em áreas endêmicas causa 27% dos episódios de sub oclusão intestinal e 77% dos problemas bilio pancreáticos (Malik et al. 2006). A infecção hepato biliar é típica de pré-escolares e soma 30% dos casos de ascaridiose complicada na infância, 6% dos casos requerem intervenção cirúrgica ou endoscópica (Costa-Macedo et al. 1999). Os parasitos nas vias biliares podem causar obstrução mecânica, espasmo do esfíncter de Oddi, inflamação e estenose. A migração biliar dos parasitos está relacionada a uma alta carga parasitária, sendo a apresentação mais comum a cólica biliar. As formas complexas colangite, colecistite, obstrução de vias biliares, abscesso hepático, colilitíase e pancreatite são menos comuns (Jesus et al. 2004). Os parasitos adultos podem causar desconforto abdominal, náusea e insônia. Em infecções por muitos parasitos ocorre uma redução da absorção de ferro e vitaminas, além de poder causar uma obstrução intestinal ou peritonite com perfuração do intestino. A capacidade de migração dos parasitos pode ocorrer, invadindo as vias biliares e o canal pancreático, sendo geralmente fatal em crianças. Os parasitos podem ainda ser expelidos por orifícios do corpo (Villamizar et al. 1996).

Outra espécie dentro do gênero *Ascaris* é *A. suum*, Goeze, 1782, que tem suínos como hospedeiros definitivos, sendo uma das helmintoses mais importantes nestes animais, causando prejuízos, devido à perda de peso, atraso no crescimento, perdas reprodutivas, rejeição para consumo de fígado e pulmões, devido às migrações das larvas (Frontera et al. 2005). O ciclo biológico de *A. suum* é semelhante ao de *A. lumbricoides* (Darawshe et al. 1987). As infecções por *A. suum* em suínos podem causar efeitos similares à infecção de humanos por *A. lumbricoides*. As formas larvares retidas no fígado, devido a ação irritativa, podem levar a focos de hepatite crônica, nos pulmões as larvas podem levar a lesões alveolares, com formação de edemas e hepatização com infecções secundárias (Mejer & Roepstorff, 2006). Os parasitos adultos além de competir com o hospedeiro por nutrientes, podem causar obstrução intestinal, reduzir o crescimento devido a conversão alimentar, levando o animal à morte (Frontera et al. 2005, Hale et al. 1985). A persistência desse parasito entre os suínos deve-se principalmente a capacidade de resistência dos ovos no meio ambiente, onde pode ocorrer a reinfecção dos animais (Lignon et al. 1985). A limpeza das instalações onde os animais são mantidos também é fator que predispõe mais facilmente a contaminação (Dias et al. 2011). A infecção é transmitida para os leitões, principalmente após o nascimento, quando os leitões ainda estão na creche. As infecções podem persistir mesmo após o tratamento, devido à resistência do parasito ou as reinfecções devido aos ovos presentes no ambiente (Nishi et al. 2000).

A suinocultura nacional ocupa o quarto lugar entre os maiores produtores de carne no mundo, contando com um rebanho estimado de 50 milhões de animais. Apesar destes números, pouco se sabe acerca da ocorrência de parasitos nestes animais e a presença de parasitos intestinais não deve ser ignorada (Nishi et al. 2000). Em muitas regiões é comum a criação de suínos próximos a humanos, muitas vezes, em condições precárias de higiene, o que pode configurar um risco zoonótico em potencial destes parasitos. Mesmo sendo espécies distintas, infecções cruzadas podem ocorrer países endêmicos que utilizam fezes de suínos como adubos, como na Índia e China. Infecções cruzadas entre as espécies de *Ascaris* sp. em humanos e suínos podem representar um problema para os programas de controle, uma vez que estes parasitos representam potencial zoonótico nestas regiões (Coles et al. 2006, Mensageiro et al. 2014, O’Lorcain & Holland, 2000, Peng et al. 2007, Peng et al. 2005, Peng et al. 2003).

O diagnóstico para ascaridiose é realizado pela microscopia óptica, que é incapaz de diferenciar os ovos de origem humana ou suína (Leles et al. 2012). Macroscopicamente, as espécies adultas de *A. lumbricoides* e *A. suum* são indistinguíveis, porém são consideradas como distintas com diferenças morfológicas microscópicas de difícil visualização, como a margem serrilhada nos lábios que envolvem a boca, apresentando dentículos côncavos em *A. lumbricoides* e os dentículos são triangulares apresentando as bordas retas em *A. suum* (Sprent, 1952). Entretanto vários autores contestam essa classificação devido a elevada identidade genética entre estas espécies (Leles et al. 2012, Leles et al. 2010, Liu et al. 2012, Peng et al. 2007).

Espécies diferentes geralmente exibem fenótipos discriminantes que permitem caracterizá-las como grupos de organismos evolutivamente independentes, no entanto, há inúmeras espécies crípticas, isto é, que não podem ser facilmente discriminadas apenas pela análise fenotípica, geralmente com caracteres morfológicos (Simpson, 1971). Embora *A. lumbricoides* e *A. suum* infectem preferencialmente e respectivamente, humanos e suínos, estudos moleculares têm propiciado descobertas relevantes no gênero *Ascaris* sp. Compreender aspectos relacionados à infecção cruzada é fundamental não somente para elucidar a evolução dos parasitos, mas também para elaborar programas efetivos de controle efetivos dessa parasitose (Criscione et al. 2007). Para tal, existe a possibilidade do uso de outras ferramentas como o uso da análise do comportamento reprodutivo ou de variação molecular para distinção de espécies que não se diferem anatomicamente. Uma vez que a maior parte das espécies descritas até então foram definidas apenas utilizando a morfologia,

há uma expectativa de que as espécies crípticas sejam realmente muito comuns ou praticamente universais na natureza (Frankham et al. 2002, Wiley, 1981).

Os marcadores moleculares são ferramentas de sucesso na identificação de espécies crípticas. Entre estes marcadores, o DNA mitocondrial (mtDNA) é o mais utilizado em estudos envolvendo genética de populações e filogenia, por oferecer diversas vantagens para análises intra e interespecíficas (Avisé et al. 1987, Avisé, 2000, Frankham et al. 2002). Entre os marcadores utilizados para investigar o *status* de espécie estão o Citocromo B (CytB) o Citocromo Oxidase I (COI) e o Citocromo Oxidase II (COII) ITS 1 e ITS 2 (Bertsch et al. 2005, Cameron & Williams, 2003, Ellis et al. 2005, Estoup et al. 1996, Hines et al. 2006, Kim et al. 2009, Koulianos, 1999, Koulianos & Schmid-Hempel, 2000, Pirounakis et al. 1998, Shao et al. 2004 Widmer et al. 1998, Widmer & Schmid-Hempel, 1999).

O gene COI tem sido utilizado porque normalmente permite: *i*: uma rápida identificação de espécies (Hebert et al. 2003 a, b); *ii*: identificar espécies em qualquer estágio de vida (Köhler, 2007); *iii*: o reconhecimento de espécies crípticas que podem ser distintas geneticamente (Hajibabaei et al. 2007, Waugh, 2007). O gene COI do mtDNA apresenta geralmente uma pequena variação dentro de indivíduos de uma mesma espécie, enquanto que em indivíduos de espécies diferentes esta variação é marcante, sendo uma característica importante para que seja um marcador molecular informativo para discriminação taxonômica (Sheffield et al. 2009). O marcador ITS1 é um dos marcadores mais utilizados para a identificação de nematoides (Gasser & Newton, 2000).

Estudos genéticos mostram que embora *A. suum* seja similar ao *A. lumbricoides*, também existem diferenças específicas quanto ao hospedeiro definitivo, porém infecções cruzadas podem ocorrer, apesar deste fato não estar totalmente esclarecido (Leles et al. 2010). Como a natureza zoonótica de *A. suum* ainda não está completamente esclarecida, compreender como o processo de ultrapassagem de barreira ocorre é fundamental para não somente estudar a evolução dos parasitos, como também elaborar programas efetivos de controle. Neste contexto, o presente trabalho objetiva diferenciar estes parasitos pelo estudo de aspectos morfológicos e moleculares, além de elucidar a infecção natural em humanos por *A. suum*, avaliar a infecção experimental em suínos com ovos embrionados de *A. lumbricoides*, de *A. suum* e de infecção mista, além de realizar a infecção em humanos, com ovos embrionados de *A. suum*, e, finalmente, analisar a filogenia destes parasitos de diferentes regiões do Brasil e de Lima no Peru. Os dados obtidos contribuem para o entendimento da epidemiologia da ascaridiose, podendo auxiliar no desenvolvimento de programas mais efetivos para o controle da mesma.

2 – JUSTIFICATIVA

A natureza zoonótica de *A. suum* não está esclarecida, além disso, a ascaridiose infectam bilhões de pessoas pelo mundo. Neste contexto, propomos a hipótese de que a presença de infecções cruzadas em humanos e suínos por parasitos do gênero *Ascaris* ocorre, contribuindo para a epidemiologia desta parasitose.

3 - OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o potencial zoonótico da ascaridiose, estudando os aspectos moleculares, morfológicos e filogenéticos das espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*.

3.2 Objetivos específicos

- a) Identificar genes espécie específicos para diferenciar *A. lumbricoides* e *A. suum*, bem como reavaliar caracteres morfológicos capazes de distinguir estas duas espécies;
- b) Validar a infecção natural por *A. suum* em humanos;
- c) Validar os aspectos da interação parasito hospedeiro na infecção experimental em suínos com ovos embrionados de *A. lumbricoides*, *A. suum* e infecções mistas;
- d) Analisar por marcadores genéticos a filogenia de *A. lumbricoides* e *A. suum* de parasitos obtidos de Arcos, Contagem, Belo Horizonte, Iguatama, Formiga em Minas Gerais, Barra do Garças (MT), Porto Alegre (RS), Manaus (AM), Palmas (TO) no Brasil e Lima, no Peru;
- e) Avaliar a suscetibilidade e o padrão da infecção experimental em humanos com ovos embrionados de *A. suum*.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção de parasitos *A. lumbricoides* e *A. suum*

Os parasitos adultos da espécie *A. lumbricoides* foram obtidos de uma criança de onze anos moradora da região centro sul de Belo Horizonte, MG, que os expeliu naturalmente, e os levou até o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Foram recuperados seis parasitos, sendo que três machos, foram colocados em frascos, devidamente etiquetados, contendo PBS pH 7,4 (Solução salina PBS, Phosphate Buffered Saline, NaCl 153 mM Synth, Brasil, Na₂HPO₄ 7,6 mM, Nuclear, Brasil, NaHPO₄ 2,7 mM, Nuclear, Brasil, pH 7,4) e congelados a -20°C e três fêmeas foram separadas para obtenção de ovos.

Os parasitos adultos da espécie *A. suum* foram recolhidas de um matadouro de suínos na cidade de Contagem, MG. Após a eutanásia dos animais, o intestino foi separado e o conteúdo intestinal lavado. Os parasitos encontrados foram colocados em frascos devidamente etiquetados contendo PBS pH 7,4 e transportados ao laboratório. Foram recuperados 32 parasitos, sendo que 29 exemplares, tanto machos quanto fêmeas, foram colocados em frascos, devidamente etiquetados, contendo PBS pH 7,4 e congelados a -20°C, três fêmeas foram separadas para obtenção de ovos.

4.2 Obtenção de ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum*

Os exemplares tanto de *A. lumbricoides*, quanto *A. suum* foram separados por sexo. Três fêmeas de cada espécie foram separadas e colocadas em placas de isopor cobertas com papel alumínio, as extremidades dos parasitos foram fixadas com agulhas (BD Precision Glide® 0,45 x 13 26 G 1/2) e com auxílio de um estilete n° 20 (Suzhoukyuan Medical Apparatus Co.) foram seccionadas longitudinalmente. O útero foi separado, transferido individualmente para cadinho de porcelana (Chiarrott, volume de 200 mL), de acordo com a espécie, acrescidos 20 mL de PBS pH 7,4. Posteriormente o útero foi macerado, com auxílio de um bastão de porcelana, os ovos foram filtrados por Tamis (malha com espaçamento de 100 micrômetros) em cálice de sedimentação, capacidade de 200 mL. Após 40 minutos o sedimento, contendo os ovos foi coletado, com auxílio de pipeta sorológica (Serological

Pipet) capacidade de 25 mL e transferidos para garrafas de cultura (Thermo Fisher Scientific) com capacidade de 200 mL, devidamente etiquetadas quanto a espécie, contendo 100 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 0,2 M) e incubados a 26°C na B. O. D. (SP 50 RDE 35 Super) (Figura 3 a-i). As culturas foram agitadas manualmente, 3 vezes por semana de acordo com Gazzinelli-Guimaraes et al. (2013).

4.2.1 Purificação dos ovos para infecções experimentais

Após 80 dias, os frascos contendo os ovos mantidos em cultura, foram homogeneizados e retirados 45 mL da solução, com auxílio de uma pipeta sorológica (Serological Pipet capacidade de 15 mL) e transferido para tubo cônico com capacidade de 50 mL (Tubo Falcon 50 mL). O tubo contendo a solução com os ovos foi centrifugado (Hitachi, Himac CR 21) a 800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Os ovos concentraram no pellet, 30 mL do sobrenadante foi descartado. Posteriormente foi acrescido 30 mL de solução de hipoclorito de sódio, na concentração de 5%, o frasco foi incubado em estufa de CO_2 a 37 °C e 5% de CO_2 (Water – Jacketed Incubator) por 2 horas. Após a incubação, o tubo contendo os ovos foi centrifugado a 300 g, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Os ovos embrionados ficaram suspensos no sobrenadante, 20 mL deste sobrenadante foi transferido para tubo cônico com capacidade de 50 mL. Foi acrescida então 30 mL de água filtrada. O tubo contendo o material foi centrifugado por 10 minutos, a 600 g, em temperatura ambiente. Os ovos concentraram no sedimento, 35 mL do sobrenadante foi descartado e acrescido 35 mL de água filtrada. Esse processo foi repetido por três vezes para retirada do hipoclorito. Os ovos purificados foram contados, com auxílio de microscópio, em alíquotas de volume definido para serem utilizados nas infecções experimentais.

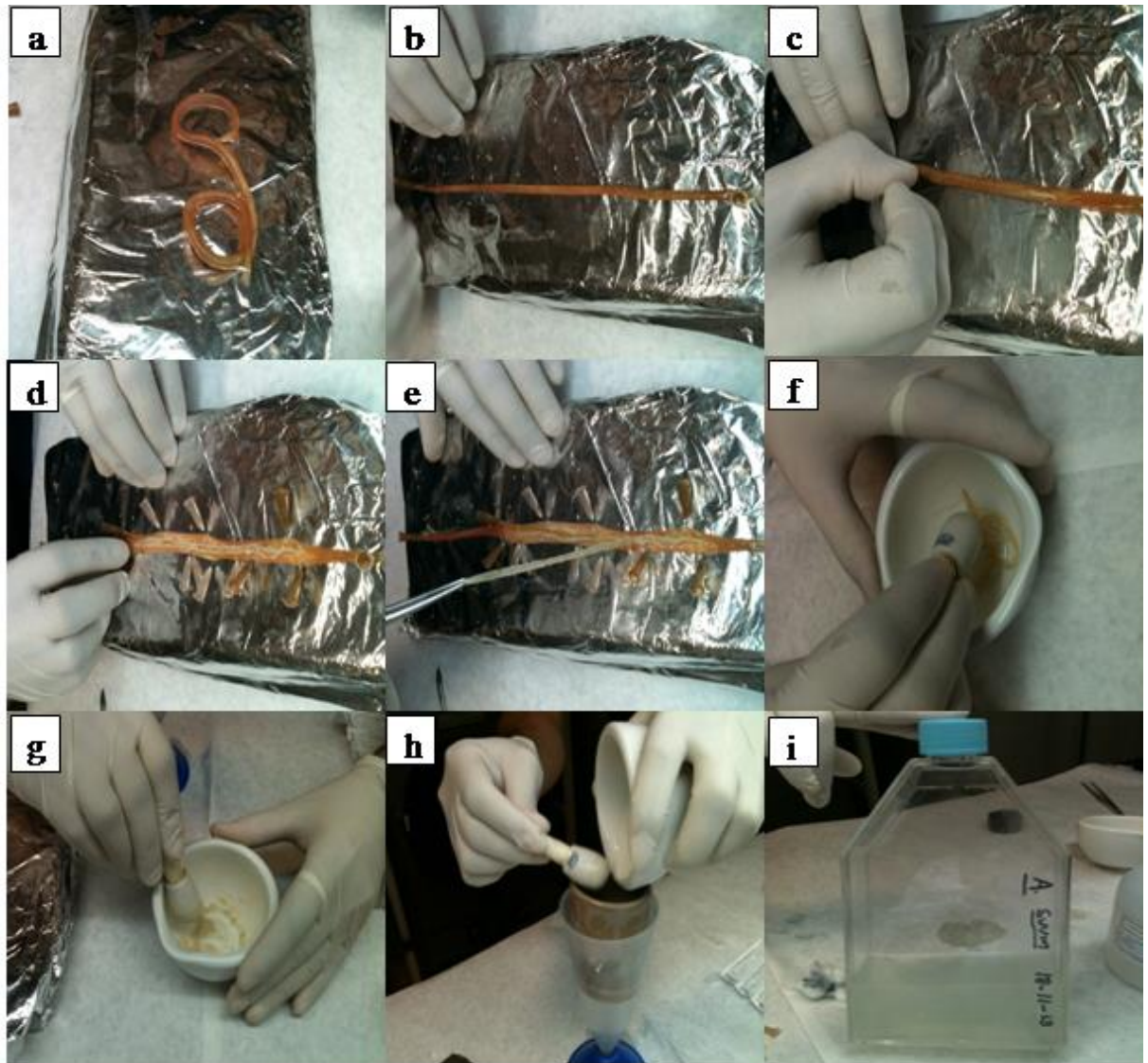


Figura 3: Processo para obtenção de ovos de *Ascaris lumbricoides* e *A. suum* (a, b): Parasito distendido, (c): Parasito fixado nas extremidades, (d): Corte longitudinal do parasito, (e): Retirada do útero, (f, g): Maceração do útero, (h): Processo para purificação dos ovos em Tamis, (i): Ovos em garrafa de cultura contendo ácido sulfúrico a 0,2 molar.

4.3 Identificação dos parasitos

4.3.1 Identificação molecular dos parasitos

Para a identificação molecular dos parasitos, sequências da região ITS-1 e COXI de *A. lumbricoides* e *A. suum* previamente publicadas por Arizono et al. (2010), foram recuperadas do Gen Bank/NCBI sob o número de acessos AB571295– AB571302, AB571305– AB571307, AB576588– AB576594 para os marcadores ITS1 e ITS2 e número de acessos AB591795–AB591805 para COX-1. Sequências de cada marcador foram alinhadas globalmente utilizando o CLUSTRAL (Thompson et al. 1994). Iniciadores alelo específico foram desenhados para regiões polimórficas entre as duas espécies e conservada entre diferentes indivíduos de uma mesma espécie. Foram desenhados dois iniciadores específicos para os genes mitocondriais ITS1 e um iniciador para COXI de *Ascaris* sp. (Quadro 1).

Quadro 1: Iniciadores específicos, desenhados para os genes COXI E ITS1 de *A. lumbricoides* e *A. suum* utilizados nos estudos experimentais para a identificação molecular destas espécies.

Nome da sequência	Sequência 5' – 3'
ITS1- P1F	TAATAGCAGTCGGCGGTT
ITS1- P2F	GGTTTCTTTTTTTTTTGGCC
ITS1- P1R	GAGGAGCTTTCTCTCCAC
ITS1- P2R	GAAGCGTAGACGCCAAAT
COXI-F	TCTATTTCTTTGGAACATAT
COXI-R	CCATGAATACCAGCAAAT

Para a extração do DNA genômico, foram retirados 0,3 g da parte anterior, do parasito e colocados em microtubo (Eppendorf capacidade 1,5 mL) adicionados 300 µL de PBS pH 7,4, após foram seguidas as recomendações do kit Gebomic Blood DNA Purification (GE Healthcare). Posteriormente em cada tubo, contendo a amostra, foram adicionados 20 µL de proteinase K 20mg/mL (Bioline) e 400 µL de tampão de lise (Promega EUA) macerado, seguido de vortexação por 15 segundos (Vortexmixer 2X Classic, Velp Scientifica). Os microtubos foram incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. O DNA genômico foi separado da mistura inicial por sua afinidade, a uma coluna de sílica, lavada 3 vezes com tampão de lavagem. O DNA extraído, foi eluído da coluna de sílica com água miliQ (Direct Q® Millipore) autoclavada, quantificada no espectrofotômetro NanoDrop® (Spectrophotometer

ND 2000 C). Os produtos da amplificação foram submetidos à separação em gel de agarose (Agargen, Brasil) 1% a 120v em tampão TAE (4,8g/l Tris-base pH 8,0; 1,14 mL ácido acético glacial; 2 mL EDTA 0,5M) contendo brometo de etídio (Bio-Rad) 0,25 µg/µL e visualizados sob luz ultravioleta e fotografado no fotodocumentador (Image Quant Las 400 GE). No gel foi aplicado, além das amostras, 8 µL do padrão de peso molecular (Fermentas) de 1kb.

4.3.2 Identificação morfológica pela microscopia óptica

Dos parasitos obtidos foi retirado um fragmentos da parte anterior com auxílio de lâmina de bisturi e colocados em microtubos devidamente etiquetados, adicionados 1 mL de PBS pH 7,4 e congelados a -20 °C para posterior extração do DNA. Para a análise morfológica os parasitos foram fixados com álcool 80% a temperatura de 60°C para a distensão do parasito. Após 30 minutos os parasitos foram transferidos para frascos etiquetados contendo 100 mL de álcool 80%, sendo mantidos nestas condições por 72 horas. Os parasitos foram diafanizados com Lactofenol de Aman por 48 horas, posteriormente colocados em lâminas de vidro acrescido Lactofenol de Aman, e analisados em microscópio de luz (Olympus CX 40) munidos de câmara clara (Olympus J 61101) aumento de 100X e/ou estereomicroscópio munido de câmara clara (Wilde Heerbrugg M5) aumento de 10X. Os parasitos foram desenhados, e mensurados com auxílio de ocular milimetrada (Olympus BIWF) e comparados com descrições e chaves de identificação proposta por Anderson, (2000), Herschmann (1960), Yorke & Maplestone (1962) e Yamaguti, (1961).

4.3.3 Identificação morfológica pela microscopia eletrônica de varredura

Para a visualização dos dentículos que margeiam os lábios dos parasitos, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura, onde a parte anterior dos parasitos foi seccionada e os lábios separados. Posteriormente os lábios foram seccionados longitudinalmente e as cutículas que os envolvem foram retiradas com auxílio de estilete, para exposição dos dentículos. As amostras foram colocadas no fixador primário modificado, Karnovsky (2,0% paraformaldeído e 2,5% glutaraldeído) em tampão cacodilato 0,1M por 1 hora, posteriormente o fixador foi removido e as amostras e lavadas por 3 vezes por 10 minutos em tampão cacodilato. Em seguida os fragmentos foram imersos no fixador secundário, tetróxido de ósmio 1,0% por uma hora e lavados novamente, 3 vezes por 10 minutos em tampão fosfato 0,1M. As amostras foram imersas em ácido tânico 1,0% em tampão fosfato 0,1M, por 20 minutos e lavadas 3

vezes por 10 minutos em tampão fosfato 0,1M. As amostras foram novamente imersas no fixador secundário, tetróxido de ósmio 1,0%, por uma hora e lavadas novamente, 3 vezes por 10 minutos em água. Em seguida foram desidratadas em solução crescente de álcool etílico a 35%, 50%, 70%, 85% e 95%, deixadas por 10 minutos em cada concentração e em álcool absoluto, 3 vezes por dez minutos. As amostras foram secadas no aparelho de ponto crítico de CO₂, colocadas em *stubs*, utilizando fita de carbono metalizada com ouro (Souza, 2007).

Para a observação morfológica, os dentículos presentes nas bordas dos lábios dos parasitos foram analisados no microscópio eletrônico de varredura (FEG- Quanta 200 FEI). Detector de elétrons secundários, detector de elétrons retroespehados detector de elétrons transmitidos (STEM) detector integrado Pegasus: EDS (Espectro de raio x de energia dispersiva) e EBSD (Difração de elétrons retroespehados) voltagem 200V a 30 kV, corrente do feixe > 100 nA, resolução 1,6 nm a 30 kV em alto vácuo e modo ESEM TM, 3.5 nm a 3 kV em baixo vácuo, distância focal: 3mm a 99 mm, aumento 12X (Na distância de trabalho mais longa) a 1.000.000 X em alto e baixo vácuo, pertencente ao Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais (CM - UFMG).

4.4 Coleta de parasitos em humanos naturalmente infectados

Visando a busca em indivíduos naturalmente infectados, foram realizadas visitas em domicílios da cidade de Iguatama, MG. Aos residentes foi explicado o projeto e convidados a participar por livre e espontânea vontade e caso concordassem, assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndices 4, 5 ou 6). Aos participantes foi deixado um frasco identificado e explicado para que uma amostra de fezes fosse coletada e acondicionada no frasco. No dia seguinte as amostras de fezes foram recolhidas e levadas ao laboratório, onde três lâminas de cada material fecal foram analisadas pelo método de sedimentação espontânea (Lutz, 1919).

Os indivíduos parasitados por *Ascaris* sp. receberam medicamento específico (Ivermectina: 200 microgramas/Kg, em dose única) receitados por médico. Após o tratamento foi entregue para cada indivíduo dois potes, com capacidade de 500 mL, cada. Os pacientes receberam instruções para que todo material fecal fosse coletado pelas próximas 72 horas e acondicionadas nos potes. Após o período estabelecido os potes foram coletados, acondicionados e transportados em caixas de isopor para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos, onde todo material foi lavado em peneiras, malha de 5 mm de espaçamento, para colheita dos parasitos. Os parasitos encontrados foram lavados em água

corrente, transferidos para frascos contendo PBS, pH 7,4 e submetidos à identificação morfológica e molecular conforme itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3.

Os voluntários positivos por outras espécies de parasitos receberam medicamento específico. Para infecções por outros nematódeos (Ivermectina 200 micrograma/Kg em dose única) protozoários (Metronidazol 50 mg/Kg 8/8h por 7 dias) cestódeos (Praziquantel 2,5 mg/Kg máximo 150 mg em dose única) *Schistosoma mansoni* (Praziquantel 50 mg/Kg, máximo 4,2 g, em dose única). Todo experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana, Plataforma Brasil, CEP/ Conep, sob número CAAE 26945814.1.0000.5149.

4.5 Sequenciamento do DNA e análise filogenética

Os produtos de PCR amplificados com os iniciadores listados foram submetidos ao sequenciamento em ambas extremidades usando o ABI Prism 3730x1 DNA Analyzer (Applied Biosystems) por Macrogen INC (Seul, Coréia do Sul). Para tanto foram feitas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) seguindo recomendações pelo fabricante do kit e utilizando iniciadores específicos. A análise filogenética foi realizado no programa MEGA 5. Foi utilizado o modelo de Neighbor-Joining com 1.000 replicatas de inicialização.

4.6 Infecção experimental em suínos

Para o experimento com suínos foram obtidos vinte e sete animais da raça Piau em uma granja situada no município de Iguatama, MG. Os animais, de ambos os sexos, estavam com 30 dias de idade, com peso aproximado de 10 kg ($\pm$ 1,5 kg). Em todos os animais foi realizado exame parasitológico de fezes, pelo método de sedimentação espontânea (Lutz, 1919), sendo analisadas dez lâminas por animal. Mesmo após a verificação da negatificação do exame, os animais foram tratados com Cloridrato de Levamisol injetável (RIPERCOL® à 7,5%, 1 mL para cada 20 kg de peso vivo do animal) conforme o fabricante. Após 20 dias foi realizado individualmente novo exame de fezes dos animais. Confirmado a negatificação, os animais foram infectados com ovos embrionados de *A. lumbricoides* e/ou *A. suum*.

A infecção dos animais foi realizada por via oral, utilizando seringa (BD Cornwall) munida de agulha de ponta romba, com volume variável. Os suínos foram infectados com aproximadamente 1.000 ovos embrionados, que foram contados com auxílio de microscópio óptico (Olympus CX 40) em alíquotas para calcular o volume que continha este número de

ovos embrionados por amostra, para assim realizar o ajuste do volume do inóculo, para que os suínos recebessem esta quantidade de ovos embrionados.

Foram separados três grupos de 9 exemplares cada, composto por 5 machos e 4 fêmeas. Cada grupo de animais foi colocado em baias separadas, construídas de alvenaria, com as partes abertas teladas, para evitar a entrada de insetos, o que poderia infectar os animais com algum agente externo. No primeiro grupo, cada animal foi infectado com mil ovos embrionados de *A. lumbricoides*, o segundo grupo com mil ovos embrionados de *A. suum* e o terceiro grupo cada animal foi infectado com quinhentos ovos embrionados de *A. lumbricoides* mais quinhentos ovos embrionados de *A. suum* (sendo este grupo considerado como infecção mista). Como controle, um animal sentinela sem qualquer infecção, foi mantido por grupo.

Os grupos de animais foram separados de forma homogênea, para que todos os grupos apresentassem o peso mais semelhante possível. Os animais foram pesados individualmente aos 30 dias de idade, aos 50 dias (dia da infecção), aos 60 dias (dez dias da infecção) e aos 98 dias de idade (quarenta e oito dias da infecção). Os animais foram mantidos sem restrições hídricas, alimentados duas vezes ao dia, com ração para suínos, isenta de anti-helmintos, produzida por uma granja de suínos em Iguatama, MG. As baias onde os animais ficaram durante o experimento, estão situadas no *Campus* da Faculdade de Meio Ambiente de Iguatama, MG, mantida pela Fundação Educacional Vale do São Francisco (Figura 4 a, b). Todo o experimento foi aprovado pelo CEUA-UFGM (Comissão de Ética no Uso de Animais) protocolo 54-2012.



Figura 4: (a): Baias teladas onde os animais foram mantidos durante os experimentos, (b): Animais mantidos na baia durante o experimento.

4.6.1 Recuperação de parasitos em suínos experimentalmente infectados

Após o décimo quinto dia de infecção, as fezes de cada animal foram coletadas diariamente. Para isso cada animal foi separado dos demais e as fezes recolhidas. A amostra foi colhida e acondicionada em frascos, devidamente etiquetados, levadas ao laboratório e analisadas pelo método de sedimentação espontânea (Lutz, 1919). Foram analisadas dez lâminas por animal, para a verificação do período pré-patente. Uma lâmina foi preparada e analisada pelo método de Kato-Katz (Katz et al. 1972), para análise quantitativa dos. Após o período pré-patente os animais foram eutanasiados, sob anestesia geral seguido de sangramento e necropsia. O intestino foi aberto, com auxílio de tesoura e os parasitos recuperados de cada animal foram colocados em frascos, devidamente etiquetados, contendo PBS pH 7,4 e submetidos à identificação morfológica e molecular conforme itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3. As carcaças dos animais eutanasiados foram recolhidas por agentes da limpeza urbana da prefeitura de Iguatama, MG para incineração.

4.7 Recuperação de parasitos em suínos naturalmente infectados

Para a obtenção de parasitos em animais naturalmente infectados, foi visitado matadouros em Iguatama (MG), Belo Horizonte (MG), Formiga (MG), Arcos (MG), Contagem (MG) e Barra do Garças (MT). Após a eutanásia, realizada no matadouro, o intestino foi separado e o conteúdo intestinal analisado. Os parasitos encontrados foram lavados em água corrente e colocados em frascos, devidamente etiquetados, contendo PBS pH 7,4 e transportados ao laboratório. Parasitos obtidos em Palmas (TO), Porto Alegre (RS), Manaus (AM), e Lima no Peru, foram enviados ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos da UFMG. Os parasitos foram identificados pela biologia molecular, pela morfologia, conforme itens 4.3.1, 4.3.2, 4.3.3 e análise filogenética conforme item 4.6.

4.8 Infecção experimental em humanos utilizando ovos de *Ascaris suum*

Para a infecção experimental por *A. suum*, foram incluídos cinco voluntários hígidos maiores de idade, legalmente capazes, independentes do sexo, apresentando exame clínico e revisão laboratorial sem alterações. Após esclarecimento e assinatura do termo de consentimento (Apêndice 4) foi entregue ao indivíduo um frasco devidamente numerado para coleta de fezes. As amostras foram submetidas ao método parasitológico de sedimentação

espontânea (Lutz, 1919) para pesquisa de ovos, cistos ou trofozoítos. Foram analisadas dez lâminas por amostra. Depois de constatado a negativação por qualquer espécie de parasito, foi realizada a infecção por via oral. Para isso uma amostra, contendo os ovos, após purificação conforme item 4.2.1, foi colocado em uma lâmina de vidro. Os ovos foram contados com auxílio de microscópio de luz (Olympus CX 40). Cinquenta ovos larvados foram selecionados e transferidos, por imersão, em um copo, contendo 200 mL de água filtrada. Os indivíduos foram instruídos a ingerir a água que continha os ovos embrionados.

Uma planilha foi entregue aos voluntários para que anotassem qualquer tipo de sintomas (Apêndice 3). Os voluntários foram acompanhados por equipe multiprofissional de saúde e foi pedido que quaisquer alterações ou sintomas anormais fossem anotados. Com intuito de analisar o ciclo pulmonar das larvas e a patogenia causada por estes parasitos, no décimo segundo, dia após a infecção, foi realizado raio x de tórax. Após o 30º dia da infecção, amostras de fezes dos voluntários, foram coletadas semanalmente e armazenadas em frasco, devidamente numerados. As amostras foram submetidas ao método de sedimentação espontânea (Lutz, 1919) para pesquisa de ovos até a verificação do período pré patente. Foram analisadas dez lâminas por amostra. Aos setenta dias de infecção outro raio x de tórax dos pacientes foi realizado, com intuito em analisar o órgão por onde houve a migração larvar. Após a verificação do período pré-patente, uma amostra de fezes de cada indivíduo foi analisada pelo método quantitativo de Kato-Katz (Katz et al. 1972), posteriormente os voluntários receberam tratamento específico (Ivermectina 200 micrograma/Kg em dose única). Todo experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética Humana da UFMG, Plataforma Brasil, CEP/ Conep, sob número CAAE, 26945814. 1.0000. 5149.

4.8.1 Recuperação de parasitos em humanos experimentalmente infectados

Após o tratamento, os voluntários foram instruídos a coletar as fezes pelas próximas 72 horas e armazena-las em recipientes próprios etiquetados, com capacidade de 500 mL. Após o período estabelecido, os frascos foram recolhidos e acondicionados em caixas térmicas e transportados ao Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos. No laboratório as fezes foram processadas por Tamis, malha de 5 mm de espaçamento, para colheita dos parasitos, que foram lavados em água corrente transferidos para frascos, devidamente etiquetados, contendo PBS pH 7,4 (Solução Salina PBS Phosphate Buffered Saline). Posteriormente a parte anterior dos parasitos foi retirada, com auxílio de uma lâmina de bisturi e transferida para microtubo (Eppendorf capacidade 1,5 mL) contendo álcool 70%,

para a análise morfológica conforme item 4.3.2. O restante do parasito foi utilizado para a identificação molecular, conforme item 4.3.1.

4.9 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Prism 5.0. Primeiramente a distribuição normal dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov; uma vez demonstrada a distribuição normal dos dados, foi utilizado um teste t não pareado para a análise comparativa entre os dois conjuntos de dados, e uma análise de variância para análise de dados de três ou mais grupos experimentais. Os valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

5 – RESULTADOS

Os resultados estão apresentados em capítulos, de acordo para a publicação de artigos. No capítulo um, está descrito o desenvolvimento de um método molecular capaz de distinguir as espécies *A. lumbricoides* de *A. suum*, como também a identificação morfológica, presente nos dentículos capaz de diferenciar estas espécies. Para avaliar o potencial do impacto zoonótico da ascaridiose, foi realizado exame parasitológico de fezes em criadores de suínos e em seus vizinhos. Ao encontrar humanos naturalmente infectados com *A. suum* foram realizadas infecções experimentais em suínos com ovos embrionados de *A. lumbricoides*, *A. suum* e infecção mista, para melhor entender os aspectos das interações parasito-hospedeiro, como: Período pré-patente, ovos por grama de fezes e a quantificação de parasitos recuperados nas infecções experimentais. No segundo capítulo estão os dados relacionados a análise filogenética, comparando amostras de várias regiões do Brasil e de Lima no Peru. No capítulo final, são apresentados os dados da infecção humana e os estudos demonstrando o período pré-patente, ovos por grama de fezes, parasitos recuperados e sintomatologia.

5.1 CAPÍTULO 1

5.1.1 Identificação morfológica e molecular de *Ascaris* sp.

Quanto a análise molecular, os iniciadores desenhados amplificaram os seguimentos esperados, sendo possível diferenciar *A. lumbricoides* de *A. suum*. Para a região ITS1 (Primer 2) foi possível observar as espécies e separá-las pelo tamanho da banda. Em 250 pb os parasitos da espécie *A. lumbricoides* e em 200 pb os parasitos da espécie *A. suum* (Figura 5 j). Em ITS1 (Primer 1) foi possível diferenciar as espécies, havendo uma banda em 500 pb para a espécie *A. lumbricoides* e duas bandas para a espécie *A. suum*, uma em 250 pb e outra em 500 pb (Figura 5 k). Para o gene COXI, foi possível observar as espécies de *Ascaris* sp. em 750 pb (Figura 5 l).

Como esses iniciadores foram capazes de diferenciar as espécies *A. lumbricoides* de *A. suum* esses primers foram patenteados e a patente depositada no INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial). Com o título da invenção: “Composições, processo, uso e kit para identificação e diferenciação molecular de duas espécies do gênero *Ascaris*”. Número BR 102013008846.

Quanto a morfologia, foram analisados detalhadamente os dentículos presentes nas bordas dos lábios trilobados dos parasitos recuperados. Pela microscopia eletrônica de varredura foi possível observar em detalhes as estruturas dos dentículos. Os parasitos da espécie *A. lumbricoides*, apresentam as extremidades dos dentículos com bordas côncavas. Já os parasitos da espécie *A. suum*, as extremidades dos dentículos são triangulares (Figura 5 a - f). Na microscopia óptica, após clarificação com Lactofenol foi possível observar os dentículos côncavos, em *A. lumbricoides* e triangulares em *A. suum* (Figura 5 g, h). Estas características estavam presentes em todos parasitos obtidos nas diversas regiões do Brasil e de Lima, no Peru. Com auxílio de câmara clara, não foi encontrado nenhuma característica morfológica capaz de diferenciar estas espécies (Figura 5 i).

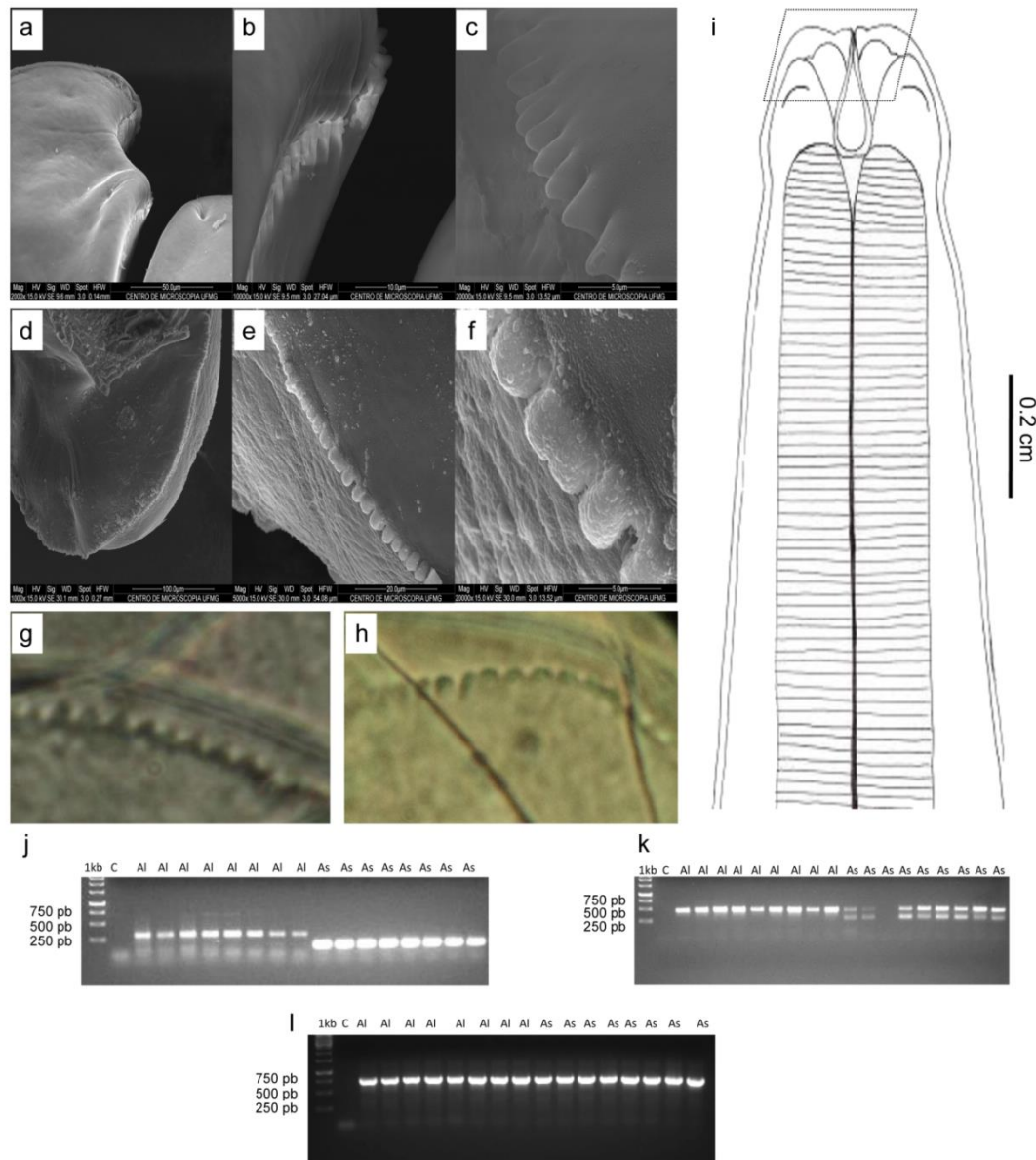


Figura 5: Diferenças morfológicas e moleculares entre *A. lumbricoides* e *A. suum*, (a, b, c): Morfologia dos dentículos de *A. suum* em microscopia eletrônica de varredura, apresentando extremidades triangulares, (d, e, f): Morfologia dos dentículos em microscopia eletrônica de varredura de *A. lumbricoides*, apresentando bordas côncavas, (g): Morfologia dos dentículos em microscopia óptica de *A. suum*, apresentando bordas triangulares, (h): Morfologia dos dentículos em microscopia óptica de *A. lumbricoides*, apresentando bordas côncavas, (i): Desenho em câmera clara, em detalhe a região onde foi realizado o corte para análise dos dentículos, (j): Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando primer IST1 (primer 2), sendo possível diferenciar as espécies de *Ascaris* sp. pela diferença em relação ao número de pares de base, (k): Gel de agarose utilizando primer IST1 (primer 1), sendo possível diferenciar as espécies de *Ascaris* sp em relação ao número de pares de bases, (l): Gel de agarose utilizando primer COXI.

5.1.2 Infecção natural em humanos por *Ascaris* sp. e recuperação dos parasitos, para a identificação molecular das espécies encontradas

Foram analisadas 512 amostras de fezes, provenientes de indivíduos residentes do município de Iguatama, MG (Figura 6 a). Das amostras analisadas 83, apresentavam positivas para alguma espécie de parasito e 429 negativos (Tabela 1). Dentre os parasitos encontrados, 21 indivíduos estavam infectados por *Ascaris* sp., sendo a segunda espécie de parasito mais encontrada (Tabela 2). Dos indivíduos infectados que apresentavam ovos de *Ascaris* sp., três concordaram em ceder as fezes, para obtenção dos parasitos adultos, após o tratamento específico. No primeiro indivíduo foram recuperados três parasitos, no segundo dois e no terceiro indivíduo cinco parasitos. Pela análise molecular, foi demonstrado, que nos dois primeiros indivíduos os parasitos apresentavam o perfil molecular para a espécie *A. lumbricoides* e no terceiro indivíduo os parasitos o perfil molecular era da espécie *A. suum* (Figura 6 b). A análise morfológica, por microscopia óptica, apresentou os caracteres morfológicos específicos das espécies referidas (Figura 6 c, d, e).

Tabela 1: Distribuição da infecção por parasitos na população, dividido por gênero, dos pacientes analisados em Iguatama, MG.

Sexo	Total		Negativo		Positivo	
	n°	%	n°	%	n°	%
Masculino	214	41,8	161	37,5	53	63,9
Feminino	298	58,2	268	62,5	30	36,1
Total	512	100,0	429	100,0	83	100,0

Tabela 2: Espécies de parasitos encontrados em exames parasitológico de fezes, pelo método de sedimentação espontânea, na amostra de residentes de Iguatama, MG, em 2015.

Parasitos encontrados					
<i>Entamoeba</i> sp.	<i>Ascaris</i> sp.	<i>Trichuris</i> sp.	<i>Strongyloides</i> sp.	<i>Hymenolepis</i> sp.	<i>S. mansoni</i>
38	21	11	02	03	08
7,42%	4,1%	2,14%	0,39%	0,58%	1,56%

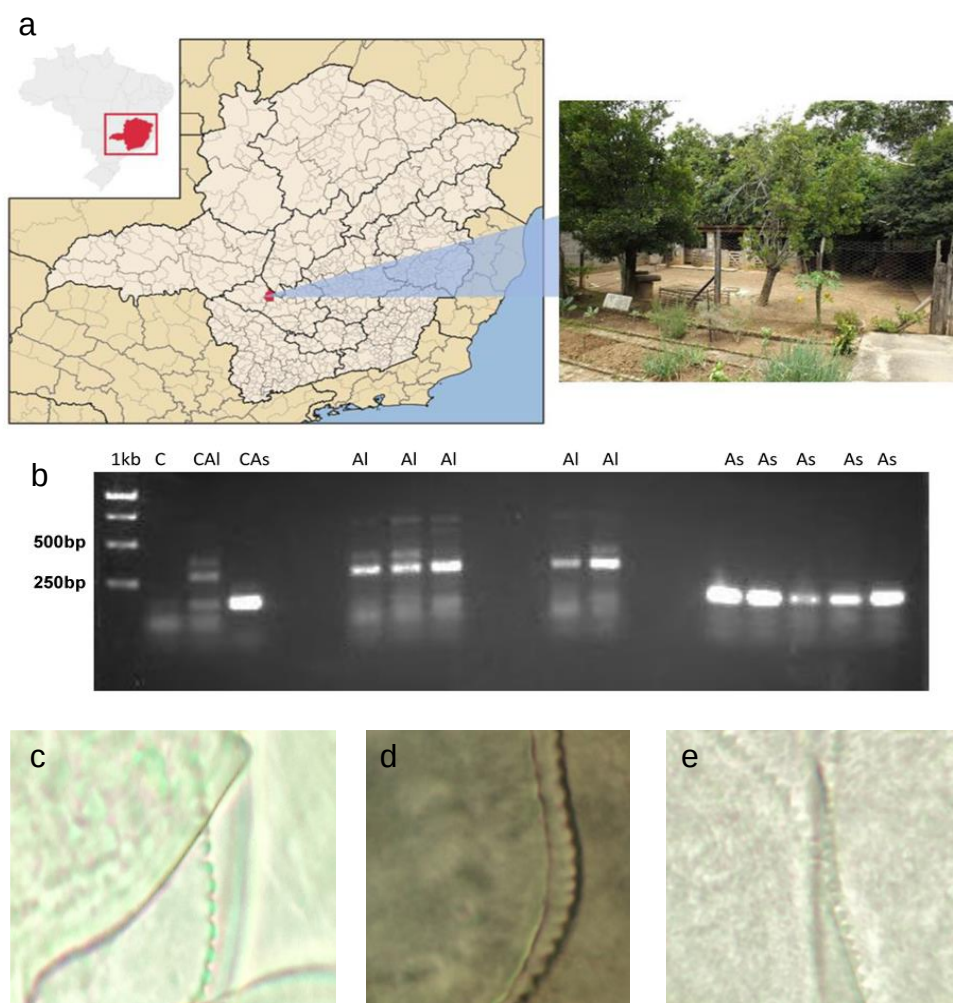


Figura 6: (a): Mapa do Brasil, em destaque o Estado de Minas Gerais. Em vermelho o município de Iguatama e a casa onde moradores criavam suínos no peridomicílio, onde foi encontrado humanos naturalmente infectados por *A. suum*, (b): Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando primer IST1 (primer 2), sendo possível observar a diferença entre as espécies de *Ascaris* sp. Canaleta 1: Marcador de peso molecular de 1kb, canaleta 2: Controle negativo, canaleta 3: Controle de *A. lumbricoides*, canaleta 4: Controle de *A. suum*, nas três canaletas seguintes, parasito com perfil molecular de *A. lumbricoides*, recuperados do primeiro indivíduo, nas duas canaletas seguintes, parasito com perfil molecular de *A. lumbricoides* recuperados do segundo indivíduo, nas cinco últimas canaletas, parasito com perfil molecular de *A. suum*, recuperados do terceiro indivíduo, (c): Parasito recuperado no primeiro paciente, morfologia dos dentículos, em microscopia óptica, apresentando bordas côncavas típico da espécie *A. lumbricoides*, (d): Parasito recuperado no segundo paciente, morfologia dos dentículos, em microscopia óptica, apresentando bordas côncavas típico da espécie *A. lumbricoides*, (e): Parasito recuperado no terceiro paciente, morfologia dos dentículos, em microscopia óptica, apresentando bordas triangulares típico da espécie *A. suum*.

5.1.3 Infecção experimental em suínos

Os 27 animais foram pesados aos trinta dias de idade e não apresentaram diferenças significativas, sendo separados em grupos de três, com nove animais cada. Aos 50 dias de idade os animais também não apresentaram diferenças significativas quanto ao peso, e foram infectados. Aos 60 dias de idade, os animais estavam com dez dias de infecção, os animais mantidos como controle ganharam peso, quando comparados com os animais infectados. Essa diferença também foi significativa, em relação ao peso, aos 98 dias de idade, quando os animais estavam com 48 dias de infecção (Gráfico 2 a). Os animais infectados apresentaram ovos de *Ascaris* sp. nas fezes entre 40 e 48 dias após a infecção e foram sacrificados. Os animais controle, mantiveram-se negativos, durante todo o experimento.

Em relação ao período pré-patente não houve diferença significativa nos grupos de animais infectados com ovos mistos (Ovos de *A. lumbricoides* e *A. suum*) daqueles infectados somente com ovos de *A. suum*. Porém houve diferença significativa quando estes dois grupos foram comparados com a infecção utilizando somente ovos de *A. lumbricoides*. (Gráfico 2 b). Segundo teste de Tukey $p < 0,05$. Em relação ao número de ovos por grama de fezes, não houve diferença significativa entre o grupo infectado utilizando ovos de *A. suum* e na infecção utilizando ovos mistos, ao passo que quando comparado com a infecção utilizando ovos de *A. lumbricoides* houve diferença significativa (Gráfico 2 c). Segundo teste de Tukey $p < 0,05$. Quanto aos parasitos recuperados nas infecções experimentais, um maior número deles foi obtido no grupo utilizando ovos mistos, seguido da infecção com ovos de *A. suum*, contudo não houve diferença significativa entre estes dois grupos, já no grupo de animais infectados com ovos de *A. lumbricoides* foram recuperados um menor número de parasitos em relação aos demais grupos, havendo diferença significativa (Gráfico 2 d). Segundo teste de Tukey $p < 0,05$.

Os parasitos recuperados nas infecções experimentais foram analisados e identificados quanto ao perfil molecular e morfológico. Todos os parasitos recuperados na infecção utilizando ovos mistos foram analisados e apresentavam o perfil molecular e os caracteres morfológicos da espécie *A. suum* (Apêndice 1 e 2). Todos os parasitos recuperados nas infecções utilizando ovos de *A. suum* apresentavam o perfil molecular e os caracteres morfológicos da espécie *A. suum*. E todos parasitos recuperados nas infecções utilizando ovos de *A. lumbricoides* também foram analisados e apresentavam o perfil molecular e os caracteres morfológicos da espécie *A. lumbricoides*. Não foram recuperados parasitos nos animais mantidos como controle.

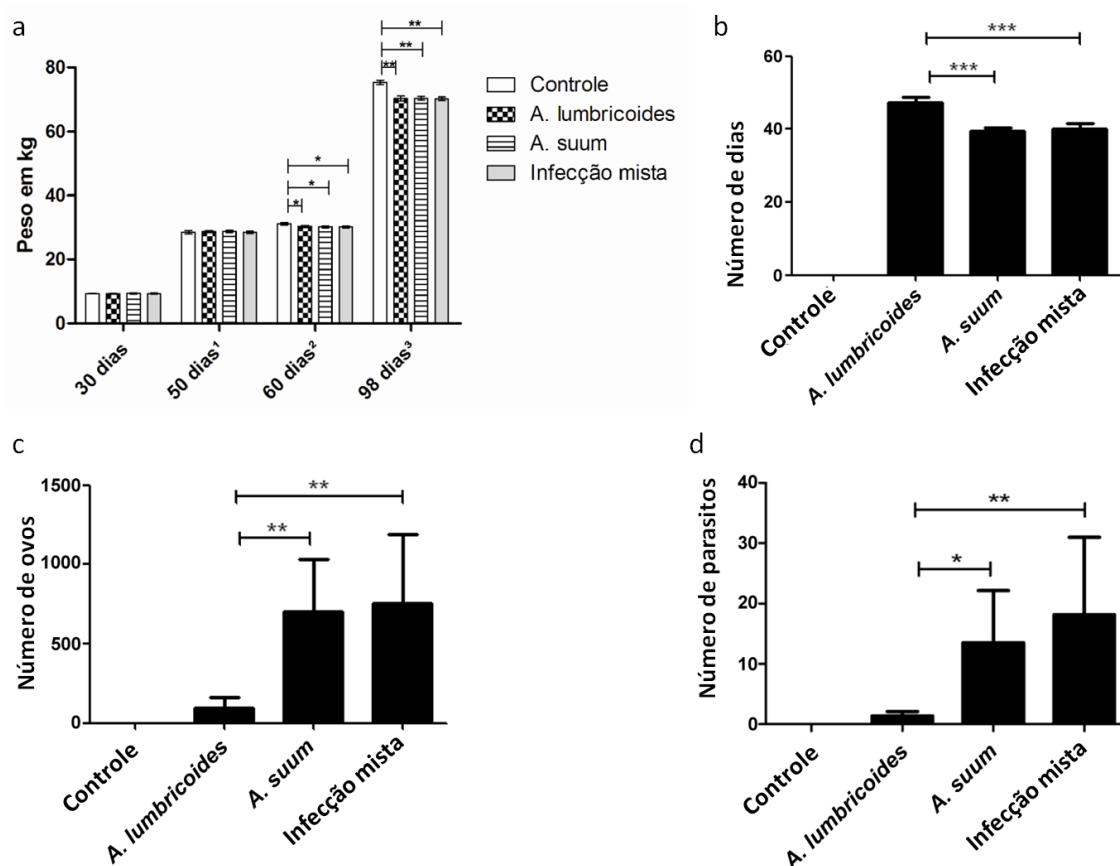


Gráfico 2: (a): Peso dos suínos em relação a idade: Aos 30 dias de idade, aos 50 dias¹ de idade, quando os animais foram infectados, exceto o grupo controle, aos 60 dias² de idade, quando os animais estavam com dez dias de infecção, e aos 98 dias³ de idade, quando os animais estavam infectados à quarenta e oito dias, (b): Período pré patente dos suínos infectados experimentalmente, utilizando ovos embrionados de *A. lumbricoides* e *A. suum*, e ovos misto (c): Ovos recuperados por grama de fezes, método de Kato-Katz, dos suínos infectados experimentalmente, com ovos embrionados de *A. lumbricoides* e *A. suum*, (d): Parasitos recuperados nas infecções experimentais em suínos, utilizando ovos embrionados de *A. lumbricoides* e *A. suum* e ovos mistos

5.2 CAPÍTULO 2

5.2.1 Análise filogenética de parasitos recuperados nas infecções experimentais em suínos

Quanto a análise filogenética dos parasitos recuperados nas infecções experimentais foi possível observar para a região COXI, que houve algumas sobreposições entre as espécies, porém foi possível observar uma distinção entre *A. lumbricoides* e *A. suum*, pela árvore de Neighbor-Joining (Figura 7 a). Para a região ITS1 (Primer 1) houve uma distinção e uma separação de dois grupos, sendo possível observar grupos de *Ascaris* sp. (Figura 7 b). Em ITS1 (Primer 2) houve uma distinção entre os dois grupos de *Ascaris* sp., sendo possível observar a separação destas espécies. Entretanto é possível observar que estas espécies são bem homogêneas. (Figura 7 c).

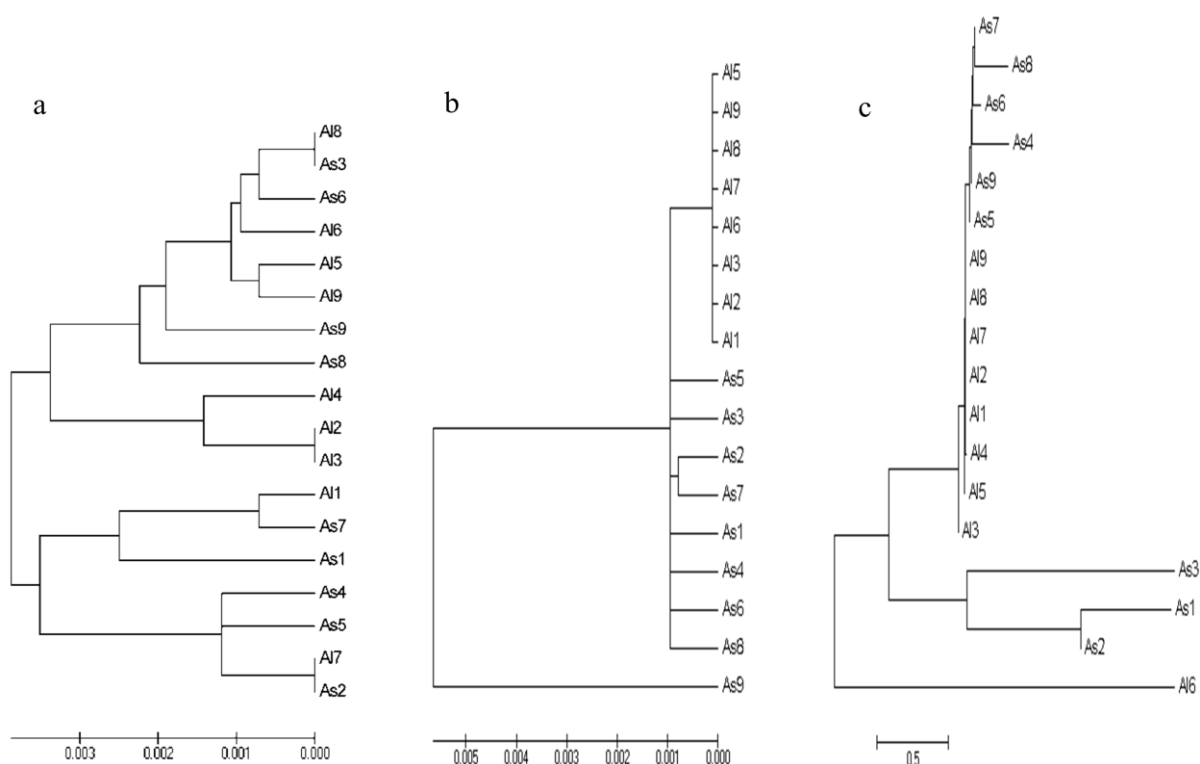


Figura 7: Análise filogenética árvore de Neighbor-Joining de parasitos recuperados das infecções experimentais em suínos, (a): Utilizando o primer COXI, (b): Utilizando a região ITS1 (primer 1), (c): Utilizando a região ITS1 (primer 2). Al = *A. lumbricoides*, As = *A. suum*.

5.2.2 Análise filogenética de parasitos recuperados em diferentes cidades do Brasil, e em Lima, no Peru e dos parasitos recuperados nas infecções experimentais em suínos

Das amostras dos genes sequenciados dos parasitos de suínos obtidos de várias regiões do Brasil e de Lima, no Peru (Figura 8) e das amostras dos parasitos dos animais infectados, foram analisadas, quanto a filogenia. Foi possível observar que estas espécies são bem homogêneas, não havendo distinção clara quando comparadas filogeneticamente (Figura 9). Entretanto os primers desenvolvidos neste estudo foram capazes de identificar e separar as espécies de *Ascaris* sp. em relação aos locais obtidos, sendo possível observar que os parasitos recuperados de suínos nas diferentes regiões do Brasil e de Lima, no Peru, apresentavam o perfil molecular da espécie *A. suum* (Figura 10).



Figura 8: Locais onde foram recuperados parasitos em suínos naturalmente infectados por *Ascaris* sp. Em verde, o mapa do Brasil em destaque as cidades brasileiras onde foram obtidas as amostras, sendo: Manaus (AM), Palmas (TO), Barra do Garças (MT), Belo Horizonte (MG), Contagem (MG), Formiga (MG), Arcos (MG), Iguatama (MG) e Porto Alegre (RS). Em amarelo o mapa do Peru, em destaque a cidade de Lima.

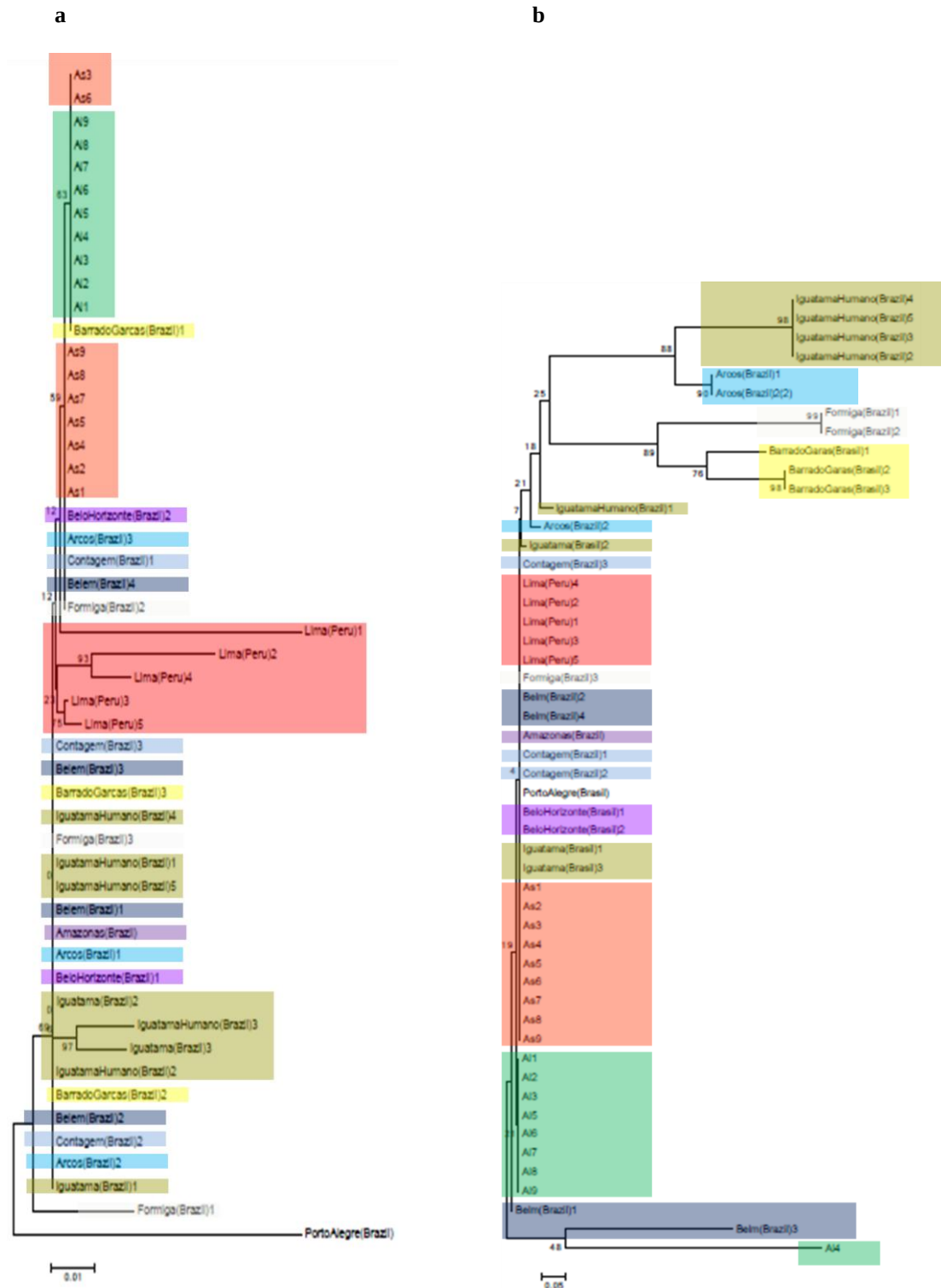


Figura 9: Análise filogenética; árvore de Neighbor-Joining de parasitos recuperados de diferentes localidades e dos parasitos recuperados dos suínos infectados experimentalmente. (a): Utilizando a região COXI, (b): Utilizando a região ITS1 (primer 2). Al = *A. lumbricoides* As = *A. suum*.

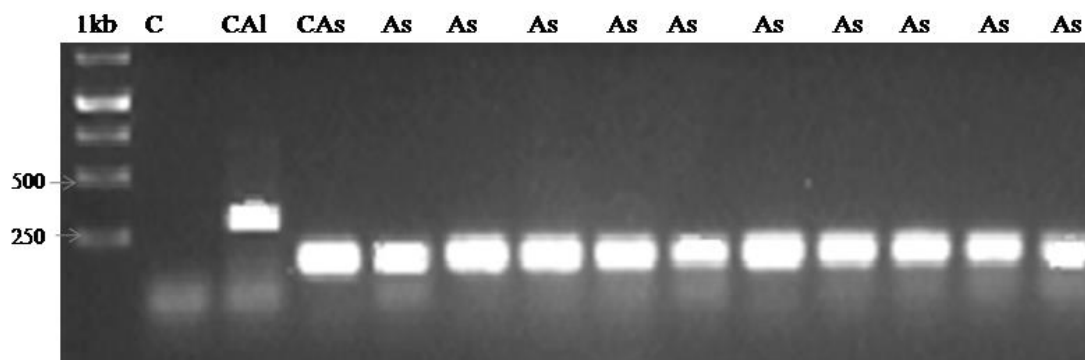


Figura 10: Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando a região ITS1 (primer 2), demonstrando os parasitos recuperados em diferentes localidades em suínos naturalmente infectados. Canaleta 1: Peso molecular de 1kb, canaleta 2: Controle negativo, canaleta 3: Controle de *A. lumbricoides*, canaleta 4: Controle de *A. suum*, nas canaletas seguintes amostras recolhidas em Manaus (AM), Palmas (TO), Barra do Garças (MT), Contagem (MG), Belo Horizonte (MG), Formiga (MG), Iguatama (MG), Arcos (MG), Porto Alegre (RS), (Brasil)e Lima no Peru respectivamente. Todas as amostras foram identificadas apresentando o perfil molecular referente a espécie *A. suum*.

5.3 CAPÍTULO 3

5.3.1 Infecção experimental em humanos utilizando ovos de *A. suum*

Cinco voluntários (A, B, C, D, E) infectados com 50 ovos embrionados de *A. suum*, foram clinicamente acompanhados, apresentando manifestações clínicas transitórias. Quatro dos indivíduos realizaram exame de raio x do tórax, após o décimo segundo dia da infecção. O voluntário “A” apresentou, infiltrado do interstício peribroncovascular difuso bilateralmente, cúpulas frênicas convexas, seios costofrênicos livres, arcabouço costal integro, coração e vasos da base dentro dos limites da normalidade (Figura 11 a). Os voluntários “B”, “C” e “D” apresentaram, infiltrado do tipo líneo-nodular difuso bilateralmente, e índices cardiorádico dentro da normalidade (Figura 11 b, 11 c, 11 d, respectivamente). Aos setenta e cinco dias um novo exame de raio x do tórax foi realizado, porém as imagens não apresentaram alterações significativas. O indivíduo “E” não quis realizar exame de raio x e apesar de ter realizado o tratamento não cedeu as fezes para análise.

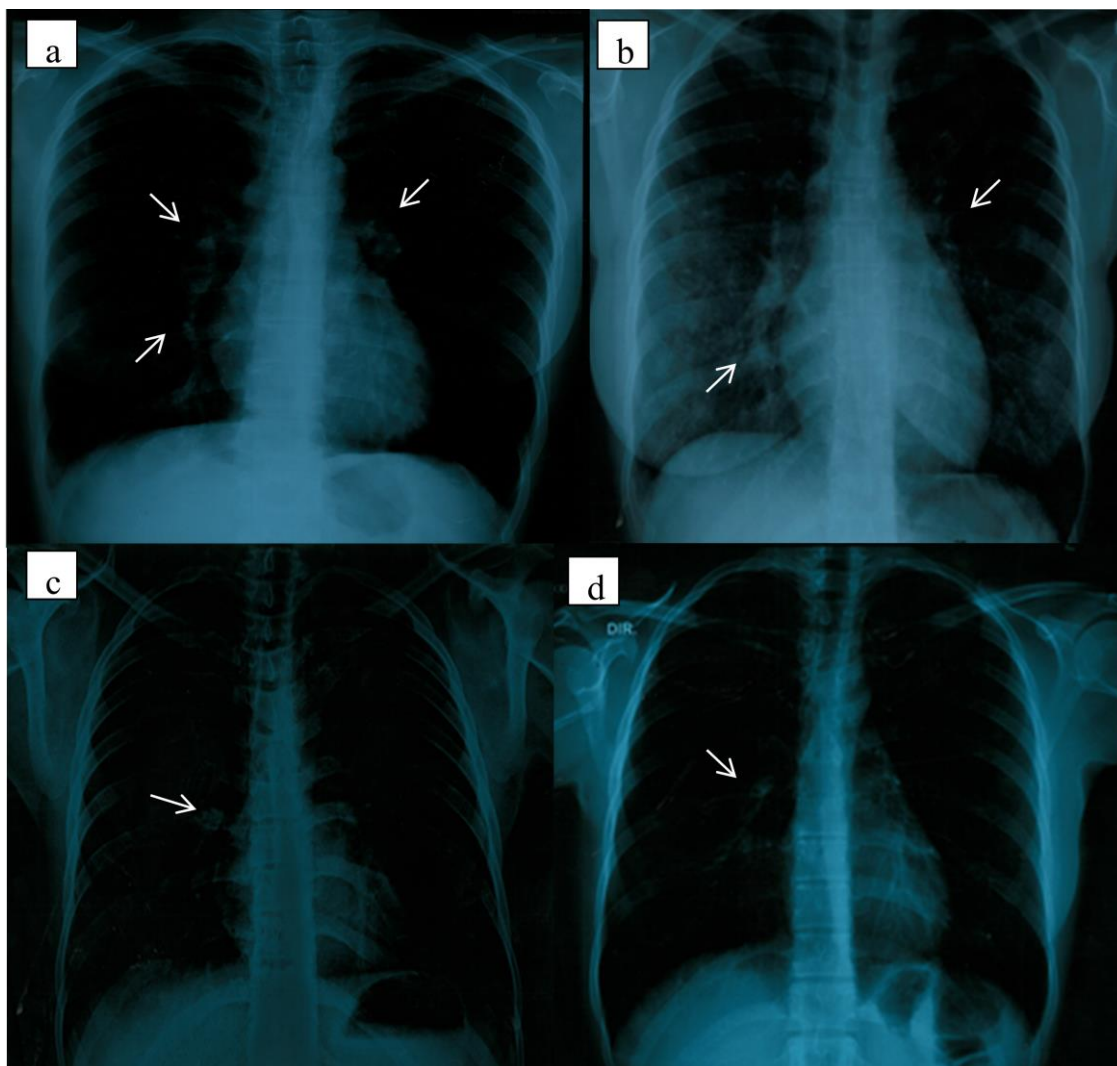


Figura 11: (a, b, c, d): Raio x de tórax demonstrando a migração pulmonar das larvas nos indivíduos após o décimo segundo dia de infecção com ovos embrionados de *A. suum*. Notar infiltrado celular do interstício peribroncovascular devido à migração pulmonar das larvas

Quanto à sintomatologia foi possível observar, entre os voluntários, que a tosse iniciou a partir do décimo dia de infecção, persistindo por até três semanas. O voluntário “E”, apresentou tosse por um período mais curto, apenas entre o décimo terceiro e décimo quarto dia, após a infecção (Figura 12). Os indivíduos “B” e “C”, apresentaram desconforto respiratório aos 8 e 9 dias, respectivamente, após a infecção, sendo que os sintomas, apesar de uma melhora progressiva e gradual, persistiram até 32 e 30 dias, respectivamente. Os voluntários “A” e “D” apresentaram desconforto respiratório após o décimo segundo dia de infecção persistindo até 33 e 25 dias, respectivamente. O indivíduo “E” não apresentou dispneia (Figura 12). Todos voluntários apresentaram cefaleia, que se mostrou uma manifestação clínica de curta duração, entre o décimo e décimo sexto dia após a infecção

(Figura 12). Quanto à diarreia: O voluntário “A” apresentou esse sintoma por seis dias, entre o décimo nono e vigésimo quarto dia, após a infecção, o voluntário “C” apresentou por 4 dias, entre o décimo nono e vigésimo segundo dia, após a infecção. O voluntário “D” apresentou por cinco dias, entre o vigésimo e vigésimo quinto dia, após a infecção, e o voluntário “E” apresentou por nove dias, entre vigésimo primeiro dia ao trigésimo dia após a infecção, o voluntário “B”, não apresentou diarreia (Figura 12).

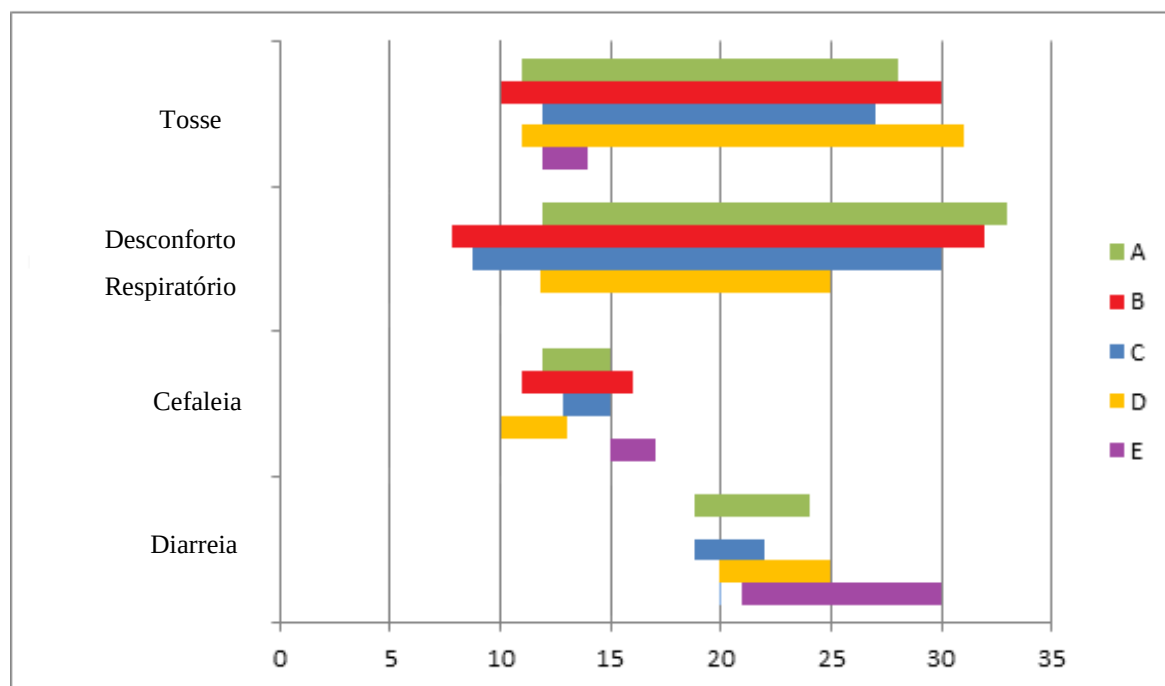


Figura 12: Período em relação aos dias e a sintomatologia dos voluntários, infectados com ovos embrionados de *A. suum*.

Foi verificado, pelo exame parasitológico de fezes, sedimentação espontânea (Lutz, 1919) e Kato-Katz (Katz et al. 1972) que o voluntário “A” apresentou ovos de *Ascaris* sp. nas fezes aos 80 dias após a infecção, os voluntários “B” e “D” aos 82 dias. Os voluntários “C” e “E” não apresentaram ovos nas fezes. Todos os voluntários foram tratados, aos oitenta e três dias após a infecção e os parasitos recuperados. No voluntário “A” foram recuperados 43 parasitos, no voluntário “B” 9, no voluntário “C” 3, no voluntário “D” 15 e o voluntário “E”, após o tratamento, não coletou as fezes para recuperação dos parasitos (Tabela 3). Em relação aos ovos por grama de fezes, foi observado que no voluntário “A” houve maior número de ovos, seguido dos voluntários “D” e “B”, respectivamente. No indivíduo “C” foram recuperados somente parasitos machos. O indivíduo “E” não apresentou ovos nas fezes (Tabela 3).

Tabela 3: Parasitos recuperados nas infecções humanas por *A. suum* e número de ovos por grama de fezes (OPG).

Indivíduos infectados com 50 ovos de <i>A. suum</i>	Número de parasitos recuperados		Total	Ovos por grama de fezes
	♂	♀		
A	19	24	43	20.307
B	3	6	9	12.011
C	3	0	3	0
D	3	12	15	15.869
E	*	*	*	0

* O voluntário não cedeu as fezes após o tratamento.

5.3.2 Análise molecular dos parasitos recuperados em infecções experimentais em humanos

Os iniciadores desenhados para este estudo amplificaram os seguimentos esperados, sendo possível diagnosticar que os voluntários, foram suscetíveis a espécie *A. suum* e os parasitos recuperados apresentaram o perfil molecular para a espécie *A. suum* (Figura 13).

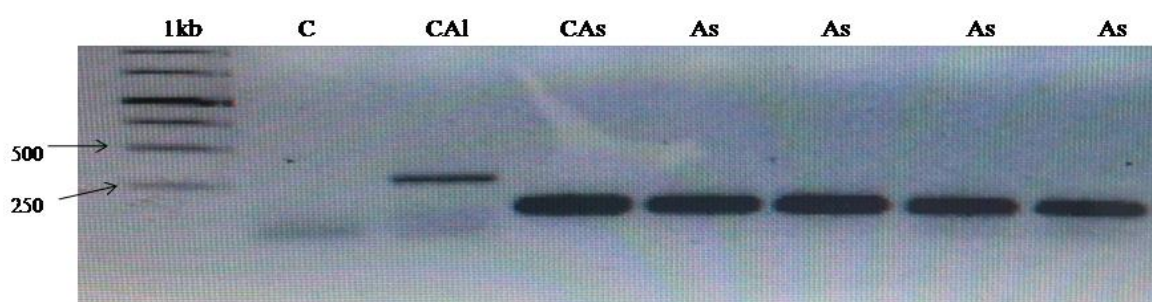


Figura 13: Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, utilizando o Primer ITS1 (Primer 2), demonstrando o perfil dos parasitos recuperados em infecções de humanos experimentalmente infectados com ovos embrionados de *A. suum*. Na canaleta 1: Peso molecular de 1kb, na canaleta 2: Controle negativo, na canaleta 3: Controle da espécie *A. lumbricoides*, na canaleta 4: Controle da espécie *A. suum*, na canaleta 5: Parasito recuperado do voluntário “A”, na canaleta 6: Parasito recuperado do voluntário “B”, na canaleta 7: Parasito recuperado do voluntário “C”, na canaleta 8: Parasito recuperado do voluntário “D”. Todas as amostras obtidas apresentavam perfil molecular referente a espécie *A. suum*.

6 – DISCUSSÃO

A alta prevalência de ascaridiose é considerada indicativa de falta de saneamento básico, comumente observado em áreas rurais e em periferias de grandes centros urbanos. Algumas iniciativas de saneamento foram responsáveis pelo declínio da infecção (Ferreira et al. 1991). Devido à dificuldade de distinção entre as espécies e da falta de conhecimento acerca se *Ascaris* sp. de origem suína estaria envolvido na infecção em humanos ou vice-versa, o status taxonômico vem cada vez mais sendo estudado, com o intuito de esclarecer se realmente são espécies distintas (Anderson, 2001, Arizono et al. 2010, Betson et al. 2014, Leles et al. 2012, Peng et al. 2006).

Por serem consideradas espécies crípticas, desde a sua descrição o status taxonômico de *A. lumbricoides* e *A. suum* vem sendo debatido principalmente devido à falta de um caráter morfológico macroscópico capaz de diferenciá-los (Iñiguez et al. 2012). Os resultados deste trabalho referentes a morfologia dos dentículos presentes nas bordas dos lábios trilobados, analisados por microscopia óptica, são compatíveis com as características demonstradas, por Sprent (1952), onde demonstrou que os dentículos da espécie *A. lumbricoides* são côncavos ao passo que em *A. suum* são triangulares, porém estes dentículos são de difícil visualização, necessitando do preparo da amostra, especialistas para este tipo de análise para a identificação das estruturas. A microscopia eletrônica de varredura pode ser uma alternativa para a análise destes dentículos, uma vez este tipo de técnica proporciona um aumento considerável do tamanho das estruturas a serem avaliadas. Neste trabalho foi realizado a metodologia que torna mais fácil a visualização destas estruturas, pela microscopia eletrônica, onde foi possível analisar detalhadamente esses dentículos e assim poder distinguir estas espécies pela morfologia. Embora a microscopia eletrônica de varredura possa tornar a identificação mais fácil, o preparo da amostra requer técnicos qualificados para a utilização dos equipamentos e profissionais qualificados para realizar os cortes precisos dos lábios.

Devido a estas dificuldades o uso de outras metodologias é imprescindível para facilitar na identificação, como a utilização de marcadores moleculares. Esta técnica vem obtendo sucesso na identificação de espécies crípticas, pois geneticamente existem diferenças entre as espécies. Entre os marcadores moleculares o DNA mitocondrial é o mais utilizado em estudos envolvendo genética de populações e filogenia, por oferecer diversas vantagens para análises intra e inter específicas (Avise, 2000, Avise et al. 1987, Frankham et al. 2002). O

gene COI do DNAm_t apresenta geralmente uma pequena variação dentro de indivíduos de uma mesma espécie, enquanto que em indivíduos de espécies distintas esta diferença é marcante, sendo uma característica importante para que seja um marcador molecular informativo para discriminação taxonômica (Sheffield et al. 2009). Já a região ITS1, é um dos marcadores mais comuns usados para discriminar espécies de nematoides (Gasser & Newton, 2000). Com estas alternativas estes genes podem ser utilizados para diferenciar as espécies de *Ascaris* sp. pela biologia molecular, contudo estas espécies também são muito semelhantes geneticamente (Liu et al. 2012, Peng et al. 2007, Peng et al. 2005). Estudos que têm usado alvos mitocondriais para estudar a epidemiologia molecular de *Ascaris* sp. têm sugerido que há particular afiliação de haplótipo pelo hospedeiro humano ou suíno. Durante os últimos anos pesquisas empregando ferramentas moleculares foram descritas na diferenciação dessas espécies (Arizono et al. 2010, Liu et al. 2012, Peng et al. 2005) porém sem resultados conclusivos.

Devido as semelhanças significativas entre estas espécies, no presente estudo foi elaborado um método para diferenciar estes parasitos, onde foi observado a região ITS1 e COXI. Neste estudo foi demonstrada a variabilidade das espécies utilizando o marcador ITS1 em *Ascaris* sp., sugerindo o uso desta região como marcador molecular para definir e caracterizar genótipos de *Ascaris* sp. de origem humana e suína.

Para maior confiabilidade deste estudo as amostras de parasitos *A. lumbricoides* utilizadas para identificação morfológica e molecular, como os ovos recuperados utilizados para as infecções experimentais, foram obtidas a partir de parasitos expelidos naturalmente de uma criança moradora da região central da cidade de Belo Horizonte, Brasil. O local em que a criança residia não havia criação de suínos próximo. A infecção pode ter ocorrido, pelo fato da região onde ela reside não existir saneamento básico (Andreazzi, 2007, Oliveira & Amor 2012, Silva et al. 2012). Os parasitos da espécie *A. suum* foram obtidos em matadouros de suínos, onde os animais eram mantidos confinados até o abate. A infecção dos suínos pode ter ocorrido pela ingestão de fezes contaminadas com ovos embrionados nas granjas de criação (Nishi et al. 2000).

Os iniciadores desenhados para este estudo foram capazes de distinguir as espécies *A. lumbricoides* de *A. suum*, sendo estes resultados bastante expressivos, pois estes primers poderão ser utilizados para análise do potencial de infectividade entre estas duas espécies. Além do perfil molecular, também foi realizado a comparação morfológica dos dentículos destes parasitos. Foi possível observar que os caracteres morfológicos e moleculares se enquadravam para as espécies referidas, portanto agora podemos compreender o potencial de

suínos nas infecções em humanos, através destes tipos de análises uma vez que a natureza zoonótica de *A. suum* não estava totalmente esclarecida.

Como foi desenvolvida uma técnica molecular capaz de diferenciar estes parasitos, além de poder contar com a diferenciação morfológica entre estas espécies, o intuito de compreender se somente a espécie *A. lumbricoides* é responsável pelo alto número de pessoas infectadas pelo mundo, ou ainda se a espécie *A. suum* pode estar envolvido em infecções de humanos o que contribuiria para o entendimento da epidemiologia da ascaridiose no mundo. Considerando que o diagnóstico desta parasitose é baseado apenas no exame parasitológico de fezes e que os ovos destas duas espécies são indistinguíveis, nossos dados apontam que humanos poderiam estar infectados por parasitos de origem suína ou vice-versa (Arizono et al. 2010, Leles et al. 2012), contribuindo para a alta prevalência de ascaridiose. Além disso, pelo fato de *A. suum* infectar humanos, esta parasitose passa a ter um caráter zoonótico. A técnica de diferenciação molecular, desenvolvida no presente trabalho foi utilizada para identificação de parasitos em humanos naturalmente infectados por *Ascaris* sp. Diversos fatores são capazes de interferir na prevalência da ascaridíase como área geográfica, nível socioeconômico, acessibilidade a bens e serviços, estado nutricional, idade, ocorrência de predisposição à infecção parasitária e a falta de saneamento (Campos et al. 2002). Baseado nestes fatores é que determinamos a área a ser trabalhada para este estudo, além da existência de vários indivíduos que criam extensivamente suínos em seu peri domicílio.

No presente estudo, após a análise molecular e morfológica dos parasitos recuperados em humanos, foi diagnosticado que um dos indivíduos analisados, apresentava infecção por parasitos da espécie *A. suum*, ou seja, podemos inferir que esta parasitose apresenta o caráter zoonótico. A infecção deste indivíduo pode ter ocorrido pela proximidade de sua casa com a criação dos suínos, onde os dejetos destes animais contaminados, associado ao grande número de ovos liberados junto as fezes para o meio ambiente, podem estar perpetuando com a contaminação do solo e da água o que constitui o principal mecanismo de disseminação desta espécie de parasito, contribuindo para a infecção de novos indivíduos (Lima et al. 2013). Outro fator preocupante é que os criadores de suínos utilizam os excrementos dos animais para adubar hortaliças, o que pode contribuir para a contaminação dos alimentos, além disso os indivíduos que criam suínos lavam diariamente os chiqueiros, onde são criados os animais e os dejetos são lançados *in natura* para córregos, que são afluentes de rios e muitos agricultores utilizam desta água para irrigação.

A irrigação com águas fluviais é praticada em boa parte da agricultura, sendo mais comum em países em desenvolvimento, que não têm capacidade para tratar a água com

eficácia (Ensink et al. 2005, Scott et al. 2004). A utilização deste tipo de água proporciona aumento da produtividade e redução do uso de fertilizantes inorgânicos, constituindo a única alternativa de algumas localidades como recursos hídricos. Dentre os principais riscos de saúde associados a esta prática estão as infecções intestinais por parasitos, em especial por *Ascaris* sp., que também está associada com o uso de excrementos como fertilizantes na agricultura (Trang et al. 2007). Logo não apenas os indivíduos moradores do município correm risco de adquirir esta parasitose uma vez que a crescente demanda de produtos alimentícios em grandes centros urbanos é cada vez mais dependente de cidades do interior, logo toda a população corre os riscos de adquirir esta parasitose, uma vez que bens de produtos da agricultura são fornecidas para várias regiões do país. Como o diagnóstico desta parasitose é baseado na morfologia dos ovos presentes nas fezes, e estes ovos são indistinguíveis entre as espécies de *Ascaris* sp. é necessário rever medidas de controle e diagnóstico da ascaridiose.

Em relação aos outros parasitos encontrados na população amostrada os resultados deste trabalho são compatíveis com os dados da literatura, em que se faz a relação da frequência das parasitoses intestinais com as condições de saneamento básico ou falta de informação da população (Hussein, 2010, Seixas et al. 2001, Silva et al. 2010, Vasconcelos et al. 2011). Apesar da região estudada apresentar boas condições de saneamento, os resultados demonstram que ainda assim são encontrados indivíduos parasitados, principalmente pela falta de orientação e higiene, pois não bastam apenas mínimas condições de saneamento básico e políticas públicas de planejamento urbano e habitacional, há também que incentivar práticas educacionais de orientação e conscientização da necessidade de adquirirem os conhecimentos para prevenção de parasitoses. Embora a ascaridiose não esteja associada com alta mortalidade estes parasitos podem afetar o equilíbrio nutricional, pois interferem na absorção de nutrientes, reduzem a ingestão alimentar e ainda podem causar complicações significativas, como obstrução intestinal e diarreia crônica (Matozinho, 2012).

Como neste estudo foram encontrados humanos naturalmente infectados foi realizado a infecção experimental em suínos visando compreender o perfil parasitológico de *Ascaris* sp. Nas infecções experimentais realizadas em suínos foi possível observar um maior número de parasitos recuperados em infecções utilizando ovos de *A. suum* e na infecção mista, em relação à infecção com *A. lumbricoides*. Isto provavelmente ocorreu devido a uma maior relação do parasito com hospedeiro (Ferreira et al. 2012). Uma vez que todos os parasitos recuperados nas infecções mistas também eram da espécie *A. suum*. Esta adaptação parasito hospedeiro também pode estar envolvida na migração larvar, onde nos suínos infectados por

A. lumbricoides o tempo referente ao período pré-patente foi maior, quando comparado com os demais grupos infectados, uma teoria pode ser explicada pelo fato das larvas terem demorado um tempo maior até chegarem ao intestino, para se desenvolver em adultos e começar a postura. Em relação ao número de ovos por grama de fezes, a menor quantidade de ovos observada nas infecções utilizando ovos de *A. lumbricoides* está relacionada ao número de parasitos recuperados, pois quanto menor o número de parasitos, menor será o número de ovos encontrados nas fezes. Mesmo nas infecções utilizando ovos de *A. lumbricoides* apresentarem um menor número de ovos por grama de fezes, estes dados são relevantes, uma vez que mesmo recuperando poucos parasitos, cada fêmea deste pode liberar milhares de ovos por dia e esses ovos podem contaminar o ambiente e consequentemente infectar humanos ou suínos, contribuindo para a epidemiologia desta parasitose. No caso dos suínos podendo ser um reservatório em potencial para a população humana (Arizono et al. 2010, Nejsun et al. 2012, Nejsun et al. 2005).

Quanto ao peso dos animais, não foi observado diferença em relação ao ganho de peso nos dias antecedentes à infecção, quando os animais foram separados por grupos. Uma explicação para este fato é que esses animais foram alimentados com ração de forma balanceada e eram criados de maneira intensiva. Aos sessenta dias de idade, quando os animais estavam infectados havia dez dias, houve diferença significativa em relação ao ganho de peso, dos animais mantidos como controle (não infectados) em relação aos animais infectados, isso provavelmente ocorreu devido ao fato desse animais ficarem depauperados no início da infecção, quando diminuíram a ingestão da ração fornecida, resultando em perda de peso. Após 10 dias de infecção os animais infectados voltaram a alimentar, porém não atingiram o mesmo peso dos animais controle. Em granjas os animais vão para o abate em média aos cinco meses de idade (Dias et al. 2011). Quando os animais adultos apresentam baixa carga parasitaria, com a presença do parasito *A. suum* geralmente não há perda de peso, desde que sejam alimentados com ração balanceada e mantidos confinados, porém se a carga parasitaria for maior ou os animais mantidos de forma extensiva ocorrerá um retardo no crescimento, principalmente quando jovens, demorando maior tempo para chegar ao peso de abate, refletindo em perdas para os suinocultores (Jesus & Miller, 2000, Moreno et al. 2012). Outro fator que leva a perda de lucros na suinocultura, independente da carga parasitaria, é a condenação dos fígados quando infectados por *A. suum*, que podem apresentar manchas, não podendo ser aproveitados para o consumo (Dias et al. 2011).

Neste experimento os parasitos recuperados nas infecções experimentais em suínos foram submetidos pela análise morfológica para observação dos dentículos, pela microscopia

eletrônica de varredura e microscopia ocular. Foi possível diferenciar as espécies pelo formato dos dentículos presentes nas bordas dos lábios sendo em *A. lumbricoides* as extremidades côncavas e em *A. suum* as extremidades triangulares. Na análise molecular os perfis dos parasitos também se enquadraram para as espécies referidas. Embora todos parasitos recuperados na infecção mista fossem da espécie *A. suum* foi realizado a extração de DNA, de um pool de ovos, uma vez que esses ovos poderiam ser híbridos, como demonstrado, na Guatemala, por Anderson (2001), encontrando dois diferentes perfis de ITS de *Ascaris* sp. sugerindo uma hibridização, porém neste estudo os ovos analisados apresentavam o perfil molecular da espécie *A. suum*.

Quanto a filogenia os haplótipos de *Ascaris* sp. dos parasitos recuperados se agruparem, ficando de maneira bem homogenia, na análise da árvore genética pode ser uma evidência no passado de transmissão cruzada deste haplótipo de humano para suínos ou vice-versa, uma vez que humanos domesticaram suínos há aproximadamente dez mil anos (Loreille et al. 2001). No trabalho de Leles (2010) foi demonstrado a análise da árvore genética, os genes mitocondriais, em geral de *Ascaris* sp. do Brasil agruparam com haplótipos de *Ascaris* sp. de baixa prevalência na China. O cenário mais relevante desta infecção no Brasil referente ao gene COXI, que foi encontrado exclusivamente em porcos na China, foi mais prevalente em humanos no Brasil e adicionalmente também encontrado em uma amostra suína. O mesmo foi observado na análise do gene *nad1*, onde o novo haplótipo mais prevalente em humanos no Brasil também foi encontrado em uma amostra de suíno.

Nos estudos aqui conduzidos podemos observar uma semelhança genética dos parasitos obtidos, das várias regiões do Brasil e de Lima no Peru. O agrupamento das espécies de *Ascaris* sp. recuperados, sugerem que estas espécies são realmente muito próximas. Em estudos realizados por Cavallero et al. (2013), utilizando duas variações genéticas COXI e ITS, sugerem que haplótipos de *Ascaris* sp. compartilhados entre suínos e humanos poderia ser explicado por processos evolutivos tais como a interação de ancestrais polimórficos. Os resultados não mostraram muitas diferenças em parasitos de humano ou de suínos, descrevendo duas entidades taxonômicas intimamente interligadas e portanto, um provável fluxo gênico entre estas espécies. Os dados obtidos neste trabalho também mostram uma semelhança entre estas espécies (Cavallero et al. 2013). Estes dados podem inferir fortemente a ausência de uma grande barreira genética entre os dois táxons e, portanto, sugerem que *A. suum* e *A. lumbricoides* podem ser variantes de uma espécie ancestral.

Em relação à questão se *A. suum* pode ser transmitido para humanos, este dado é de extrema importância para a saúde pública. Até agora evidências da infecção foram baseadas

em análises moleculares (Arizono et al. 2010, Leles et al. 2012, Peng et al. 2007). Entretanto muito ainda se discute sobre a espécie de parasitos oriundos de suínos poder ou não se tratar de uma zoonose. Infecções experimentais em humanos utilizando ovos de *Ascaris suum* já foram realizadas (Buckley, 1931, Koino, 1922, Phills et al. 1972) porém nenhum destes autores obtiveram sucesso na recuperação de parasitos adultos. Pode ser devido ao fato de que durante a migração larvar a resposta imunológica do hospedeiro exerça papel vital no controle ou eliminação das larvas (Resende et al. 2015).

No presente estudo, nas infecções experimentais em humanos com ovos de *Ascaris suum* foi possível observar infiltrado celular nos pulmões dos indivíduos infectados, devido a migração larvar. Os voluntários apresentaram tosse, desconforto respiratório, cefaleia, coincidindo com o período de migração das larvas pelos pulmões. Essa sintomatologia é comum em infecções humanas pela espécie *A. lumbricoides* conhecida como ciclo de Loss (Tavares-Neto et al. 2003). Nos experimentos conduzidos neste estudo foi possível recuperar parasitos adultos em quatro dos voluntários infectados. Estes indivíduos apresentavam boa saúde, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento do parasito. Nos voluntários (A, B e D) foram recuperados uma quantidade significativa de parasitos, no voluntário (C) foi recuperado um menor número de parasitos, isso pode ter ocorrido devido ao fato deste indivíduo ter relatado já ter sido parasitado por *Ascaris* sp. e ter adquirido resistência quanto a infecção pelo parasito.

Os estudos aqui conduzidos são de grande valia onde foi possível observar uma diferença morfológica capaz de diferenciar as espécies, mas devido à dificuldade em observá-las foram desenhados iniciadores os quais são de grande importância pois estes são capazes de diferenciar estas espécies. Portanto podemos inferir se humanos estão sendo infectados por *A. suum*, e caso isso esteja ocorrendo em outras áreas, será necessário rever como intervir no controle desta parasitose para que a mesma seja controlada em diversos países, além de ser necessário rever os programas existentes para o controle desta parasitose.

7 – CONCLUSÕES

- Existem diferenças morfológicas microscópicas nos dentículos entre as espécies *A. lumbricoides* e *A. suum*, sendo possível identificá-las para a diferenciação destas espécies;
- Os primers desenhados e utilizados para este estudo foram capazes de diferenciar as espécies *A. lumbricoides* de *A. suum*;
- Suínos são suscetíveis a infecção experimental por *A. lumbricoides*;
- Geneticamente as espécies *A. lumbricoides* e *A. suum* são muito próximas;
- Humanos são suscetíveis a infecção experimental por *A. suum*;
- Humanos são suscetíveis a infecção natural por *A. suum*;
- A ascaridíase é uma zoonose.

8 - REFERÊNCIAS

- Anderson RC 2000. Ascaridida. In: Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission. 2 nd. New York: CABI Publishing 5: 245-347.
- Anderson TJC 2001. The dangers of using single locus markers in parasite epidemiology *Ascaris* as a case study. *Trends Parasitology* 17: 183-188.
- Andreazzi MAR, Barcellos C, Hancon S 2007. Old indicators for new problems: The relationship between sanitation and health. *Revista Panamericana de Salude Pública* 22: 211-217.
- Arizono N, Yoshimura Y, Tohzaka N, Yamada M, Tegoshi T, Onishi K, Uchikawa R 2010. Ascariasis in Japan: Is pig-derived *Ascaris* infecting humans? *Journal of Infectious Diseases* 63: 447-448.
- Avice JC 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Cambridge: Harvard University Press.
- Avice JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders, NC 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews in Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Barbosa WB 2010. Hydrological influence in the occurrence of enteroparasitoses in two riverine communities of the Middle Solimões, Amazonas. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* 9: 113-118.
- Bertsch A, Schweer H, Titze A, Tanaka H 2005. Male labial gland secretions and mitochondrial DNA markers support species status of *Bombus cryptarum* and *B. magnus* (Hymenoptera, Apidae). *Insectes Sociaux* 52: 45-54.

Betson M, Nejsum P, Bendall RP, Deb R, Stothard Jr. 2014. Molecular epidemiology of Ascariasis: A global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *The Journal of Infectious Diseases* 210: 932–941.

Buckley JJC 1931. An observation on human resistance to infection with *Ascaris* from the pig. *Journal of Helminthology* 9: 45-46.

Busato MA, Antonioli MA, Teo CRPA, Ferraz L, Poli G, Tonini P 2014. Relação de parasitoses intestinais com as condições de saneamento básico. *Ciência Cuidado e Saúde* 12: 357-363.

Cameron SA, Williams PH 2003. Phylogeny of bumblebees in the New World subgenus *Fervidobombus* (Hymenoptera: Apidae): Congruence of molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 28: 552-563.

Campos MR, Valencia LIO, Fortes BPMD, Braga RCC, Medronho RA 2002. Spatial distribution of *Ascaris lumbricoides* infection. *Revista de Saúde Pública* 36: 69-74.

Cavallero S, Snabel V, Pacella F, Perrone V, D'Amelio S 2013. Phylogeographical studies of *Ascaris* spp. based on Ribosomal and Mitochondrial DNA sequences. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7: 1-9.

CDC Centers for Disease Control and Prevention Disponível em <<http://www.cdc.gov/parasites/ascariasis/biology.html>> 2015. Acesso em 1 de março de 2015.

Chieffi PP, Benício MHA, Dias RMS, Torres DMAGV, Mangini ACS 1988. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil) 1984/1985. Parasitoses intestinais. *Revista de Saúde Pública* 22: 8-15.

Coelho LMPS, Oliveira SM, Milman MHSA, Karasawa KA, Santos RP 2001. Detection enteroparasites transmissible forms in water and raw vegetables consumed in preschools from Sorocaba, São Paulo state Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 479-482.

Coles GC, Jacksonb F, Pomroyc WE, Prichardd RK, Samson-Himmelstjerna GV, Silvestre A, Taylor MA, Vercruysse J 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 136: 167-185.

Costa-Macedo LM, Costa MCE, Almeida LM 1999. *Ascaris lumbricoides* in infants: A population-based study in Rio de Janeiro, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 15: 173-178.

Criscione CD, Anderson JD, Sudimack D, Peng W, Jha B, Williams-Blangero S, Anderson TJ 2007. Disentangling hybridization and host colonization in parasitic roundworms of humans and pigs. *Proceedings Biological Sciences* 274: 2669-2677.

Darawshe S, Tsafadyah Y, Daniel E 1987. Quaternary structure of erythrocrucorin from the nematode *Ascaris suum*. *Biochemical Journal* 242: 689-694.

Dias AS, Tanure AM, Manhaes HGVC 2011. Occurrence of the *Ascaris suum* in slaughtered swine in Zona da Mata region, Minas Gerais state. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 48: 101-106.

Ellis JS, Knight ME, Goulson D 2005. Delineating species for conservation using mitochondrial sequence data: The taxonomic status of two problematic *Bombus* species (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Insect Conservation* 9: 75-83.

Ensink JHJ, Hoek WVD, Mukhtar M, Tahir Z, Amerasinghe FP 2005. High risk of hookworm infection among wastewater farmers in Pakistan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99: 809-818.

Estoup A, Solignac M, Cornuet JM, Goudet J, Scholl A 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Molecular Ecology* 5: 19-31.

Ferreira CS, Ferreira UM, Nogueira MR 1991. Prevalência e intensidade de infecção por *Ascaris lumbricoides* em amostra populacional urbana. *Cadernos de Saúde Pública* 7: 82-89.

Ferreira GR, Andrade CFS 2005. Alguns aspectos socioeconômicos relacionados a parasitoses intestinais e avaliação de uma intervenção educativa em escolares de Estiva Gerbi, SP. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38: 402-405.

Ferreira H, Lala ERP, Monteiro MC, Raimondo ML 2006. Estudo epidemiológico localizado da frequência e fatores de risco para enteroparasitoses e sua correlação com o Estado nutricional de crianças em idade pré-escolar: Parasitoses intestinais e desenvolvimento infantil. *Ciências Biológicas e Saúde* 12: 33-40.

Ferreira LF, Chieffi PP, Araujo A 2012. Parasitismo não é doença parasitária *Norte Ciência* 3: 200-221.

Ferreira VS, Lima, AGD, Pessoa C, Paz FSS, Jesus J 2013. Comparative study of intestinal parasites occurring in two areas Barreiras, Bahia. *Natureza* 11: 90-95.

Fonseca EOL, Barreto ML, Carmo EH, Costa MCN 2010. Prevalência e fatores associados às geo-helminthiases em crianças residentes em municípios com baixo IDH no Norte e Nordeste brasileiro. *Cadernos de Saúde Pública* 26: 143-152.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA 2002. Introduction to Conservation Genetics. *New York: Cambridge University Press* 617 p.

Frei F, Juncansen C, Ribeiro-Paes JT 2008. Levantamento epidemiológico das parasitoses intestinais: Viés analítico decorrente do tratamento profilático. *Cadernos de Saúde Pública* 24: 2919-2925.

Frontera E, Alcaide M, Domínguez-Alpízar JL, Boes J, Reina D, Navarrete I 2005. Evidence of interaction between *Ascaris suum* and *Metastrongylus apri* in experimentally infected pigs. *Veterinary Parasitology* 127: 295-301.

Gasser RB, Newton SE 2000. Bursate nematodes: Significance, implications and prospects. *Genomic and Genetic* 30: 509-534.

Gazzinelli-Guimarães PH, Gazzinelli-Guimarães AC, Silva FN, Mati VLT, Dhom-Lemos LC, Barbosa FS, Passos LSA, Gaze S, Carneiro CM, Bartholomeu DC, Bueno LL, Fujiwara RT. 2013. Parasitological and immunological aspects of early *Ascaris* spp. infection in mice. *International Journal for Parasitology* 43: 697-706.

Giatti LL, Rocha AA, Santos FA, Bitencourt SC, Pieroni SRM 2004. Basic sanitary conditions in Iporanga, São Paulo state, Brazil. *Revista de Saúde Pública* 38: 571-577.

Hale OM, Stewart TB, Marti OG 1985. Influence of an experimental infection of *Ascaris suum* on performance of pigs. *Journal of Animal Science* 60: 220-225.

Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA 2007. DNA barcoding: How it compliments taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23: 167-172.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 270: 313-321.

Hebert PDN, Ratnasingham S, Dewaard Jr. 2003b. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 270: 96-99.

Herschmann H 1960. Gross Morphology of Nematodes. In: Sasser JN & Jenkins WR *Nematology* 9: 125-129.

Hines HM, Cameron SA, Williams PH 2006. Molecular phylogeny of the bumble bee subgenus *Pyrobombus* (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*) with insights into gene utility for lower level analysis. *Invertebrate Systematics* 20: 289-303.

Hunter MM, McKay DM 2004. Review article: Helminths as therapeutic agents for inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology Therapeutics* 19: 167-177.

Hussein AS 2010. Prevalence of intestinal parasites among school children in northern districts of West Bank- Palestine. *Tropical Medicine & International Health* 16: 240-244.

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Municípios Brasileiros*. Disponível em <www.ibge.gov.br/cidadesat/default.pbh>2010. Acesso em 30 de dezembro de 2013.

Iñiguez AM, Leles D, Jaeger LH, Carvalho-Costa FA, Araujo A 2012. Genetic characterisation and molecular epidemiology of *Ascaris* spp. from humans and pigs in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 106: 604-612.

Jesus LE, Raposo RP, Guazelli A 2004. Ascariíase biliar complicada: Espectro de problemas e táticas cirúrgicas. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias* 31: 172-179.

Jesus LE, Sias SMA, Vieira AA, Gonçalves IT, Villalba RDCV, André MRF 2008. Hepatobiliary ascariasis complicated by lipid pneumonia. *Revista Paulista de Pediatria* 26: 167-172.

Jesus LP, Miller G. 2000. Helminths of the stomach of swine in the region of Pelotas. *Revista Brasileira de Agrociência* 6: 181-187.

Katz N, Chaves A, Pellegrino, J 1972. A simple device for quantitative stoolthick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 14: 397-400.

Kim MJ, Yoon HJ, Im HH, Jeong HU, Kim M. I, Kim SR, Kim I 2009. Mitochondrial DNA sequence variation of the bumblebee, *Bombus ardens* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 12: 133-139.

Köhler F 2007. From dna taxonomy to barcoding how a vague idea evolved into a biosystematic tool. *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin Zoologische Reihe* 83: 44-51.

Koino S 1922. Experimental Infection of the Human Body with *Ascarides*," *Japan Med. Wld.*, 2: 317-320.

Koulianos, S 1999. Phylogenetic Relationships of the Bumblebee Subgenus *Pyrobombus* (Hymenoptera: Apidae) Inferred from Mitochondrial Cytochrome B and Cytochrome Oxidase I Sequences. *Entomological Society of America* 92: 355-358.

Koulianos S, Schmid-Hempel P 2000. Phylogenetic relationships among bumble bees (*Bombus latreille*) inferred from mitochondrial cytochrome b and cytochrome oxidase I sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 335-341.

Leles D, Araujo A, Vicente AC, Iñiguez A, 2010. ITS1 intra-individual variability of *Ascaris* isolates from Brazil. *Parasitology International* 59: 93-96.

Leles D, Gardner SL, Reinhard K, Iñiguez A, Araujo A 2012. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasites & Vectors* 5: 1-7.

Lima DS, Mendonça RA, Dantas FCM, Brandão JOC, Medeiros CSQ 2013. Parasitoses intestinais infantis no nordeste brasileiro: uma revisão integrativa da literatura. *Ciências Biológicas* 1: 71-80.

Lignon GB, Sobestiansky J, Mores N, Guidoni AL 1985. Ação do oxibendazole frente à migração de larvas de *Ascaris suum* em suínos. Comunicado Técnico, EMBRAPA, CNPSA. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/ct/86/embrapa-cnpsa>, abril> 1985. Acesso em 10 dezembro de 2014.

Liu GH, Wu CY, Song HQ, Wei SJ, Xu MJ, Lin RQ, Zhao GH, Huang SY, Zhu XQ 2012. Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene* 492: 110-116.

Lopes, ERN, Alcântara MOVL, Santos NAB, Ferraz MIF, 2014. Estudo da relação entre saneamento básico e a incidência de doenças na Bahia – Uma análise comparativa entre 2002, 2007 e 2012. *Enciclopédia biosfera* 10: 3872-3887.

Loreille O, Roumat E, Verneau O, Bouchet F, Hänni C 2001. Ancient DNA from *Ascaris*: Extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *International Journal for Parasitology* 31: 1101-1106.

Ludwig FF, Firmino AF, Paes JTR 1999. Correlation between sanitation conditions and enteroparasitoses in the population of Assis, São Paulo state, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32: 547-555.

Lutz A 1919. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 11: 121-145.

Malik AH, Saima BD, Wani MY 2006. Management of hepatobiliary and pancreatic ascariasis in children of an endemic area. *Pediatric Surgery International* 22: 164-688.

Massara CL, Ferreira RS, Andrade LD, Guerra HL, Carvalho OS 2003. Effects of detergents and disinfectants on the development of *Ascaris lumbricoides* eggs. *Cadernos de Saúde Pública* 19: 335-340.

Matozinho FCL 2012. Padronização de metodologia para detecção de ovos e larvas de helmintos em alface. (Tese em Parasitologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 82 p.

Mejer H, Roepstorff A 2006. *Ascaris suum* infections in pigs born and raised on contaminated paddocks. *Parasitology* 3: 305-312.

Mensagem AM, Barnes AN, Cinza GC 2014. Reverse zoonotic disease transmission (zooanthroponosis): A systematic review of seldom-documented human biological threats to animals. *PloS One* 9: 1-9.

Moreno LG, Pino LA, Morales G, Alvares LP, Balestrini, C 2012. *Ascaris suum*: Prevalência y distribución em uma granja porcina del estado carabobo Venezuela. *Veterinaria Tropical* 25: 229-235.

Nejsum P, Betson M, Bendall RP, Thamsborg SM, Stothard JR 2012. Assessing the zoonotic potential of *Ascaris suum* and *Trichuris suis*: Looking to the future from an analysis of the past. *Journal Helminthology* 86: 148–155.

Nejsum P, Parker Jr ED, Frydenberg J, Roepstorff A, Boes J, Haque R, Astrup I, Prag J, Sorensen UBS 2005. Ascariasis a zoonosis in denmark. *Journal Clinical Microbiology* 43: 1142-1148.

Nishi SM, Gennari SM, Lisboa MNTS, Silvestrim A, Caproni LJ, Umehara O 2000. Parasitas intestinais em suínos confinados nos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Arquivo do Instituto Biológico* 67: 199-203.

Oliveira UD, Chiuchetta SJR 2010. Ocorrência de enteroparasitoses na população do Município de Goioerê-PR. *UNICiências* 14: 150-158.

Oliveira VF, Amor ALM 2012. Associação entre a ocorrência de parasitos intestinais e diferentes variáveis clínicas e epidemiológicas em moradores da comunidade Ribeira I, Araci, Bahia, Brasil. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 44: 15-25.

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

Peng W, Yuan K, Hu M, Gasser RB 2007. Recent insights into the epidemiology and genetics of *Ascaris* in China using molecular tools. *Parasitology* 134: 325-330.

Peng W, Yuan K, Hu M, Peng G, Zhou X, Hu N, Gasser RB 2006. Experimental infections of pigs and mice with selected genotypes of *Ascaris*. *Parasitology* 133: 651-657.

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

Peng W, Yuan K, Zhou X, Hu M, El-Osta YG, Gasser RB 2003. Molecular epidemiological investigation of *Ascaris* genotypes in China based on single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal DNA. *Electrophoresis* 24: 2308-2315.

Phills JA, Harrold J, Whiteman GV 1972. Pulmonary infiltrates asthma and eosinophilia due to *Ascaris suum* infestation in man. *The New England Journal of Medicine* 286: 965-970.

Pirounakis K, Koulianos S, Schmid-Hempel P 1998. Genetic variation among European populations of *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, Apidae) using mitochondrial DNA sequence data. *European Journal of Entomology* 95: 27-33.

Resende NM, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS, Oliveira LM, Nogueira DS, Gazzinelli-Guimarães AC, Gonçalves MT, Amorim CC, Oliveira FM, Caliari MV, Rachid MA, Volpato GT, Bueno LL, Geiger SM, Fujiwara RT. 2015. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasites Vectors* 8: 354-363.

Santos FS, Gama ASM, Fernandes BA, Junior JDDR, Guimarães J 2010. Prevalência de enteroparasitismo em crianças de comunidades ribeirinhas do Município de Coari, no médio Solimões, Amazonas, Brasil. *Revista Pan Amazônica de Saúde* 4: 23-28

Scott CA, Faruqui NI, Raschid-Sally L 2004. Wastewater use in irrigated agriculture: Management challenges in developing countries. *CAB International* 1-10.

Seixas MTL, Souza JN, Souza RP, Teixeira MCA, Soares NM 2011. Avaliação da frequência de parasitos intestinais e do estado nutricional em escolares de uma área periurbana de Salvador, Bahia, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 40: 304-314.

Shao CC, Xu MJ, Alasaad S, Song Hui-Qun, Peng L, Tao Jian-Ping, Zhu Xing-Quan 2014. Comparative analysis of microRNA profiles between adult *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *Veterinary Research* 10: 99-110.

Shao ZY, Mao HX, Fu WJ, Ono M, Wang DS, Bonizzoni M, Zhang YP 2004. Genetic structure of Asian populations of *Bombus ignites* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Heredity* 95: 46-52.

Sheffield CS, Hebert PDN, Kevan PG, Packer L 2009. DNA barcoding a regional bee (Hymenoptera: Apoidea) fauna and its potential for ecological studies. *Molecular Ecology Resources* 9: 196-207.

Silva EF, Silva VBC, Freitas CF 2012. Parasitoses Intestinais em crianças residentes na comunidade ribeirinha São Francisco do Laranjal, município de Coari, estado do Amazonas, Brasil. *Revista de Patologia Tropical* 41: 97-101.

Silva JC, Furtado LFV, Ferro TC, Bezerra KC, Borges PE, Melo ACFL 2011. Parasitism due to *Ascaris lumbricoides* and its epidemiological characteristics among children in the state of Maranhão. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44: 100-102.

Silva MTN, Pereira TGR, Bragagnoli G, Barbosa GAAL, Barbosa ARAL 2010. Associação entre escolaridade materna e prevalência e intensidade de infecção por *Ascaris lumbricoides*, em Campina Grande, Paraíba. *Revista Saúde & Ciência* 1: 37-41.

Simpson GG 1971. Princípios de taxonomia animal. Lisboa: Calouste Gubenkian 254 p.

Souza W 2007. In: Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia p. 47-49.

Sprent JFA. 1952. On the migratory behavior of the larvae of various *Ascaris* species in white mice. I. distribution of larvae in tissues. *Journal of Infectious Diseases*, 90: 165-176.

Tavares-Neto J, Silva MTN, Andrade IJ 2003. Asthma and ascariasis in children aged two to ten living in a low income suburb. *Jornal de Pediatria* 79: 227-232.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, Clustal W 1994. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Trang DT, Molback K, Cam PD, Dalsgaard A 2007. Helminth infections among people using wastewater and human excreta in peri-urban agriculture and aquaculture in Hanoi, Vietnam. *Tropical Medicine & International Health* 12: 82-90.

Tshikuka JG, Scott ME, Gray-Donald K 1995. *Ascaris lumbricoides* infection and environmental risk factors in urban African setting. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 89: 505-514.

Vasconcelos IAB, Oliveira JW, Cabral FRF, Coutinho HDM, Menezes IRA 2011. Prevalência de parasitoses intestinais entre crianças de 4-12 anos no Crato, Estado do Ceará: um problema recorrente de saúde pública. *Acta Scientiarum. Health Sciences* 33: 35-41.

Villamizar E, Mendez M, Bonnila E, Varon H, Ontra S 1996. *Ascaris lumbricoides* infestation as a cause of intestinal obstruction in children: Experience with 87 cases. *Journal of Pediatric Surgery* 31: 201-205.

Waugh J 2007. DNA barcoding in animal species: progress, potential and pitfalls. *Bioessays* 29: 188-197.

Widmer A, Schmid-Hempel P 1999. The population genetic structure of a large temperate pollinator species, *Bombus pascuorum* (Scopoli) (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Ecology* 8: 387-398.

Widmer A, Schmid-Hempel P, Estoup A, Scholl A 1998. Population genetic structure and colonisation history of *Bombus terrestris* s.l. (Hymenoptera: Apidae) from the Canary Islands and Madeira. *Heredity* 81: 563-572.

Wiley EO 1981. The theory and practice of phylogenetic systematics. Canadá: John Wiley & Sons. *Phylogenetics* 439 p.

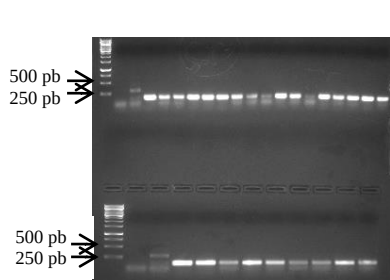
Yamaguti S 1961. *Systhema helminthium: The nematodes of vertebrates*. New York: The Interscience. *Publishers* 679 p.

Yetim I, Ozkan OV, Semerci E, Abanoz R 2009. Rare cause of intestinal obstruction, *Ascaris lumbricoides* infestation: Two case reports. *Cases Journal* 2: 1-4.

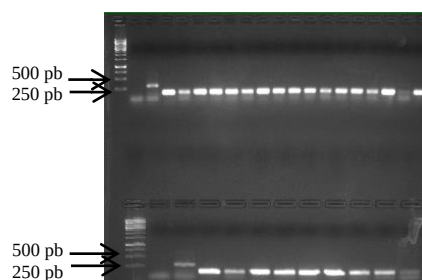
Yorke W, Maplestone PA 1962. Ascaroidea. In: *Nematode parasites of vertebrates*. New York: *Hafner Publishing Company* p. 254-287.

Apêndices

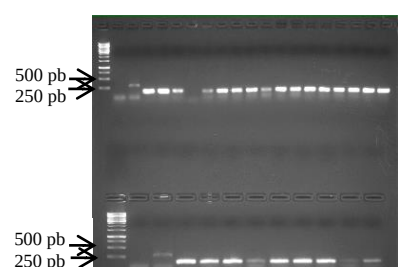
Apêndice 1: Géis de agarose 1%, corados com brometo de etídio, demonstrando o perfil molecular dos parasitos recuperados na infecções experimentais utilizando ovos mistos (ovos embrionados de *A. lumbricoides* e de *A. suum*).



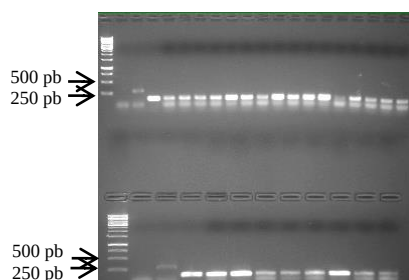
Gel de agarose 1



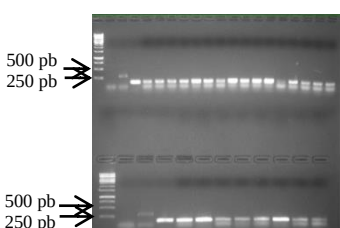
Gel de agarose 2



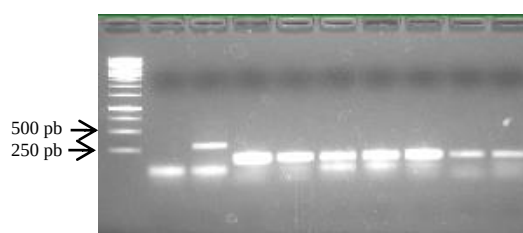
Gel de agarose 3



Gel de agarose 4



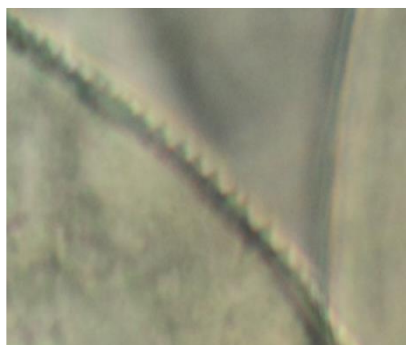
Gel de agarose 5



Gel de agarose 6

Nos géis de agarose: Na primeira amostra da esquerda para direita. Canaleta 1: Peso molecular de 1kb, canaleta 2: Controle negativo, canaleta 3: Controle da espécie *A. lumbricoides*, canaleta 4: Controle da espécie *A. suum*. Nas demais canaletas são referentes aos parasitos recuperados na infecção mista. Nota-se que todas as amostras se enquadram no perfil molecular para a espécie *A. suum*. Válido para as seis amostras do gel de agarose.

Apêndice 2: Microscopia óptica dos dentículos de *Ascaris* sp. recuperados nas infecções experimentais em suínos utilizando ovos mistos (ovos embrionados de *A. lumbricoides* e de *A. suum*).



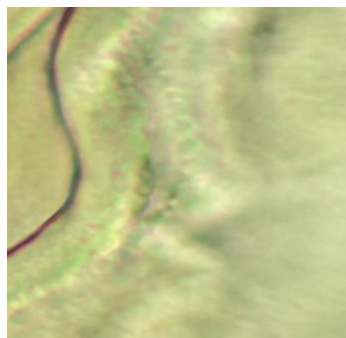
Parasito 1



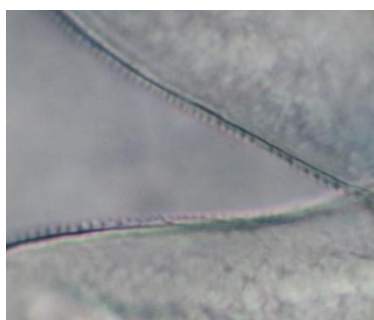
Parasito 2



Parasito 3



Parasito 4



Parasito 5



Parasito 6

Parasitos recuperados na infecção experimental em suínos utilizado ovos mistos (ovos de *A. lumbricoides* e ovos de *A. suum*). Notar que os dentículos apresentam as extremidades triangulares, que é uma característica morfológica da espécie *A. suum*.

Apêndice 3: Planilha confeccionada para os voluntários infectados experimentalmente com ovos embrionados de *A. suum*, para anotação de sinais clínicos após a infecção.

Datas	Dias após Infecção	Sintomas clínicos Paciente “A”
26.09	Tempo 0	
27.09	1° DPI	
28.09	2° DPI	
29.09	3° DPI	
30.09	4° DPI	
01.10	5° DPI	
02.10	6° DPI	
03.10	7° DPI	
04.10	8° DPI	
05.10	9° DPI	
06.10	10° DPI	
07.10	11° DPI	
08.10	12° DPI	
09.10	13° DPI	
10.10	14° DPI	
Observações:		

Obs.: As planilhas foram confeccionadas e entregues aos voluntários com datas referentes até o término do experimento e locais para transcrever os sinais clínicos.

Apêndice 4: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, participantes maiores de 18 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Participantes maiores de 18 anos

Convite para participar

Você, _____ está convidado (a) para participar, voluntariamente no Projeto “Avaliação da infecção humana por *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum* no Brasil: inquéritos parasitológicos, estudos experimentais e caracterização molecular do parasito”

Leia e/ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

INFORMAÇÕES SOBRE O ESTUDO

O projeto em andamento será realizado neste município, onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS Nº 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é avaliar a infecção humana por *Ascaris* sp. pelo exame parasitológico de fezes, identificando morfologicamente e por biologia molecular a espécie do parasito (*Ascaris lumbricoides* ou *Ascaris suum*). Também esperamos verificar outras verminoses. As pessoas que são diagnosticadas por *Ascaris* sp. ou outras verminoses serão tratadas. Além disso em um pequeno número de voluntários adultos (n = 10) será experimentalmente avaliada a suscetibilidade ao *Ascaris suum*.

SUA PARTICIPAÇÃO

Ao concordar da sua participação no estudo você permitirá que:

1. Seja preenchido um questionário confidencial com perguntas relacionadas à situação de sua moradia e as suas características comportamentais e pessoais que estão associadas à transmissão da parasitose em estudo.
2. Seja coletada amostra de fezes para detecção de ovos de *Ascaris* sp. e de outras helmintoses.

3. Seja atendido por um médico especialista, contratado pelo projeto em data e local pré-determinado para avaliação clínica periódica até o estabelecimento da cura.

4. Caso infectado, após o tratamento com anti-helmíntico, sejam recuperados vermes adultos das fezes voluntariamente cedidas.

Se desejar, por livre e espontânea vontade, participar de um estudo complementar (avaliação da suscetibilidade ao *Ascaris suum* – “lombriga de porco”) cuja concordância ou discordância deverá ser manifestada ao final deste documento, você permitirá, desde que os critérios de inclusão sejam satisfatórios (indivíduos saudáveis, maiores de idade legalmente capazes, apresentando exames clínicos e laboratoriais sem alterações) que:

1. Seja atendido e acompanhado por um médico especialista, contratado pelo projeto em data e local pré-determinado para avaliação clínica periódica até o estabelecimento da cura.

2. Realizar a infecção experimental controlada com um número de 50 ovos embrionados de *A. suum*.

3. Seja coletada amostra de fezes para detecção de ovos de *Ascaris* sp.

4. Caso infectado, realizar o tratamento e após o tratamento com anti-helmíntico, sejam recuperados vermes adultos das fezes voluntariamente cedidas.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Os benefícios provenientes da participação consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da Ascaridiose. Todos os exames oferecidos serão gratuitos e a participação não vai gerar custo adicional ao participante. Os participantes que apresentarem ovos de *Ascaris* sp. nas fezes serão tratados gratuitamente com Ivermectina e o mesmo ocorrerá caso ocorrer a infecção por outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

Os riscos para você é mínimo, os efeitos colaterais dos medicamentos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses.

Para aqueles voluntários que participarem também da avaliação da suscetibilidade ao *Ascaris suum* (infecção experimental) manifestações respiratórias ou intestinais discretas poderão ocorrer, mas o acompanhamento médico será disponibilizado até a cura da infecção.

CONFIDENCIALIDADE

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes serão guardadas apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Você também pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você poderá se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal.

Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

Caso desista do estudo isso não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

Não haverá ressarcimento ou compensação aos pacientes em caso de danos, porém medicamentos e exames médicos como também acompanhamento médico serão oferecidos ao paciente gratuitamente.

CONSENTIMENTO:

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder.

Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Quanto à etapa referente ao estudo complementar (avaliação da suscetibilidade ao *Ascaris suum* – “lombriga de porco”) afirmo:

___ Eu, por livre e espontânea vontade, desejo participar também desta etapa.

___ Eu não desejo participar desta etapa.

Nome do Participante: _____

**Impressão
Digital
(opcional)**

Assinatura do Participante: _____

Assinatura do Entrevistador: _____

Data: ____ de _____ de 20____.

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara – Coordenador Geral da Pesquisa

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4, Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG

Tel.: (31) 3409-2871 fujiwara@icb.ufm.g.br

Msc. Fernando Sérgio Barbosa

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4, Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG

Tel.: (31) 3409-2871 fernandosergioba@gmail.com

Dr. Vitor Luis Tenório Mati

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4, Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG

Tel.: (31) 3409-2871 vitormati@yahoo.com.br

O Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG estará disponível para a resolução de questões éticas:

Universidade Federal de Minas Gerais, COEP, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG.
Tel.: (31) 3409-4592.

Apêndice 5: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, participantes de 06 a 17 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pais ou Responsável de Crianças ou Adolescentes (06-17 anos)

Convite para participar

Convidamos o(a) seu/sua filho(a)_____ para participar, voluntariamente no Projeto “Avaliação da infecção humana por *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum* no Brasil: inquéritos parasitológicos, estudos experimentais e caracterização molecular do parasito.”

Leia e/ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

INFORMAÇÕES SOBRE O ESTUDO

O projeto em andamento será realizado neste município, onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS Nº 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é avaliar a infecção humana por *Ascaris* sp. pelo exame parasitológico de fezes, identificando morfologicamente e por biologia molecular a espécie do parasito (*Ascaris lumbricoides* ou *Ascaris suum*). Também esperamos verificar outras verminoses. As pessoas que são diagnosticadas por *Ascaris* sp. ou outras verminoses serão tratadas.

SUA PARTICIPAÇÃO

Ao concordar da sua participação no estudo você permitirá que:

1. Seja preenchido um questionário confidencial com perguntas relacionadas à situação de sua moradia e de suas características comportamentais e pessoais que estão associadas à transmissão da parasitose em estudo.
2. Seja coletada amostra de fezes para detecção de ovos de *Ascaris* e de outras helmintoses.

3. Seja atendido por um médico especialista, contratado pelo projeto em data e local pré-determinado para avaliação clínica periódica até o estabelecimento da cura.

4. Caso infectado, após o tratamento com anti-helmíntico, sejam recuperados vermes adultos das fezes voluntariamente cedidas.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Os benefícios provenientes da participação consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da Ascaridiose. Todos os exames oferecidos serão gratuitos e a participação não vai gerar custo adicional ao participante. Os participantes que apresentarem ovos de *Ascaris* sp. nas fezes serão tratados gratuitamente com Ivermectina e o mesmo ocorrerá caso ocorrer a infecção por outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

Os riscos de sua participação são mínimos, os efeitos colaterais dos medicamentos anti-helmínticos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses.

CONFIDENCIALIDADE

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes serão guardadas apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Você também pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você poderá se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal.

Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

Caso desista do estudo isso não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

Não haverá ressarcimento ou compensação aos pacientes em caso de danos, porém medicamentos e exames médicos como também acompanhamento médico serão oferecidos ao paciente gratuitamente.

CONSENTIMENTO:

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome	do	Participante:
		Impressão Digital (opcional)
Assinatura do Participante: _____		

Assinatura do Entrevistador: _____

Data: __ de _____ de 20__.

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara – Coordenador Geral da Pesquisa
Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4,
Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG
Tel.: (31) 3409-2871 fujiwara@icb.ufm.g.br

Msc. Fernando Sérgio Barbosa
Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4,
Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG
Tel.: (31) 3409-2871 fernandosergioba@gmail.com

Dr. Vitor Luis Tenório Mati
Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4,
Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG
Tel.: (31) 3409-2871 vitormati@yahoo.com.br

O Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG estará disponível para a resolução de questões éticas:

Universidade Federal de Minas Gerais, COEP, Unidade Administrativa II - 2º andar -
Sala 2005, Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG.
Tel.: (31) 3409-4592.

Apêndice 6: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, participantes de 02 a 06 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pais ou Responsável de Crianças (02-06 anos)

Convite para participar

Convidamos o (a) seu/sua filho(a)_____ para participar, voluntariamente no Projeto “Avaliação da infecção humana por *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum* no Brasil: inquéritos parasitológicos, estudos experimentais e caracterização molecular do parasito.”

Leia e/ou ouça atentamente as informações a seguir antes de dar o seu consentimento.

INFORMAÇÕES SOBRE O ESTUDO

O projeto em andamento será realizado neste município, onde será conduzido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A pesquisa será conduzida em cumprimento total das exigências contidas na Resolução CNS Nº 466/12, sobre pesquisa com seres humanos. O objetivo deste estudo é avaliar a infecção humana por *Ascaris* pelo exame parasitológico de fezes, identificando morfologicamente e por biologia molecular a espécie do parasito (*Ascaris lumbricoides* ou *Ascaris suum*). Também esperamos verificar outras verminoses. As pessoas que são diagnosticadas por *Ascaris* sp. ou outras verminoses serão tratadas.

SUA PARTICIPAÇÃO

Ao concordar da sua participação no estudo você permitirá que:

1. Seja preenchido um questionário confidencial com perguntas relacionadas à situação de sua moradia e de suas características comportamentais e pessoais que estão associadas à transmissão da parasitose em estudo.
2. Seja coletada amostra de fezes para detecção de ovos de *Ascaris* e de outras helmintoses.

3. Seja atendido por um médico especialista, contratado pelo projeto em data e local pré-determinado para avaliação clínica periódica até o estabelecimento da cura.

4. Caso infectado, após o tratamento com anti-helmíntico, sejam recuperados vermes adultos das fezes voluntariamente cedidas.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Os benefícios provenientes da participação consistem na geração de novos conhecimentos para embasar as ações de prevenção e controle da Ascaridiose. Todos os exames oferecidos serão gratuitos e a participação não vai gerar custo adicional ao participante. Os participantes que apresentarem *Ascaris* sp. serão tratados gratuitamente com Ivermectina o mesmo ocorrerá caso ocorrer a infecção por outras verminoses. Os participantes também receberão noções de educação sanitária com o objetivo de evitar a transmissão das verminoses.

Os riscos de sua participação são mínimos, os efeitos colaterais dos medicamentos anti-helmínticos são poucos e largamente compensados pelos benefícios do tratamento e da cura das verminoses.

CONFIDENCIALIDADE

Toda informação pessoal obtida nesta pesquisa é considerada confidencial e será mantida como informação sigilosa. As amostras de fezes serão guardadas apenas com um número, sem o nome. Os relatórios e resultados deste estudo serão publicados na forma de textos, tabelas, gráficos e figuras, sem nenhuma forma de identificação individual.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Você também pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias, assim como recorrer a seu médico ou agente de saúde para maiores informações, se assim entender.

A participação é totalmente voluntária e você poderá se recusar a participar do estudo sem qualquer prejuízo pessoal.

Você tem a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração e participação nesta pesquisa no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação.

Caso desista do estudo isso não virá interferir no atendimento e na assistência a ser prestada em caso de necessidade.

Não haverá ressarcimento ou compensação aos pacientes em caso de danos, porém medicamentos e exames médicos como também acompanhamento médico serão oferecidos ao paciente gratuitamente.

CONSENTIMENTO:

Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do consentimento e que uma delas ficará em meu poder. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome	do	Participante:
_____		Impressão Digital (opcional)
Assinatura do Participante: _____		

Assinatura do Entrevistador: _____

Data: __de____de20__.

Para informações adicionais sobre este estudo, você poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis na sua região:

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara – Coordenador Geral da Pesquisa
Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4,
Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG
Tel.: (31) 3409-2871 fujiwara@icb.ufm.g.br

Msc. Fernando Sérgio Barbosa
Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4,
Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG
Tel.: (31) 3409-2871 fernandosergioba@gmail.com

Dr. Vitor Luis Tenório Mati
Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4,
Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte, MG
Tel.: (31) 3409-2871 vitormati@yahoo.com.br

O Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da UFMG estará disponível para a resolução de questões éticas:

Universidade Federal de Minas Gerais, COEP, Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005, Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte - MG. Tel.: (31) 3409-4592.

Anexo

Anexo 1: Depósito de Patente “Composições, processo, uso e kit para identificação e diferenciação molecular de duas espécies do gênero *Ascaris*”

529

 INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL PROTÓTIPO CEM 11/04/2013 014130000675 1E 34 DEMG BR 10 2013 008846 3	< Uso exclusivo do INPI >
Espaço reservado ao protocolo	Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Universidade Federal de Minas Gerais
 1.2 Qualificação: Instit. de Ensino e Pesquisa
 1.3 CNPJ/CPF: 17217985000104
 1.4 Endereço Completo: Av. Antonio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brasil
 1.5 CEP: 31270-901 1.6 Telefone: (31) 3409-4774 1.7 Fax: (31) 3409-6430
 1.8 E-mail: patentes@ctit.ufmg.br

☐ continua em folha anexa**2. Natureza:** ☒ Invenção ☐ Modelo de Utilidade ☐ Certificado de AdiçãoEscreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: **PATENTE DE INVENÇÃO****3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):****COMPOSIÇÕES, PROCESSO, USO E KIT PARA IDENTIFICAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO ASCARIS**☐ continua em folha anexa**4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº _____ Data de Depósito: _____**5. Prioridade:** ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

Pais ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: RICARDO TOSHIO FUJIWARA
 6.2 Qualificação: PROFESSOR 6.3 CPF: 171.267.248-70
 6.4 Endereço completo: RUA DESEMB. PAULA MOTA, 263, APTO. 1404, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG
 6.5 CEP: 31.310-340 6.6 Telefone: 31 3409-4774 6.7 Fax: 31 3409-6430
 6.8 E-Mail: patentes@ctit.ufmg.br

☒ continua em folha anexa



7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

☐ em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax:

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

☒ Listagem de sequências em arquivo eletrônico: 02 nº de CDs ou DVDs (original e cópia).

☒ Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: 01 fl.

☐ Listagem de sequências em formato impresso: fls.

☒ Declaração de acordo com o artigo 130 da Resolução INPI nº 228/09: 01 fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

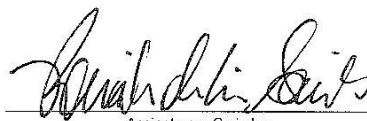
☒	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	☒	11.5 Relatório descritivo	13 fls.
☐	11.2 Procuração	fls.	☒	11.6 Reivindicações	2 fls.
☐	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	☒	11.7 Desenhos	1 fls.
☐	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	☒	11.8 Resumo	1 fls.
☒	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) PORTARIA, ANEXO DE INVENTORES.				2 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 22 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Belo Horizonte, 05/04/2013

Local e Data



Assinatura e Carimbo

Prot. Renato de Lima Santos
Pro-Reitor de Pesquisa / UFMG
Delegação de Competência
Portaria nº 042 / 2010



ANEXO DE INVENTORES**Título: COMPOSIÇÕES, PROCESSO, USO E KIT PARA IDENTIFICAÇÃO E
DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE DUAS ESPÉCIES DO GÊNERO ASCARIS****Página 1**

Nome: TIAGO ANTONIO DE OLIVEIRA MENDES**Qualificação:** PESQUISADOR**CPF:** 079.540.906-04**Endereço Completo:** RUA OMEGA, 212, JARDIM AMERICA, BELO HORIZONTE, MG**CEP:** 30.421-375**Telefone:** 31 3409-4774**FAX:** 31 3409-6430**E-mail:** patentes@ctit.ufmg.br

Nome: FERNANDO SÉRGIO BARBOSA**Qualificação:** PESQUISADOR**CPF:** 056.643.346-06**Endereço Completo:** RUA PÉRSIO BABO DE REZENDE, 316, APTO. 101, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG**CEP:** 31.310-580**Telefone:** 31 3409-4774**FAX:** 31 3409-6430**E-mail:** patentes@ctit.ufmg.br

Nome: PEDRO HENRIQUE GAZZINELLI-GUIMARÃES**Qualificação:** PESQUISADOR**CPF:** 063.048.946-78**Endereço Completo:** RUA CASTRO MAIA, 76, APTO. 303, BAIRRO SANTA LÚCIA, BELO HORIZONTE, MG**CEP:** 30360-220**Telefone:** 31 3409-4774**FAX:** 31 3409-6430**E-mail:** patentes@ctit.ufmg.br

Nome: DANIELLA CASTANHEIRA BARTHOLOMEU**Qualificação:** PROFESSORA**CPF:** 716.754.266-00**Endereço Completo:** RUA DESEMBARGADOR PEDRO LICINIO, 365, APTO. 202, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG**CEP:** 31310-650**Telefone:** 31 3409-4774**FAX:** 31 3409-6430**E-mail:** patentes@ctit.ufmg.br

Nome: LILIAN LACERDA BUENO**Qualificação:** PESQUISADORA**CPF:** 040.008.586-02**Endereço Completo:** RUA DESEMB. PAULA MOTA, 263, APTO. 1404, BAIRRO OURO PRETO, BELO HORIZONTE, MG**CEP:** 31.310-340**Telefone:** 31 3409-4774**FAX:** 31 3409-6430**E-mail:** patentes@ctit.ufmg.br**FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA - UFMG**