



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
BIOMEDICINA**

MARÍLLIA RAPHAELLA CABRAL FONSECA DE LIMA

**ASCARIS LUMBRICOIDES: IMPORTÂNCIA DA GENÔMICA,
DO DNA ANCESTRAL E DO COMBATE À ASCARIDÍASE**

Recife
2023

MARÍLLIA RAPHAELLA CABRAL FONSECA DE LIMA

**ASCARIS LUMBRICOIDES: IMPORTÂNCIA DA GENÔMICA,
DO DNA ANCESTRAL E DO COMBATE À ASCARIDÍASE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Wheverton Ricardo Correia do Nascimento

Recife
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Lima, Maríllia Raphaella Cabral Fonseca de.

Ascaris lumbricoides: importância da genômica, do DNA ancestral e do combate à ascaridíase / Maríllia Raphaella Cabral Fonseca de Lima. - Recife, 2023.

83 p. : il., tab.

Orientador(a): Wheverton Ricardo Correia do Nascimento

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2023.

1. *Ascaris lumbricoides*. 2. DNA antigo. 3. Genética. 4. Paleoparasitologia. 5. Parasitologia. I. Nascimento, Wheverton Ricardo Correia do. (Orientação). II. Título.

570 CDD (22.ed.)

MARÍLLIA RAPHAELLA CABRAL FONSECA DE LIMA

ASCARIS LUMBRICOIDES: IMPORTÂNCIA DA GENÔMICA, DO DNA ANCESTRAL E DO COMBATE À ASCARIDÍASE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco/Área Acadêmica de Medicina Tropical - CCM

Prof^ª. Dr^ª. Vláudia Maria Assis Costa
Universidade Federal de Pernambuco/ Área Acadêmica de Medicina Tropical - CCM

Prof. Msc. Jôuldes Matos Duarte
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Arqueologia - CFCH

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família que sempre me incentivou e me apoiou nos estudos, permitindo que eu alcançasse meus objetivos. Dedico, também, a Kauã que tantas vezes foi o meu ponto de equilíbrio durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Wheverton Ricardo pela paciência e cuidado comigo, além do conhecimento repassado, que foram a base para a construção deste trabalho.

As minhas professoras de graduação Renata Campina, Dijanah, Rosângela Frade e Danielly Brunaska por me inspirarem a me apaixonar cada vez mais pela biomedicina.

Aos meus amigos e mentores do LAIA: Georon Ferreira, Leonardo Oliveira, Bárbara Barros, Guilherme Silva e Cristiane Moutinho que me inspiraram e foram essenciais para o meu crescimento profissional dentro do laboratório e na área de pesquisa.

Ao meu grupo de amigos Brenda, Micaela, Maria Isabel, Alexandre, Amanda e Vitor que estiveram ao meu lado e me ofereceram tantos sorrisos e abraços, me ajudando a chegar ao final dessa montanha russa que é o ensino público superior.

Aos meus amigos mais recentes da graduação, Manoela, Amanda Moreira e João Lucas, que tornaram mais leve a volta para a faculdade após a pandemia.

A minha mãe, Paula, pelo incentivo e apoio nos estudos, e aos meus irmãos Thallita e Itallo, por estarem sempre comigo independente de qualquer coisa.

Ao restante da minha família pela ajuda financeira e por acreditarem no meu potencial, me motivando a estudar desde cedo.

A minha cadelinha Ravena por, mesmo sem saber, me ajudar tantas vezes a superar os momentos desafiadores da graduação.

“São tantas covardia que eu nem me
surpreendi
Se pra nossas doenças sempre disseram e
daí?
E quando acabar essa canetada
A bala vai comer, alguém aqui vai sorrir,
alguém aqui vai chorar
E gritar favela vive
Ou eu não consigo respirar”

(Favela Vive 4 - ADL part. MC
Cabelinho, Edi Rock, Kmila CDD,
Orochi e Cesar MC)

Lima, Marília. **Ascaris lumbricoides: importância da genômica, do DNA ancestral e do combate à ascaridíase**. 2023. 82. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

O *Ascaris lumbricoides* é um helminto cilíndrico pertencente ao clado III dos nematóides e é o geohelminto mais prevalente em humanos. Ele é o agente etiológico da ascaridíase, doença tropical negligenciada com altas taxas de infecção e morbidade em todo o mundo. Este parasita infecta primariamente a porção inicial do intestino delgado e pode afetar outros órgãos, como pulmão e fígado, devido a sua migração larval. Os locais mais acometidos por essa doença são os países tropicais e os países em desenvolvimento, devido ao clima quente e úmido, e às condições precárias de saneamento básico. Em razão da urgência do combate à ascaridíase, houve um aumento expressivo no número de estudos sobre o genoma do *A. lumbricoides*. Esses estudos se beneficiaram das pesquisas paleoparasitológicas a respeito do seu DNA ancestral (aDNA), pois ele proporcionou uma construção mais fidedigna da árvore filogenética do *Ascaris*. A paleoparasitologia é um subcampo da paleopatologia que estuda parasitos em latrinas, fossas, corpos mumificados, esqueletos e coprólitos. O foco dessa ciência é oferecer informações sobre a evolução biogeográfica dos parasitos e analisar as relações parasito-hospedeiro das populações ancestrais e atuais. Essa análise é realizada por meio do aDNA presente nas amostras coletadas, permitindo a identificação dos parasitos quando outros métodos falham. Porém, estudos que associam diretamente a genômica e o aDNA desse helminto à prevenção e tratamento da ascaridíase ainda são escassos. Nesse contexto, essa revisão de literatura objetivou analisar os principais estudos genômicos do *Ascaris* buscando associar os conhecimentos a respeito do aDNA com o avanço nas informações sobre a evolução do *A. lumbricoides*. Além disso, foi apresentado como esse conhecimento genômico auxiliou na elucidação acerca dos sinais e sintomas do hospedeiro e como pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas e de novos métodos diagnósticos. Isso foi realizado por meio da análise de artigos científicos, trabalhos de conclusão de curso, de mestrado e de doutorado presentes nos bancos de dados online, escritos em português, espanhol ou inglês entre os anos de 2018 e 2023. Desse modo, observou-se que o entendimento do genoma da família do *Ascaris* continua em processo de aperfeiçoamento, bem como as ferramentas utilizadas para combater a ascaridíase.

Palavras-chave: *Ascaris lumbricoides*; Genômica; aDNA; Paleopatologia; Paleoparasitologia

Lima, Marília. **Ascaris lumbricoides: importance of genomics, ancestral dna and combat ascariasis**. 2023. 82. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

Ascaris lumbricoides is a cylindrical helminth that belongs to clade III of nematodes and is the most prevalent soil-transmitted helminth in humans. It is the ascariasis etiologic agent, a neglected tropical disease with high rates of infection and morbidity worldwide. This parasite mainly infects the small intestine initial portion and may affect other organs such as lungs and liver due its larval migration. Tropical, developing and underdeveloped countries are the most affected places due to hot and humid climate and basic sanitation precarious conditions. Due to urgency in combating ascariasis, there has been a significant increase in studies of *A. lumbricoides* genome. They benefited from paleoparasitological research on its ancient DNA (aDNA) as it provided a more reliable construction of the *Ascaris* phylogenetic tree. Paleoparasitology is a subfield of pathology and studies parasites in latrines, pits, mummified bodies, skeletons and coprolites. This science focus is to provide parasites information regarding its biogeographical evolution and to analyze parasite-host relationships of ancestral and current populations. This analysis is performed using the aDNA of collected samples, allowing parasites identification when other methods were inefficient. However, studies that directly associate *Ascaris* genomics and its aDNA with ascariasis prevention and treatment are still scarce. Thereby, this literature review aimed to analyze *Ascaris* main genomic studies, seeking to associate aDNA knowledge with this helminth evolution information. In addition, it aims to show how this genomic knowledge helped to explain host signs and symptoms and how it can contribute to vaccine development and new diagnostic methods. This was done through scientific analysis of scientific papers, final papers, master's and doctoral works present in online databases, written in Portuguese, Spanish or English between the years 2018 and 2023. Thus, it was found that knowledge about *Ascaris* genome continues in the improvement process, as well as the tools used to combat ascariasis.

Key words: *Ascaris lumbricoides*; Genomics; aDNA; Paleopathology; Paleoparasitology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Exemplos macho e fêmea de <i>A. lumbricoides</i>	17
Figura 02 – Prevalência mundial da ascaridíase em 2010	20
Figura 03 – Prevalência mundial da ascaridíase em 2020	20
Figura 04 – Mapa mundial mostrando a coinfeção de <i>A. lumbricoides</i> /HIV	21
Figura 05 – Ciclo de vida de <i>A. lumbricoides</i> e <i>T. trichiura</i>	22
Figura 06 – Visão geral da resposta imunológica ao <i>Ascaris</i>	24
Figura 07 – Resposta imunológica ao <i>Ascaris</i> em modelos animais	26
Figura 08 – Eliminação Programada do DNA	33
Figura 09 – Eliminação programada do DNA na embriogênese	34
Figura 10 – Formas e funções das classes de pequenos RNAs em nematóides	36
Figura 11 – Áreas de implementação de métodos de aDNA na paleobiologia	40
Figura 12 – Avanços nas técnicas de aDNA desde 2010	43
Figura 13 – Relações filogenéticas da superfamília <i>Ascaridoidea</i> 2018	59
Figura 14 – Relações filogenéticas da superfamília <i>Ascaridoidea</i> em 2022	60
Figura 15 – Delineamento experimental do protocolo de imunização com ASCVac-1 e ASCVac-2	70
Figura 16 – Resumo do fluxo de trabalho da abordagem usada para projetar e analisar o polipeptídeo multi-epítipo	71
Figura 17 – Via metabólica presumível do 2-MPC	75
Figura 18A e 18B – Microscópio de lente invertida e amostra de fezes analisada	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Prevalência global da ascaridíase	18
Tabela 02 – Comparação dos métodos diagnósticos do <i>Ascaris lumbricoides</i>	27
Tabela 03 – Métodos de sequenciamento para estudos genômicos e as suas aplicações	31
Tabela 04 – Artigos selecionados sobre paleoparasitologia e paleogenética	46
Tabela 05 – Artigos selecionados sobre <i>ancient</i> DNA	47
Tabela 06 – Artigos selecionados sobre genômica e o processo de evolução do <i>Ascaris</i>	48
Tabela 07 – Artigos selecionados sobre o genoma do <i>Ascaris</i>	49
Tabela 08 – Artigos selecionados sobre epidemiologia, clínica, diagnóstico e tratamento da ascaridíase	51
Tabela 09 – Artigos selecionados sobre a resposta imunológica do <i>Ascaris</i> e o desenvolvimento vacinal contra a ascaridíase	53
Tabela 10 – Artigos selecionados sobre o transcriptoma do <i>Ascaris</i>	55
Tabela 11 – Alérgenos e suas funções imunológicas	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-MPC	2-Methyl-pentanol-carnitina
aDNA	DNA Antigo (<i>Ancient DNA</i>)
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>)
BAL	Lavado Broncoalveolar (<i>Bronchoalveolar Lavage</i>)
BDTD	Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
circRNA	RNA Circular (<i>Circular RNA</i>)
COX	Ciclooxigenase
DSBs	Quebra de Dupla Fita (<i>Double Standard Breaks</i>)
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EVs	Vesículas Extracelulares (<i>Extracellular Vesicles</i>)
ex-RNA	RNAs Extra Celulares
GWAS	Estudos de Associação Genômica Ampla (<i>Genome Wide Association Studies</i>)
H3S10P	<i>Anti-phospho-histone H3</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IG	Imunoglobulina
IgSF	Superfamília de Imunoglobulinas
IL	Interleucina
IL21R	Receptor de Interleucina 21 (<i>Interleukin 21 Receptor</i>)
ITS	<i>Ribosomal Internal Transcribed Spacer</i>
miRNA	Micro RNA
MPLA	Monofosforil Lipídio A
mtDNA	DNA mitocondrial
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDE	<i>Programmed DNA Elimination</i>
piRNA	RNA Associado a PIWI (<i>Piwi-Interacting RNA</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
QP	Quimioterapia Preventiva

qPCR	PCR em tempo real
RELM- β	Molécula do tipo Resistina β (<i>Resistin-like molecule β</i>)
RNA-seq	RNA Sequencing
scRNA-seq	Sequenciamento de RNA de Células Únicas (<i>single-cell RNA sequencing</i>)
siRNA	Pequeno RNA de Interferência (<i>Small Interfering RNA</i>)
SNPs	Polimorfismos de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SNV	Variantes de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Variant</i>)
sRNA	Pequeno RNA (<i>Small RNA</i>)
Th2	<i>T-Helper 2</i>
TREG	Célula T Regulatória (<i>Regulatory T cell</i>)
WASH	<i>Water, Sanitation and Hygiene</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Ascaridíase.....	16
2.1.1 Ascaris.....	16
2.1.2 Epidemiologia.....	17
2.1.3 Patogênese.....	21
2.1.4 Manifestações Clínicas.....	22
2.1.5 Resposta Imunológica.....	23
2.1.6 Diagnóstico.....	25
2.1.7 Tratamento.....	28
2.2 Genômica do Ascaris.....	29
2.2.1 Desenvolvimento do Estudo Genômico.....	29
2.2.2 Eliminação Programada do DNA.....	31
2.2.3 Small RNAs e Transcriptoma.....	35
2.3 Paleoparasitologia.....	38
2.3.1 Ancient DNA.....	40
3 OBJETIVOS.....	44
3.1 Objetivo Geral.....	44
3.2 Objetivos Específicos.....	44
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 Tipo de Estudo.....	45
4.2 Critérios de inclusão e exclusão.....	45
4.3 Local de estudo.....	45
5 RESULTADOS.....	46
6 DISCUSSÃO.....	57
5.1 Processo evolutivo do <i>A. lumbricoides</i>	57
5.2 Resposta imunológica do hospedeiro.....	62
5.3 Desenvolvimento de vacinas.....	65
5.3.1 Construção de Proteínas Quiméricas.....	66
5.3.2 Construção de Proteínas Multi-epítomos.....	68
5.4 Novos métodos diagnósticos.....	72
7 CONCLUSÃO.....	77
REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

O *Ascaris* é um parasito do intestino delgado pertencente ao gênero de nematoides cilíndricos que se encontra no III clado do filo nematoda. Ele é o agente etiológico da ascaridíase e é o helminto transmitido pelo solo (geohelminto) mais prevalente quando se trata de infecção em humanos (WANG, DAVIS, 2020). A ascaridíase é uma das doenças tropicais negligenciadas (DTN) mais comuns, afetando mais de 12% da população mundial e sendo responsável por cerca de 60 mil mortes anuais (HOLLAND *et al.*, 2022; DE LIMA CORVINO, HORRALL S, 2023).

A Ascaridíase é mais prevalente nos países em desenvolvimento, pois não há saneamento básico suficiente, e em países tropicais e subtropicais, nos quais a temperatura e a umidade favorecem a maturação dos ovos desse helminto. Particularmente, o *Ascaris* é endêmico nas Américas do Sul e Central, no continente africano e na maior parte do continente asiático. Fora das áreas endêmicas, o maior número de infecções é observado em países com altas taxas de migração e viagens turísticas (HAILU *et al.*, 2022; DE LIMA CORVINO, HORRALL S, 2023; ELSE *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021).

A infecção causada pelo *A. lumbricoides* acontece quando há ingestão de ovos embrionados presentes no solo, nos alimentos ou na água ingerida, e a sua ocorrência é mais frequente em crianças do que em adultos. Seus principais sintomas são tosse, cefaleia, diarreia e desconforto respiratório, além de desnutrição e anorexia nos casos mais graves, que ocorrem devido a anormalidades na mucosa da porção inicial do intestino delgado. Por afetar a nutrição, a ascaridíase pode prejudicar o desenvolvimento cognitivo infantil, além de estar associada à morbidade crônica. (HOLLAND *et al.*, 2022; ELSE *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2021).

Para auxiliar no combate à ascaridíase, tem-se utilizado a paleoparasitologia, definida como o estudo dos parasitos por meio de materiais paleontológicos e arqueológicos como latrinas, fossas, corpos mumificados, esqueletos e coprólitos (CÔTÉ *et al.*, 2018; OH *et al.*, 2023). Essa ciência é um subcampo da paleopatologia e o seu foco é pesquisar a evolução biogeográfica dos parasitas e as relações hospedeiro-parasito, além de revelar informações sobre o estilo de vida da população ancestral e as condições médicas associadas. Porém, no início dessa ciência, existiam algumas limitações: a maioria das amostras não era advinda de um só organismo, muitas vezes havendo mistura de amostras animais e humanas. Esse problema foi solucionado com o avanço da biologia molecular, principalmente pelo

estudo do ancient DNA (aDNA) e da sua aplicação na paleoparasitologia (CÔTÉ *et al.*, 2018). O sequenciamento do aDNA presente nessas amostras auxilia na obtenção de informações sobre o genoma, a patogênese, o diagnóstico e a prevenção da ascaridíase (SØE *et al.*, 2018). Além disso, o aDNA é útil na confirmação da presença de *Ascaris* nas amostras arqueológicas em que os ovos não são detectados, e permite a diferenciação da espécie de *Ascaris* encontrada naquela amostra (GUEDES *et al.*, 2020; SØE *et al.*, 2018).

Com o avanço do estudo genômico do *Ascaris*, descobriu-se que esse verme apresenta dois genomas, um germinativo intacto e um somático menor, com cerca de 15 a 19 mil genes. Isso forneceu informações sobre os processos de transcrição, tradução e replicação do DNA, exibindo e elucidando algumas etapas raras em outros organismos procariontes. Ademais, foram obtidos dados que indicam novos prováveis alvos de drogas e de controle de helmintos. Os principais processos de regulação genética que permitiram essas descobertas são os rearranjos cromossomais, a ausência de piRNAs (RNA Associado a PIWI – uma classe de pequenos RNAs que silencia e regula seus alvos) e a deleção programada do DNA, responsável pela criação do genoma somático (WANG, 2021a; ESTREM, WANG, 2023; ZHOU *et al.*, 2020a; ZAGOSKIN *et al.*, 2020).

A evolução nesses estudos permitiu pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos, já que os principais métodos atuais para *Ascaris lumbricoides* são baseados na identificação de ovos presentes nas fezes do indivíduo infectado e apresentam muitas limitações. A maioria das pesquisas tem seu foco em novos métodos imunodiagnósticos, principalmente com base no estudo dos alérgenos do *Ascaris*. (DE ALMEIDA LOPES, 2018; LAGATIE *et al.*, 2020b). Mas outros métodos também têm sido estudados, como a pesquisa de metabólitos do *A. lumbricoides* presentes na urina e análise de imagens microscópicas baseadas em smartphones (LAGATIE *et al.*, 2020a; SWITZ, D'AMBROSIO, FLETCHER, 2014).

O conhecimento sobre esse helminto permitiu, ainda, novas pesquisas em busca de uma formulação vacinal contra a ascaridíase que seja efetiva e segura. Esses estudos utilizaram metodologias *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, demonstrando a possibilidade da elaboração dessa vacina pelo uso de diferentes métodos, com maior vantagem se utilizados em conjunto (EVANGELISTA *et al.*, 2023; GUIMARÃES, 2021; ROCHA, 2022; ZAWAWI, ELSE, 2020).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura relacionando os estudos paleoparasitológicos e genômicos do *Ascaris* a sua evolução, seu processo infeccioso, seu diagnóstico e sua prevenção. Isso é relevante, pois, apesar da queda no número de casos e redução na gravidade das infecções, a ascaridíase ainda é uma doença negligenciada com alta morbidade, que necessita de mais estudos visando contribuir para sua erradicação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASCARIDÍASE

2.1.1 Ascaris

O *A. lumbricoides* é um helminto que faz parte do filo Nematoda, classe *Chromadorea*, ordem *Rhabditida*, Infra Ordem *Ascaridomorpha*, família *Ascarididae* e gênero *Ascaris* (HAN *et al.*, 2022; ROCHA, 2022). Ele é o agente etiológico da ascaridíase, doença tropical negligenciada que é a geohelminíase mais prevalente no mundo (MOHD-SHAHARUDDIN *et al.*, 2021). Estima-se que o número de pessoas infectadas por *A. lumbricoides* no mundo é de 807 milhões a 1,2 bilhões. (MOHD-SHAHARUDDIN *et al.*, 2021; CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2010). As duas principais espécies do *Ascaris* são *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum*, agentes etiológicos da ascaridíase em humanos e em porcos, respectivamente, embora existam relatos de coinfeção em humanos (SILVA *et al.*, 2021). Ambas as espécies apresentam dimorfismo sexual e tem como local de parasitismo a porção inicial do intestino delgado, o duodeno (ELSE *et al.*, 2020; WANG, DAVIS, 2020; WANG, 2021a).

A fêmea e o macho adultos têm, em média, respectivamente, 25cm e 16cm de comprimento, podendo ser de coloração branca, rosa ou amarela. A fêmea é mais espessa e apresenta extremidade posterior reta, enquanto o macho é mais delgado, com a extremidade posterior em forma de gancho e possui duas espículas retráteis, como observado na **Figura 01** (WANG, DAVIS, 2020). O *A. lumbricoides* vive de 1 a 2 anos no intestino delgado do hospedeiro, onde se reproduz,

produzindo ovos não embrionados que serão eliminados nas fezes. Após seu período de vida, os vermes adultos também são eliminados nas fezes e, além disso, eles não se multiplicam nos hospedeiros humanos. Desse modo, se não houver re-infecção, o quadro pode evoluir para cura espontânea (DE LIMA CORVINO, HORRALL, 2023). No entanto, em áreas endêmicas, a re-infecção é muito comum mesmo após a utilização de anti-helmínticos de amplo espectro. (MOHD-SHAHARUDDIN *et al.*, 2021).

Figura 01: exemplares macho e fêmea de *A. lumbricoides*



Fonte: SINHYU. Ascariasis is a disease caused by the parasitic roundworm Ascaris. Disponível em: <<https://www.istockphoto.com/br/foto/ascariid%C3%ADase-%C3%A9-uma-doen%C3%A7a-causada-pela-ascariid%C3%ADase-lombriga-parasit%C3%A1rias-para-educa%C3%A7%C3%A3o-gm898715464-247994995>>. Acesso em: 3 out. 2023.

2.1.2 Epidemiologia

A ascaridíase é uma doença com alta morbidade, principalmente em crianças com sintomatologia moderada e severa. Conforme os dados de 2020 da Organização Mundial da Saúde (OMS), o maior número de mortes devido à ascaridíase, no Brasil, acontece na faixa etária de 0 a 4 anos. (Ascariasis. Disponível em: <https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/indicator-groups/indi>

[cators/indicator-details/MDB/ascariasis](#). Acesso em: 20 de agosto de 2023). A prevalência da infecção e a intensidade da infecção são as duas principais medidas epidemiológicas utilizadas para determinar a extensão da ascaridíase (HOLLAND *et al.*, 2022). A primeira é representada pela porcentagem de pessoas infectadas em uma determinada população. Já a segunda pode ser calculada pela média aritmética do número de vermes por ovos em gramas de fezes. Isso é importante, pois ajuda a compreender o impacto de macroparasitas sobre seres humanos e outros animais, embora atualmente a determinação da intensidade da infecção seja pouco relatada (HOLLAND *et al.*, 2022).

Segundo a meta-análise realizada por Holland em 2022, o número global estimado de pessoas infectadas por *Ascaris lumbricoides* foi de 731.805.853. Na América do Sul, o número estimado foi de 49.882.008, sendo 57,82% dos casos provenientes do Brasil. A prevalência agrupada global foi de 11,07%, sendo observada heterogeneidade significativa entre os estudos analisados. Mais detalhes estão presentes na **Tabela 01**.

Tabela 01: Prevalência global da ascaridíase

Local	Prevalência da Ascaridíase % (IC95%*)
América Latina e Caribe ¹	12,75% (10,75–14,88%)
América Central	18,83% (13,04–25,42%)
África Subsaariana ²	11,66% (10,56–12,81%)
África Central	15,31% (11,39–19,69%)
África do Norte	4,01% (0,85– 9,20%)
Ásia Oriental ³	1,39% (1,07–1,74%)
Ásia Ocidental ⁴	1,71% (1,14–2,38%)
Ásia do Sul ⁵	19,06% (15,51–22,87%)
Ásia Central e do Norte	12,91% (10,01–16,13%)
Oceania ⁶	28,77% (7,07–57,66%)

Tabela adaptada de Holland (2022)

*IC95% - Intervalo de confiança de 95%

¹Brasil, Colômbia, Equador, Honduras e Nicarágua

²Angola, Burundi, República Centro-Africana, Chade, República do Congo e Madagascar

³China e República da Coreia

⁴Iraque, Irã, Palestina, Turquia e Emirados Árabes Unidos

⁵Indonésia, Laos, Malásia, Mianmar, Filipinas, Sri Lanka e Vietnã

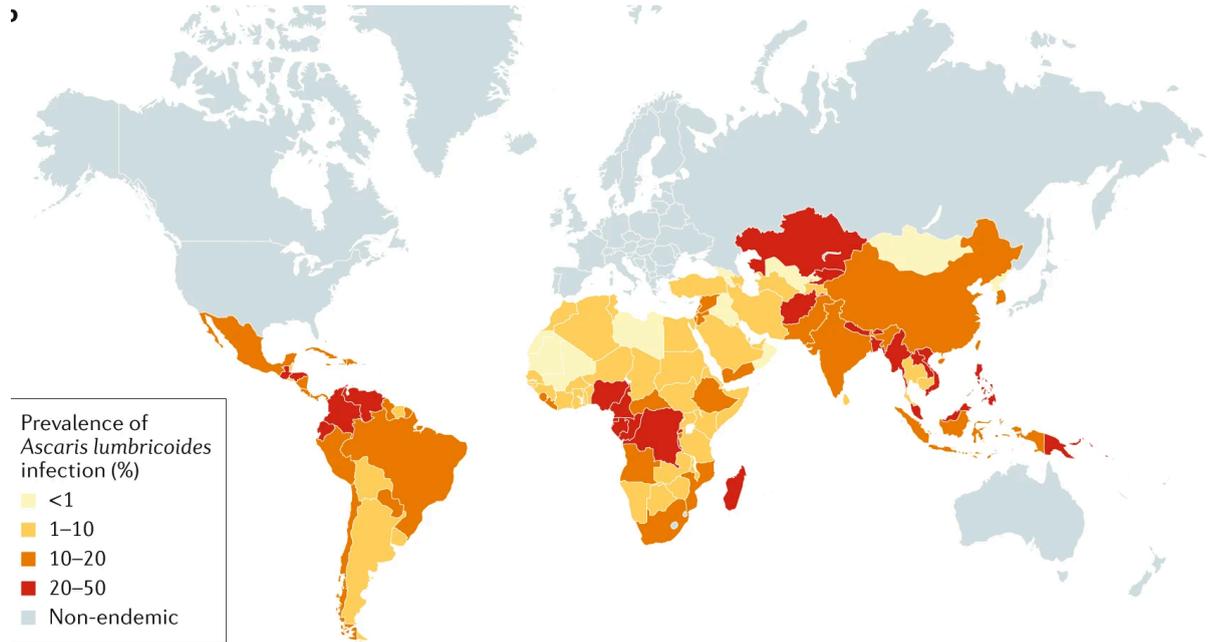
⁶Papua-Nova Guiné e Ilhas Salomão

Por ser uma doença infecciosa associada às más condições socioeconômicas, a ascaridíase está relacionada à falta de saneamento básico adequado, pois sua principal forma de transmissão é a fecal-oral (ELSE *et al.*, 2020). Foi observado, segundo a OMS, que a prevalência de *Ascaris* caiu devido aos esforços para controlar essa infecção, como observado na comparação entre as **Figuras 02 e 03**. Sabe-se, ainda, que a maior intensidade da infecção foi observada em países da América Latina e Caribe, seguido pelos países da Ásia Oriental e da Ásia do Sul.

Já a meta-análise mais recente realizada por Akanksha *et al.* (2023), mostra que a prevalência de *A. lumbricoides* foi de 6% na América Latina e Caribe, de 11% na Ásia e de 8% na África Subsaariana. Além disso, 48 das 61 amostras analisadas mostraram prevalência da coinfeção entre HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana, do inglês *Human Immunodeficiency Virus*) e *A. lumbricoides*.

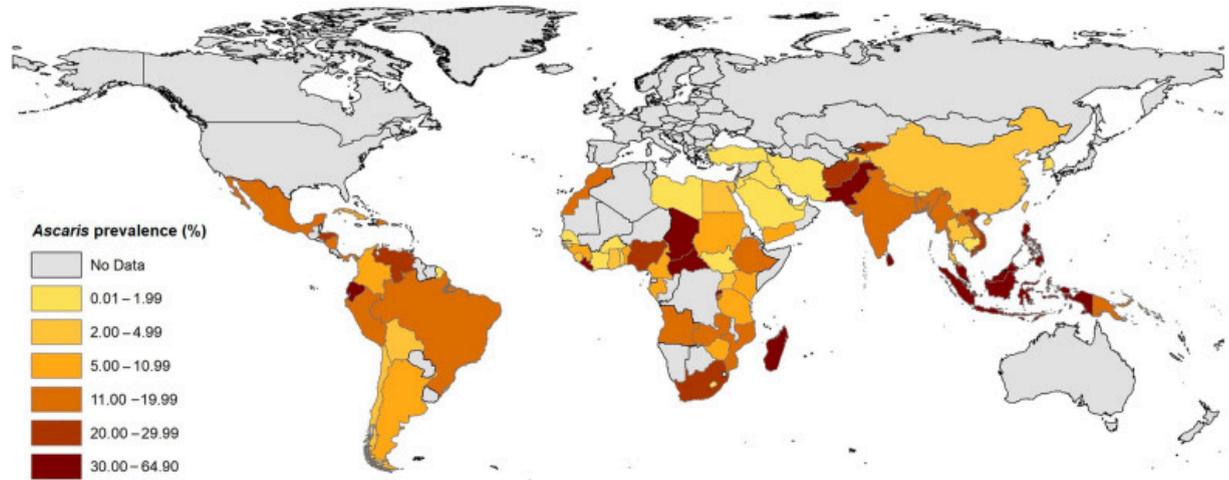
Ntonifor, Tamufor, Abongwaé (2022), em sua pesquisa realizada em Camarões, também encontraram uma prevalência maior de ascaridíase em pessoas HIV positivas do que em pessoas HIV negativas, possivelmente devido à queda na imunidade causada pela AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês *Acquired immunodeficiency syndrome*). Porém, a hipótese principal de Akanksha *et al.* (2023) é de que a ascaridíase seja mais comum em pacientes com HIV devido à localidade em que vivem e não devido à imunodeficiência causada pelo HIV, como pode ser analisado pela comparação entre as **Figuras 03 e 04**.

Figura 02: Prevalência mundial da ascaridíase em 2010



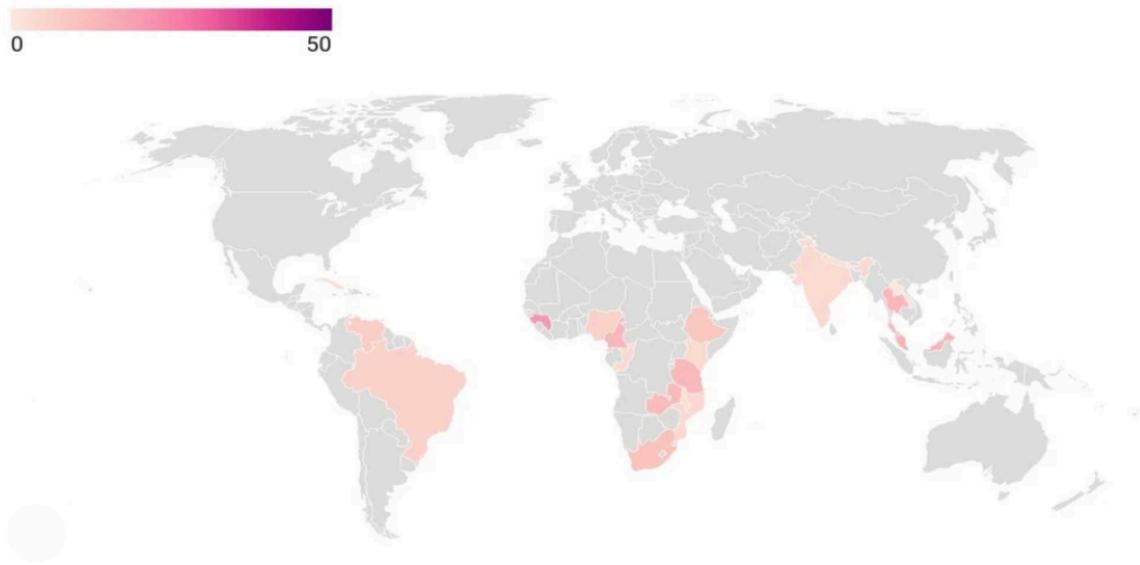
Fonte: ELSE *et al* (2020)

Figura 03: Prevalência mundial da ascaridíase em 2020



Fonte: HOLLAND *et al* (2022)

Figura 04: Mapa mundial mostrando a coinfeção de *A. lumbricoides*/HIV



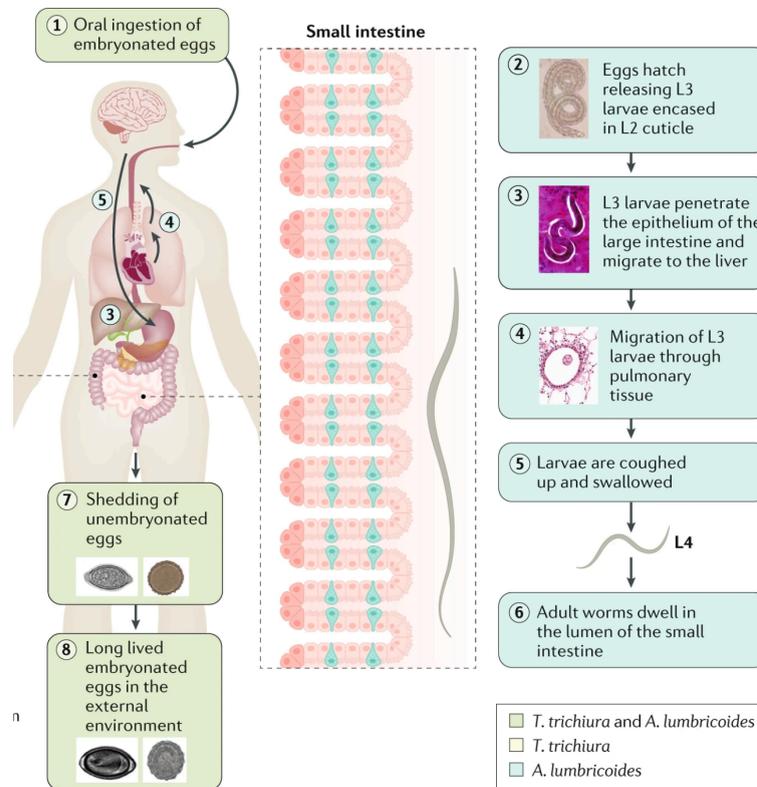
Fonte: AKANKSHA *et al* (2023)

2.1.3 Patogênese

A infecção por *Ascaris* acontece pela via fecal-oral por meio da ingestão de ovos embrionados a partir de alimentos, água ou outras fontes contaminadas (CONTERNO *et al.*, 2020). Alguns estudos afirmam que, após a ingestão, o ovo eclode no intestino delgado e libera a larva L2 envolta na bainha da primeira muda, e essa larva irá penetrar a mucosa intestinal do ceco e do cólon proximal. Porém, estudos mais recentes mostraram que as duas ecdises larvais acontecem antes da eclosão do ovo no intestino grosso, fazendo com que a larva liberada, no estágio larval L3, esteja envolta por duas bainhas, conferindo ao parasita maior resistência. Assim, a L3 irá penetrar a mucosa do intestino grosso e será transportada pela circulação portal até o fígado, onde há eliminação da bainha de L2, havendo discreto crescimento larval. Posteriormente, as larvas L3 são transportadas pela corrente sanguínea do fígado para os pulmões, onde penetram os espaços intra-alveolares, onde ela cresce novamente. Em seguida, se dirige à faringe, provocando tosse e consequente deglutição dessas larvas. Elas retornam ao intestino delgado, amadurecendo para o estágio larval L4 e depois para L5, já no intestino, onde se desenvolvem em vermes adultos e sexualmente maduros após cerca de 20 dias. O esquema de migração e maturação do *Ascaris* está apresentado na **Figura 05**

(ELSE *et al.*, 2020; DE LIMA CORVINO, HORRALL, 2023; DESLYPER, 2020).

Figura 05: Ciclo de vida de *A. lumbricoides*



Fonte: ELSE *et al* (2020)

2.1.4 Manifestações Clínicas

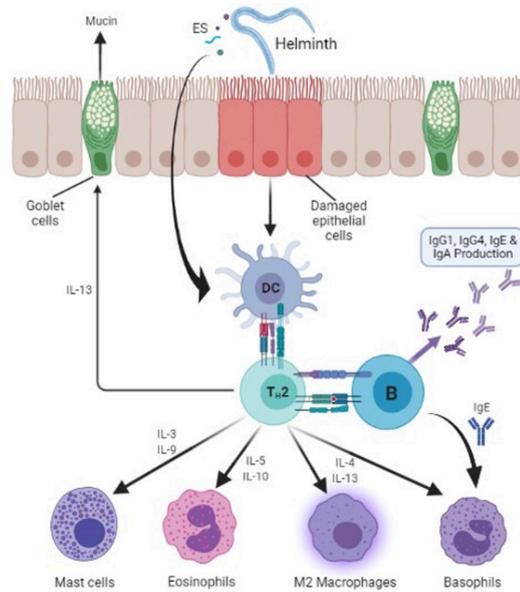
A ascaridíase é uma infecção que não contribui muito para a mortalidade, mas sim para a morbidade crônica, embora ela seja difícil de mensurar em razão da inespecificidade da clínica do paciente. Embora a maioria das infecções por *A. lumbricoides* seja assintomática, devido à baixa carga parasitária e/ou boa imunidade do hospedeiro, ela pode causar tanto sintomatologia crônica como aguda, sendo a primeira mais comum e geralmente menos severa. Os seus sintomas mais frequentes são: vômito, diarreia e dores abdominais, em consequência da presença desse helminto no intestino, e tosse persistente com possível muco sanguinolento, em decorrência da presença das larvas no pulmão (CONTERNO *et al.*, 2020; KLOMKLIEW, 2022).

Embora com menos frequência, e principalmente em crianças, a cronicidade da doença pode dificultar o crescimento devido à anorexia, à má absorção de nutrientes e às alterações na mucosa do jejuno. O comprometimento da absorção de nutrientes levam o indivíduo infectado a um estado de anemia crônica. Consequentemente, a palidez, a apatia, o cansaço, a fraqueza, o desânimo e a sonolência são frequentes nesses indivíduos acometidos (DJUARDI *et al.*, 2021). A ascaridíase crônica também pode prejudicar o desenvolvimento cognitivo, ainda que sejam necessários mais estudos que elucidem essa correlação (ELSE *et al.*, 2020). Os sintomas mais graves e agudos, como hiper-reatividade brônquica, usualmente advém da Síndrome de Löffler – uma resposta eosinofílica à migração larval com sintomas semelhantes ao da asma – ou da obstrução biliar e intestinal causadas pelos vermes, podendo levar à pancreatite, colecistite, apendicite, perfuração intestinal e peritonite (DESLYPER, 2020; CONTERNO *et al.*, 2020; CARABALLO, LLINÁS-CABALLERO, 2023; BIRHANU, 2023).

2.1.5 Resposta Imunológica

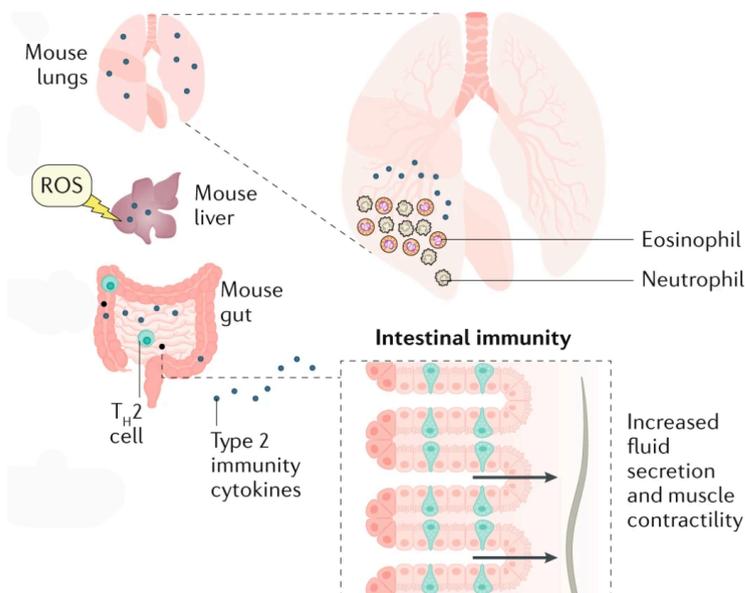
A resposta imunológica desencadeada pelo *Ascaris lumbricoides* em seu hospedeiro é do tipo Th2 (T-*Helper* 2), caracterizada pela liberação de interleucinas 4 (IL-4), IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 e mediada pelas células imunológicas, como basófilos, eosinófilos, mastócitos, macrófagos M2 e células linfoides tipo 2 (**Figura 06**). Além disso, a resposta imune é caracterizada pela produção de imunoglobulinas IgG1, IgG4 e IgE (ROCHA, 2022; WEATHERHEAD *et al.*, 2020). O processo de combate ao helminto é coordenado e depende do local onde está ocorrendo. As citocinas liberadas são cruciais para essa coordenação e ativam células como macrófagos, células caliciformes, células musculares lisas e células epiteliais (**Figura 07**) (ROCHA, 2022; WONG *et al.*, 2023). Dessa maneira tem-se a produção de moléculas efetoras como RELM- β (Molécula do tipo Resistina β , do inglês *Resistin-like molecule β*), a renovação das células epiteliais, contração do músculo liso, aumento da secreção mucosa e fluida, encapsulamento e formação de uma barreira mucosa (WONG *et al.*, 2023).

Figura 06: Visão geral da resposta imunológica ao *Ascaris*



Fonte: WONG *et al* (2023)

Figura 07: Resposta imunológica ao *Ascaris* em modelos animais



Em camundongos resistentes à ascaridíase, a eliminação de parasitas do intestino envolve o mecanismo de aumento da secreção de fluidos e da contratilidade muscular. Os mecanismos da imunidade pulmonar não são claros, mas provavelmente envolvem mecanismos efetores controlados pela imunidade tipo 2. Tanto neutrófilos quanto eosinófilos infiltram-se nos pulmões. Ainda menos compreendida é a imunidade hepática, embora espécies reativas de oxigênio (ROS) tenham sido implicadas no mecanismo de resistência.

Fonte: ELSE *et al* (2020)

Na fisiologia é bem descrito que o intestino desempenha função importante na imunidade, podendo ser considerado um órgão imunológico, pois regula a saúde corporal. Os helmintos são conhecidos pelo seu potencial alergênico e as infecções helmínticas são uns dos principais fatores que influenciam a patogênese, a intensidade, o diagnóstico e a epidemiologia de doenças alérgicas em países tropicais (VACCA, LE GROS, 2022). Na ascaridíase, bem como em outras doenças parasitárias, o agente etiológico é responsável por modular o sistema imune do hospedeiro, estimulando ou suprimindo a resposta imunológica. Isso pode ser realizado pela indução de células T reguladoras (Treg), alterando a atividade das células dendríticas ou bloqueando o início das respostas imunes do tipo 2 (CARABALLO, ACEVEDO, ZAKZUK, 2019; VACCA, LE GROS, 2022).

Particularmente, o *Ascaris lumbricoides* apresenta alto potencial alergênico quando comparado a outros helmintos. Inclusive existem estudos que associam a ascaridíase com a diminuição da função pulmonar e com risco aumentado de asma, pois o *Ascaris* apresenta várias moléculas com capacidade de ligação a IgE, que podem se comportar como alérgenos (VACCA, LE GROS, 2022). Porém, outros estudos defendem a hipótese de que a resposta Th2 desencadeada tem papel protetivo contra a asma. Na metanálise realizada por Taghipour *et al.* (2020), não foi encontrada nenhuma associação significativa entre a ascaridíase e o agravamento dos casos de asma quando analisadas por métodos parasitológicos. Porém, quando analisadas por métodos sorológicos, foi encontrada uma associação entre a ascaridíase e a asma. Por esse motivo, ensaios clínicos com métodos mais sensíveis e específicos são necessários para melhor desenvolver essa questão.

2.1.6 Diagnóstico

A **tabela 02** apresenta um resumo dos métodos utilizados para o diagnóstico da Ascaridíase. Atualmente, para o diagnóstico da infecção por *Ascaris lumbricoides*, o método mais utilizado e recomendado pela OMS é o Kato-Katz. Ele consiste na realização de um esfregaço de uma amostra de fezes e posterior identificação e quantificação de ovos do helminto por microscopia direta (KATZ, CHAVES, PELLEGRINO, 1972). É um método de baixo custo, que pode ser realizado em campo ou no laboratório, que permite identificar a intensidade da

infecção e que apresenta boa especificidade, em torno de 99%. Contudo, ele muitas vezes apresenta baixa sensibilidade, que varia de 57% a 81%, e enfrenta problemas como a falta de padronização, a necessidade de profissionais treinados nessa técnica e a baixa viabilidade de uso diante de grande amostragem (ELSE *et al.*, 2020).

Outros métodos copromicroscópicos também são muito utilizados no diagnóstico do *Ascaris*. São eles: o Formol-éter, que faz a identificação apenas de ovos embrionados e tem baixa sensibilidade; o FLOTAC, que permite quantificação, de forma simultânea, dos ovos de vários parasitos e apresenta boa sensibilidade e especificidade, mas alto custo; o mini-FLOTAC, o qual quantifica os ovos, mas tem sensibilidade semelhante a do Kato-Katz; o FECPAK, com sensibilidade relativamente baixa, permite identificação de vários helmintos, simultaneamente, e oferece resultados em uma hora, mas exige conexão com a internet; e o McMaster, que apresenta boa sensibilidade, baixo custo, permite a detecção em larga escala devido a sua contagem rápida, mas exige uma câmara especial de contagem. Devido a essas limitações, desenvolveram-se métodos diagnósticos baseados em amplificação e detecção de DNA do parasita, como LAMP assay, que identifica o DNA do helminto presente na amostra, e a qPCR (PCR em tempo real), que realiza a quantificação do DNA. Ambos métodos apresentam boa especificidade e sensibilidade, mas essa sensibilidade pode diminuir caso existam produtos interferentes na amostra fecal ou caso seja feito o uso de formalina para fixação da amostra. Além disso, requerem equipamento específico, dificultando o uso nas testagens de campo. Apesar disso, ainda são os testes mais sensíveis e mais indicados para o diagnóstico do *Ascaris* (ELSE *et al.*, 2020; LAGATIE, 2020b).

Tabela 02: Comparação dos métodos diagnósticos do *Ascaris lumbricoides*

Métodos diagnósticos	Metodologia	Especificidade*	Sensibilidade**	Vantagens	Desvantagens
Microscopia direta	Detecção de ovos	Baixa	Elevada	Baixo custo	Não detecta infecções de baixa intensidade
Kato-Katz	Detecção e quantificação de ovos	Variável	Elevada	Baixo custo, em campo ou no laboratório	Falta de padronização e necessidade de treinamento específico
Formol-éter	Detecção de ovos	Baixa	Elevada	Baixo custo	Só detecta os ovos com embrião
Flotac	Quantificação de ovos	Alta	Elevada	Detecta mais de um parasita	Custo relativamente elevado
Mini-Flotac	Quantificação de ovos	Alta	Elevada	Detecta mais de um parasita	Sensibilidade menor que a do FLOTAC
FECPAK	Quantificação de ovos	Variável	Elevada	Detecta mais de um parasita e tem resultados rápidos	Exige conexão com a internet
McMaster	Quantificação de ovos	Alta	Elevada	Baixo custo, rápida contagem de ovos	Exige uma câmara de contagem específica
LAMP assay	Identificação do DNA	Alta	Elevada	Baixo custo, detecção de múltiplas infecções	Pode ter baixa sensibilidade devido a interferentes na amostra,

					tem pouca aplicação em campo
qPCR	Identificação e quantificação do DNA	Alta	Elevada	Detecção de múltiplas infecções	Técnica complexa e equipamento especializado, baixa sensibilidade em caso de interferentes, pouca aplicação em campo

*Alta quando > 60% e baixa quando < 60% **Alta quando > 90%

Fonte: ELSE *et al.* (2020)

2.1.7 Tratamento

O tratamento de helmintíases no geral inclui medicamentos anti-helmínticos de amplo espectro, tais como albendazol, mebendazol e ivermectina. Mas eles também devem estar associados a melhorias no saneamento básico e à instrução da população local, como indicado pela iniciativa WASH (*Water, Sanitation and Hygiene*), realizada pela OMS e pela CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). Apesar dos esforços para controle e prevenção da ascaridíase, as taxas de reinfecção tendem a ser elevadas, principalmente em locais endêmicos, pois os ovos e larvas do parasita continuam nos locais contaminados. Em adição, tem-se reportado cada vez mais casos de resistência a esses anti-histamínicos (EVANGELISTA *et al.*, 2023; WONG *et al.*, 2023; ZAWAWI, ELSE, 2020).

Há poucos medicamentos disponíveis para tratar efetivamente a infecção por *A. lumbricoides*: os benzimidazóis, as lactonas macrocíclicas, o pamoato de pirantel e o levamisol. Eles apresentam boa redução de ovos e boas taxas de cura, mesmo quando usado em dosagem única. No entanto, embora a administração em massa desses medicamentos, a Quimioterapia Preventiva (QP), consiga tratar momentaneamente a doença, não previne a reinfecção e pode aumentar a

resistência medicamentosa. Para mais, os programas de QP muitas vezes não possuem dados acurados sobre a endemicidade da região ou enfrentam barreiras na sua aplicação, principalmente em crianças de 1 a 5 anos (ELSE *et al.*, 2020; JONES *et al.*, 2022; OYEYEMI, OKUNLOLA, 2023).

Não se sabe exatamente os mecanismos de resistência do *A. lumbricoides*, mas o estudo de Jones *et al.* (2022) sugere que as β -tubulinas desse helminto são uma das proteínas responsáveis por essa resistência às medicações. Isso porque os benzimidazóis atuam ligando-se às β -tubulinas e desestabilizando os microtúbulos. Mais especificamente, ele afirma que o aminoácido E198 pode ser o responsável por essa resistência, pois mutações nele promovem uma interação proteína-fármaco mais fraca.

Em casos mais graves de ascaridíase, como quando há pancreatite, ascaridíase peritoneal ou obstrução intestinal, o tratamento deve ser realizado com base no manejo dos sintomas do paciente aliado ao uso de anti-helmínticos. Caso os vermes não sejam expelidos em até 3 semanas após o início do tratamento, eles podem ser extraídos de forma cirúrgica (ELSE *et al.*, 2020).

2.2 GENÔMICA DO *ASCARIS*

2.2.1 Desenvolvimento do Estudo Genômico

No início do século XXI, apesar da utilização massiva do sequenciamento de Sangers, ou sequenciamento de primeira geração, a ascaridíase não foi prioridade, assim como outras doenças negligenciadas, e o *Ascaris* continuou sendo estudado com tecnologias mais precárias. Os principais métodos usados eram bioquímica e bandejamento cromossômico e eles estimaram que o genoma germinativo tinha de 300Mb a 800Mb, com cerca de 20 a 40% sendo eliminados durante a eliminação programada de DNA. Desse modo, um dos principais objetivos era qualificar e quantificar o DNA perdido. Além disso, o *Ascaris* é um verme relativamente fácil de ser estudado devido ao seu tamanho quando adulto, ao seu dimorfismo sexual e à quantidade de ovos produzidos, permitindo o estudo detalhado de distintos estágios do desenvolvimento (WANG, 2021a).

A revolução no campo de pesquisa sobre o genoma desse parasito aconteceu como consequência da evolução das tecnologias de sequenciamento

genético de alto nível e da redução nos custos dessas tecnologias (PERVEZ *et al.*, 2022). O primeiro método de sequenciamento de DNA foi o sequenciamento de Sanger, criado em 1977. Atualmente ele usa a tecnologia de DNA recombinante e PCR (Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), analisando apenas uma sequência por faixa de eletroforese ou tubo capilar (PERVEZ *et al.*, 2022; KUMAR, COWLEY, DAVIS, 2019). O sequenciamento de segunda geração, também chamado de sequenciamento de leitura curta, refere-se aos tipos de sequenciamento que surgiram após o sequenciamento de Sangers. Ele é caracterizado pelo sequenciamento massivo de moléculas curtas (250-800 pb) de DNA amplificadas clonalmente. Já o sequenciamento de terceira geração, conhecido como sequenciamento de leitura longa, é capaz de ler moléculas de 10kb a 300kb diretamente do DNA nativo. Ele é muito utilizado para montagem genômica e para o diagnóstico de doenças e síndromes genéticas (HU *et al.*, 2021). Esses métodos estão expostos na **tabela 03**.

No início do século XXI, o primeiro rascunho significativo do genoma do *Ascaris* foi realizado com o sequenciamento de Sangers e o auxílio do Illumina, utilizados para facilitar a análise de pequeno RNA (sRNA, do inglês *small RNA*). Em seguida, mais dois rascunhos foram publicados utilizando o Illumina de alta cobertura, um deles com foco em recursos genômicos para a descoberta de alvos para drogas, e o outro comparando a eliminação programada de DNA na linhagem germinativa e na somática. Essas duas montagens foram aperfeiçoadas com novas tecnologias, incluindo sequenciamento de leituras longas (PacBio), mapeamento óptico e o método de captura de conformação cromossômica (Hi-C), produzindo duas grandes atualizações recentes. Esses genomas germinativos e somáticos mais recentes de *Ascaris* demonstram a presença de 24 cromossomos germinativos e 36 somáticos (WANG, 2021a).

Tabela 03: Métodos de sequenciamento para estudos genômicos e as suas aplicações

Métodos	Aplicações
Sequenciamento de Sanger (primeira geração)	Sequenciamento por síntese Foi a base para os estudos do Projeto Genoma Humano
*Illumina (segunda geração)	Sequenciamento de genoma completo para pequenos organismos Sequenciamento e perfil de expressão de gene alvo Análise de miRNA e siRNA Sequenciamento metagenômico 16S (exceto iSeq 100)
*PacBio (terceira geração)	Sequenciamento de moléculas únicas em tempo real Montagem do genoma <i>de novo</i> Sequenciamento metagenômico Detecção de variações estruturais

Fonte: elaboração própria (2023)

*Sequenciamento de Nova Geração (NGS - *Next-Generation Sequencing*)

2.2.2 Eliminação Programada do DNA

Com a descoberta dos dois genomas apresentados pelo *Ascaris lumbricoides*, o germinativo e o somático, levantou-se o questionamento de por que o primeiro é muito menor que o segundo. Isso, pois, em organismos multicelulares, os mecanismos genéticos atuam de modo que os genomas somáticos e germinativos sejam idênticos. Além disso, nesses organismos existem processos de silenciamento do DNA, como metilação do DNA ou silenciamento pós-transcricional de mRNAs via RNAs reguladores, mas esses mecanismos não são observados com frequência no *Ascaris*. Desse modo, notou-se que esse helminto pode apresentar

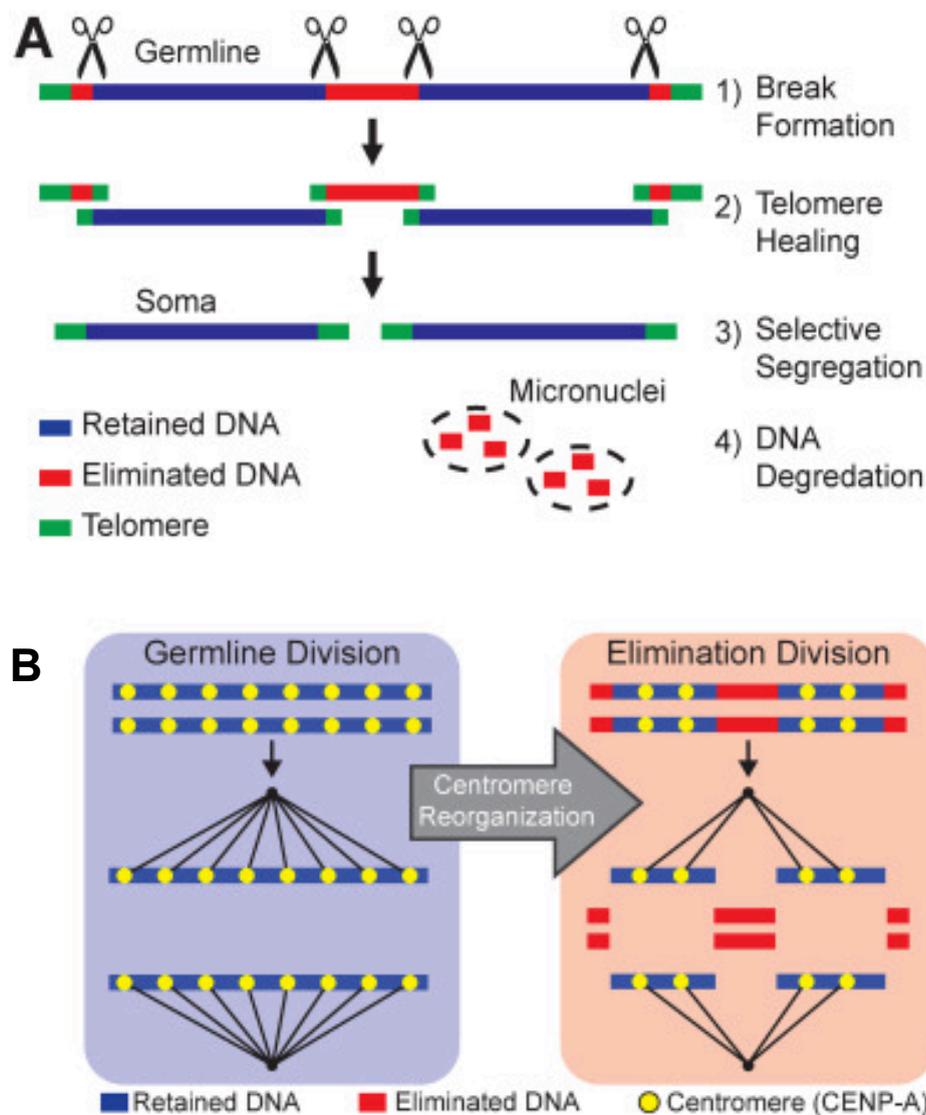
uma alternativa drástica ao silenciamento de parte do genoma, a eliminação programada do DNA (PDE, do inglês *Programmed DNA Elimination*). Além disso, ela também é responsável pelo aumento do número de cromossomos da linhagem germinativa (24) para a somática (36) (WANG *et al.*, 2020; ZAGOSKIN, WANG, 2021).

Esse é um processo complexo que permite a geração dos dois genomas distintos e acontece em diversos organismos, de unicelulares a multicelulares, incluindo vertebrados e invertebrados. A eliminação programada do DNA coincide com diferenciação germinativo-somática durante a embriogênese e apresenta diferentes mecanismos dependendo do organismo, provavelmente porque evoluiu de maneira independente dentro da taxonomia (WANG *et al.*, 2020; WANG, 2021a). Nos metazoários, a eliminação programada do DNA ocorre de duas formas: perda de um cromossomo inteiro ou fragmentação do cromossomo, resultando em perda de material genético. A última forma é mais complexa, pois requer a quebra da dupla fita do DNA, e os mecanismos exatos pelos quais isso ocorre nos animais ainda não são conhecidos, mas sabe-se que a cromatina fica frouxa nesses locais de quebra durante a PDE. Comparando-se os genomas germinativos e somáticos, estimou-se que o *Ascaris* apresenta 72 regiões de Quebra de Dupla Fita no cromossomo (DSBs, do inglês *Double Standard Breaks*), sendo 48 delas nas extremidades, onde ocorre remoção das sequências teloméricas e subteloméricas (**Figura 08**) (WANG, 2021a; ZAGOSKIN, WANG, 2021; WANG, 2021b; ESTREM, WANG, 2023).

A eliminação programada do DNA acontece cedo na embriogênese, e, no *Ascaris lumbricoides*, começa entre os estágios de desenvolvimento de 4 a 16 células (**Figura 09**). Ela ocorre consecutivamente, durante a embriogênese, em cinco células pré-somáticas independentes, sempre excluindo as mesmas sequências em cada eliminação. Pesquisas ao nível citológico e molecular sugerem os eventos cromossômicos ocorridos durante a divisão celular (WANG *et al.*, 2020). Primeiro, há reconhecimento das regiões de quebra e DSBs nesses locais. Em segundo lugar, há remodelamento na extremidade cromossômica por adição de telômero. Depois, na metáfase, tanto o DNA que será eliminado quanto o DNA que permanecerá na célula se alinham na placa metafásica. No entanto, na anáfase, o DNA a ser eliminado continua na placa metafásica, pois não apresenta centrômero para ser deslocado e é quebrado em pedaços menores, enquanto o DNA remanescente é direcionado para as células filhas. Logo após, esses fragmentos

que serão deletados são marcados pelo anticorpo H3S10P (do inglês *Anti-phospho-histone H3*), um marcador de modificações de histona associado a condensação cromossômica durante a mitose. Dessa maneira, durante a telófase, o DNA é sequestrado por estruturas membranosas semelhantes aos micronúcleos presentes nos mamíferos. Posteriormente, provavelmente ele sofre autofagia e é degradado nas próximas divisões celulares (ESTREM, WANG, 2023).

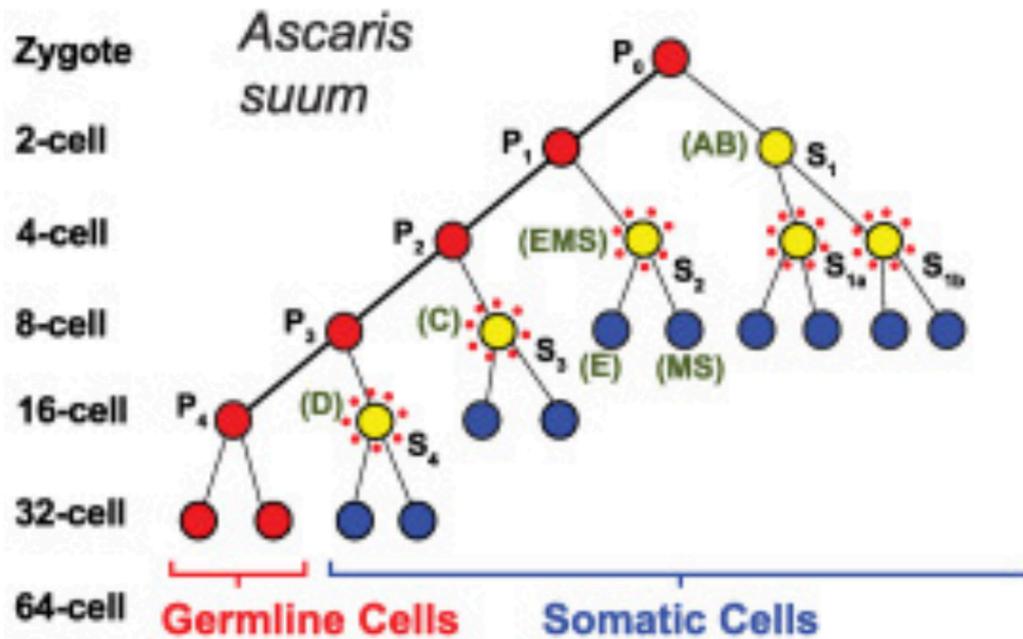
Figura 08: Eliminação Programada do DNA



(A) Etapas da PDE; (B) Diferenças entre a divisão da linhagem germinativa e da divisão com PDE

Fonte: adaptada de ESTREM, WANG (2023)

Figura 09: Eliminação programada do DNA na embriogênese



Linhagem celular inicial de *Ascaris* durante o desenvolvimento inicial. As células germinativas são vermelhas, as células pré-somáticas são amarelas e rodeadas por pontos vermelhos e as células somáticas são azuis. A PDE ocorre durante divisões sucessivas no início da embriogênese.

Fonte: adaptada de ESTREM, WANG, 2023

Em metazoários como o *Ascaris*, que possui um estudo mais detalhado sobre a Eliminação Programada do DNA, considera-se esse processo como uma deleção de sequências repetidas (ZAGOSKIN, WANG, 2021). Segundo Wang (2021), aproximadamente 18% (~55Mb) do genoma da linhagem germinativa do *Ascaris* é excluído durante a PDE. Dessa porcentagem, ~30Mb são de sequências de repetição em *tandem* de 121pb cada, ~5Mb são de repetições teloméricas e subteloméricas e ~20Mb não são de repetições, mas sim de DNAs únicos que codificam aproximadamente 1000 genes na linhagem germinativa (1%- 5%). Esses genes eliminados estão envolvidos majoritariamente na gametogênese e embriogênese inicial. (WANG, 2021a; ZAGOSKIN, WANG, 2021b; WANG, 2021b; ESTREM, WANG, 2023).

Entretanto, em outro artigo, Wang *et al.* (2020) observou que a PDE elimina muitos dos genes envolvidos no desenvolvimento da linhagem germinativa do

genoma somático, mas não todos eles. Dos 1548 genes do *Ascaris* estudados por ele, apenas 252 foram deletados, sugerindo que os genes remanescentes são silenciados pelos métodos tradicionais nas células somáticas. Dessa forma, sua teoria é de que esses genes eliminados da linhagem germinativa apenas são excluídos por se encontrarem entre extensas sequências de repetição, não sendo os alvos originais da PDE. Isso significa que a PDE pode não fornecer, por si só, um fator exclusivo para o desenvolvimento da linhagem somática.

2.2.3 *Small RNAs* e Transcriptoma

Outra característica importante sobre o genoma do *Ascaris* é que ele possui múltiplos cromossomos sexuais, 5 na linhagem germinativa e 9 na somática, contrastando com outros nematóides, que têm apenas 1 cromossomo sexual. A comparação com outros nematóides, realizada com proteínas ortólogas (compartilhada por duas ou mais espécies), indica que muitos dos cromossomos sexuais da linhagem germinativa resultam de fusão cromossômica recente. Isso é corroborado pela análise dos cromossomos pelo método de pintura cromossômica. E demonstra, também, que o cariótipo do *Ascaris* permanece praticamente intacto, com excepcionais fusões e cisões, apesar dos rearranjos intracromossômicos. Curiosamente, os locais de quebra desses cromossomos sexuais coincidem com os locais de fusão (WANG, 2021a).

A versão mais recente do genoma do *Ascaris* prevê 15.714 genes, sendo 918 genes deletados por eliminação de DNA. Essa versão usou 42 conjuntos de dados de RNA-seq (*RNA Sequencing*) de vários estágios de desenvolvimento, incluindo estágios distintos da linhagem germinativa masculina e feminina, zigotos iniciais, embriões, larvas, músculos, intestino e outros tecidos somáticos. Além disso, mais de 60 mil isoformas advindas do processo de *splicing* alternativo foram identificadas por meio do PacBio ISO-seq. Ele também mostrou que o *Ascaris* possui alguns RNAs policistrônicos (que codificam mais de uma proteína) (WANG, 2021a).

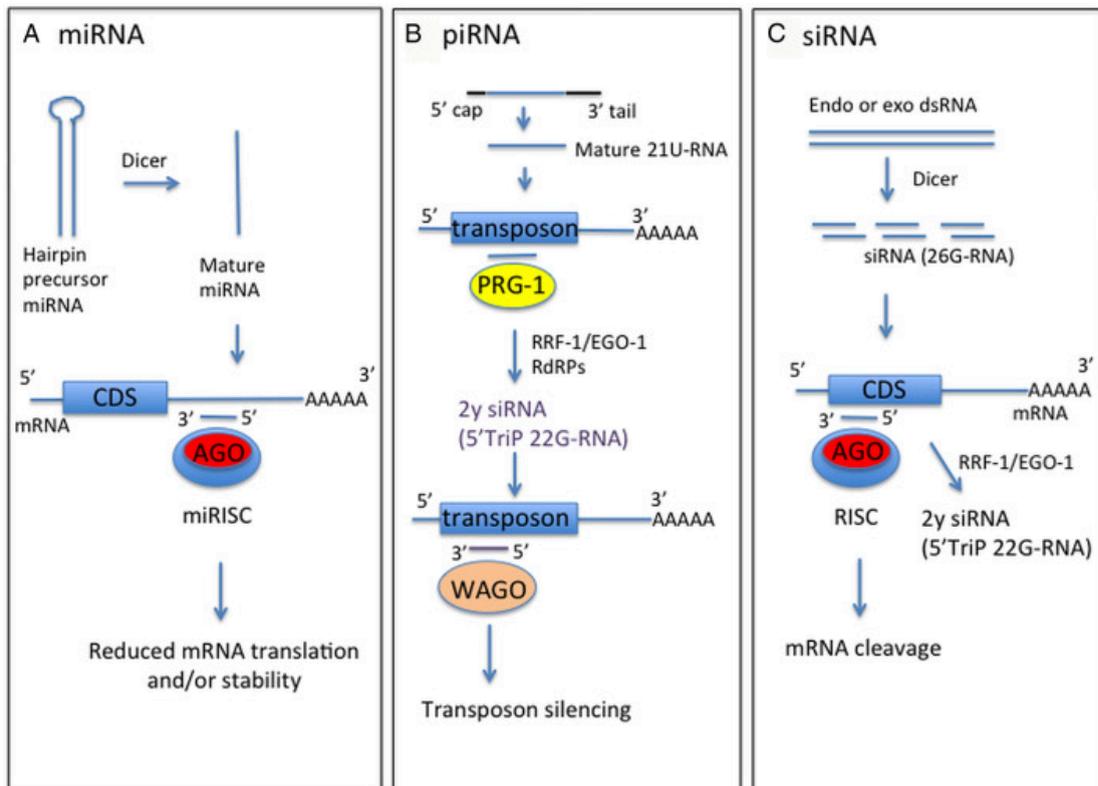
Da mesma forma que em outros helmintos, RNAs extra celulares (ex-RNA) estão presentes em *Ascaris lumbricoides*, podendo ser ou não codificantes e apresentando alta estabilidade em ambientes ricos em RNase. Eles podem ser liberados por meio de vesículas, em associação com lipoproteínas ou com complexos ribonucleoproteicos. As classes de ex-RNAs de maior relevância são as

dos sRNA, caracterizada por RNAs não codificantes menores que 200nt, e as do RNA circulares (circRNAs), não codificantes de tamanho médio 500nt, podendo chegar até 1500nt (CUCHER, ANCAROLA, M.A., KAMENETZKY, 2021; MINKLER *et al.*, 2022).

Os sRNAs e suas funções na regulação gênica começaram a ser estudados no nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*, incluindo RNA associado a PIWI (piRNA), pequeno RNA de interferência (siRNA) e microRNA (miRNA). Nele, esses RNAs estão associados com a regulação gênica transcricional e também pós-transcricional, pois regulam a tradução e a degradação do mRNA. No entanto, descobriu-se que somente há produção de piRNA no clado V dos nematelmintos, estando ausente, portanto, no *Ascaris lumbricoides*. Já os circRNAs foram descobertos em células HeLa, em células CV-1 (células de rins de macaco) e em células de ovário de hamster chinês. Seu papel em helmintos começou a ser demonstrado pelo estudo em *C. elegans*, evidenciando a importância do RNA circular para a expressão gênica (ZAGOSKIN *et al.*, 2022; WANG, 2021a; MINKLER *et al.*, 2022). As formas e funções das classes de pequenos RNAs em nematóides estão expostas na **Figura 10**.

O miRNA possui de 20 a 26 nucleotídeos de comprimento e, em nematóides, atua na regulação pós-transcricional. Ele se liga na região 3' não traduzida dos seus mRNAs alvos, inibindo a tradução de proteínas e promovendo a degradação do mRNA. O sequenciamento de amostras de vermes adultos de *A. suum* mostrou que houve enriquecimento de dois tipos de miRNA, *lin-4* e *let-7*, associados a interleucina 13 (IL-13) (BRITTON, LAING, DEVANEY, 2020). Isso indica uma possível modulação da expressão gênica da célula hospedeira para benefício próprio (SILVA *et al.*, 2021). Em relação ao siRNA, ele possui comprimento de 21 a 25 bases e, como o miRNA, é derivado de moléculas de RNA de fita dupla. Dois tipos principais de siRNA foram identificados em *C. elegans*, o 26G-RNA e o 22G-RNA (26 e 22 nucleotídeos com tendência para monofosfato de guanossina na extremidade 5') e sua função é amplificar a resposta do RNA de interferência e silenciar sequências de genes alvos, podendo também atuar na resposta parasita-hospedeiro (BRITTON, LAING, DEVANEY, 2020; ZAGOSKIN *et al.*, 2020).

Figura 10: Formas e funções das classes de pequenos RNAs em nematóides



(A) A fita madura de miRNA é incorporada no complexo de silenciamento induzido por miRNA (miRISC) contendo a proteína Argonauta (Ago). Este complexo direciona a ligação às sequências alvo do mRNA. A especificidade é determinada pela complementaridade entre a sequência alvo e a *seed sequence* de miRNA (nucleotídeos 2–7). (B) O piRNA maduro é processado e se liga à Argonauta Piwi para reconhecer sequências alvo, muitas vezes transposons, por pareamento de bases complementares. Isto inicia a síntese de pequenos RNAs inibitórios secundários (siRNAs) por RNA polimerases dependentes de RNA (RdRP's). Os siRNAs associam-se a proteínas Argonautas específicas de vermes (WAGOs) para mediar o silenciamento do alvo. (C) O dsRNA endógeno ou exógeno é processado em siRNAs, que se ligam à sequência exônica do mRNA para mediar a clivagem do mRNA pela Argonauta RDE-1.

Fonte: Adaptada de BRITTON, LAING, DEVANEY (2020)

Já o piRNA tem 21 bases de comprimento com viés para uracila como o nucleotídeo 5' (21U-RNA) e sua função é promover a síntese de siRNA secundário, promovendo um silenciamento indireto do alvo. Em *Ascaris*, a maioria dos siRNAs são expressos durante a formação da linhagem germinativa e o desenvolvimento embrionário, mas também existem aqueles que têm como alvo apenas genes específicos do testículo. Além disso, o siRNA secundário 22G-RNA é o mais abundante nessa espécie e é, em sua maioria, RNA *antisense* para sequências repetitivas associadas a proteínas argonautas do *Ascaris* (ZAGOSKIN *et al.*, 2022; WANG, 2021a; BRITTON, LAING, DEVANEY, 2020).

Em *Ascaris suum*, foi descrita a presença de RNAs circulares, mas sua forma de excreção não foi muito explorada, apesar de se acreditar que sejam secretadas em vesículas extracelulares (EVs, do inglês *Extracellular Vesicles*) como os sRNAs. Em seu estudo Britton, Laing, Devaney (2020) analisaram as vesículas extracelulares de *A. suum* de forma direta, por meio de imagens da vesícula, e de forma indireta, pela análise do sobrenadante contendo essas vesículas. Foram encontrados dois tipos de RNA circulares, sugerindo que essa é uma das formas de secreção dos RNAs circulares. Foi observado, ainda, que o RNA circular interage com o miRNA, preferencialmente de humanos em relação ao seu próprio. Ele atua, assim, como uma esponja de miRNA, diminuindo sua biodisponibilidade no meio e, conseqüentemente, alterando a expressão gênica.

Os *small RNAs* são moléculas que se associam às proteínas Argonautas, guiando-as para os seus alvos. Assim, essas proteínas atuam como cofatores e promovem o silenciamento do gene, seja por clivagem do RNA ou pelo recrutamento de outros repressores. O complexo formado pelo sRNA e a proteína Argonauta é chamado de complexo de silenciamento induzido por RNA com papel central nas vias de RNA de interferência. Além disso, as proteínas Argonautas também participam da síntese de miRNA e siRNA endógeno. Elas são responsáveis pela estabilidade do duplex formado pela proteína Dicer, enzima relacionada a RNase III e necessária para essa síntese (ALMEIDA, ANDRADE-NAVARRO, KETTING, 2019).

Dados de RNA-seq de oócitos de *Ascaris* mostram que a transcrição de ~4000 genes iniciam antes da fusão pronuclear dos gametas e nos embriões de 1 a 4 células, o que contrasta com a maioria dos organismos modelos. Isso provavelmente acontece devido ao longo tempo de maturação dos zigotos antes da fusão pronuclear, e ao ciclo celular e desenvolvimento inicial mais demorados do *A. lumbricoides*. Assim, resta mais tempo para realizar os eventos de regulação da expressão gênica, já que os RNAs vão sendo transcritos segundo a necessidade protéica desse helminto (WANG, 2021a).

2.3 PALEOPARASITOLOGIA

A paleoparasitologia é uma ciência responsável pela identificação e estudo de parasitos em amostras de origem arqueológica, como amostras provenientes de latrinas, valas, fósseis, dentes e coprólitos (ARAÚJO *et al.*, 1998). A

paleoparasitologia tradicional realiza a análise morfológica dos ovos dos parasitas por meio da microscopia óptica (OH *et al.*, 2023). No entanto, essa técnica apresenta limitações, quando utilizada nessas amostras, por duas principais razões. A primeira é que muitas das amostras utilizadas não são advindas de apenas um hospedeiro, podendo haver parasitas animais e humanos. E, nesse caso, muitas espécies apresentam semelhanças morfológicas, só sendo possível fazer a distinção com exames genéticos ou moleculares. A segunda é que, caso haja destruição dos ovos do parasita, ele não poderá ser identificado. Em alguns casos, como na distinção entre *A. lumbricoides* e *A. suum*, não é possível a distinção apenas com análise de DNA mitocondrial, pois as duas espécies estão intimamente relacionadas (TAMS *et al.*, 2018; EL-WAKIL, ZALAT, EL-BADRY, 2023).

A comparação de parasitos em populações ancestrais e pós-modernas é importante para uma melhor compreensão sobre como a prevalência desses parasitas se modificou durante o tempo. Pode revelar, ainda, dados sobre preferências alimentares, exploração animal, higiene e economia de populações antigas (ZHAN *et al.*, 2019; TAMS *et al.*, 2018).

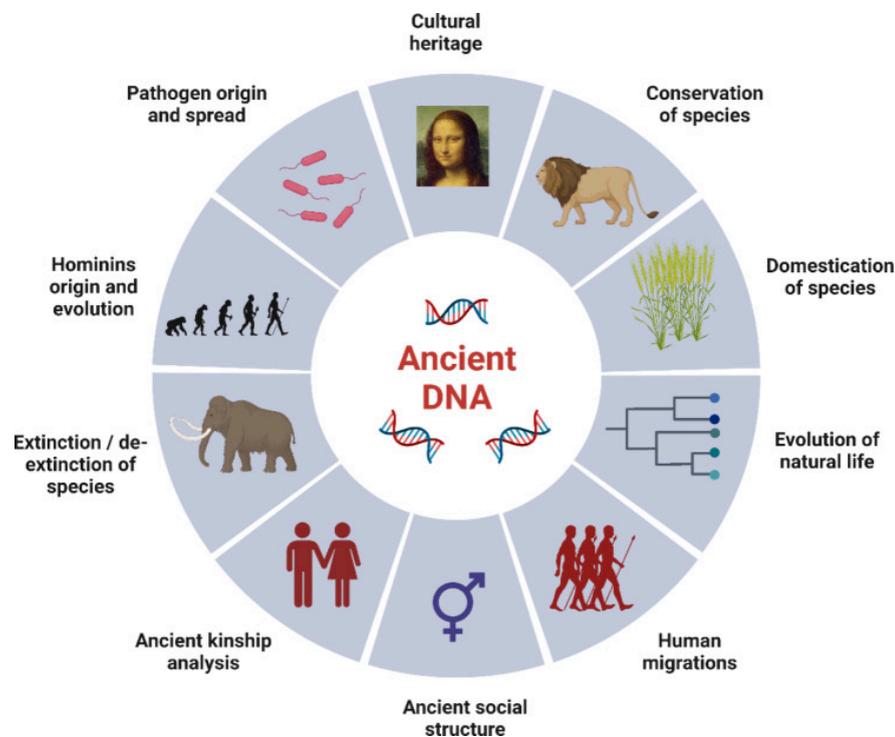
A pesquisa realizada por Zhan *et al.* (2019) mostrou, pela análise de 13 múmias da China Antiga, que *Trichuris trichiura* estava presente em 77% das múmias e *Ascaris lumbricoides* em 62%. Expôs, ainda, após a análise de 24 múmias da Coreia antiga, que *T. trichiura* estava presente em 83,3% das amostras e *A. lumbricoides* em 58,3%. Isso pode ser explicado devido à utilização de fezes humanas na fertilização dos solos na agricultura, prática que durou até meados da década de 70 na Coreia, quando fertilizantes químicos começaram a ser utilizados em larga escala. Com isso, aliado a uma maior prevenção e tratamento, houve uma queda nas infecções por parasitas presentes no solo.

Outra pesquisa, realizada por Tams *et al.* (2018), na escavação de um lago na Dinamarca, analisou 19 amostras de sedimentos e revelou a presença de *A. lumbricoides* em todas as amostras de todas as camadas da lagoa e algumas amostras contendo *Taenia spp.* e *Trichuris spp.* na superfície e no fundo da lagoa. Isso indica que a lagoa foi gradualmente preenchida com fezes humanas no início do século I dC até ao final do século II e que havia consumo de carne bovina crua ou mal cozida durante 100 AC-100 dC.

2.3.1 Ancient DNA

O *ancient DNA* pode ser definido como o DNA que pode ser extraído de amostras biológicas das últimas dezenas de milhares de anos e é estudado pela paleogenética, uma subárea da paleobiologia. Sua descoberta e utilização para estudos paleoparasitológicos permitiu a identificação correta dos parasitas presentes nas amostras. Ademais, foi capaz de revelar dados sobre origens evolutivas, migrações, interações e desaparecimentos de populações humanas passadas, como mostrado na **Figura 11** (CHEN, NEDOLUZHKO, 2023; SØE *et al.*, 2018). O aDNA foi descrito pela primeira vez por Higuchi *et al.* (1984), extraído de uma subespécie extinta de cavalo, despertando grande interesse da paleogenética (CÔTÉ, LE BAILLY, 2018).

Figura 11: Áreas de implementação de métodos de aDNA na paleobiologia



1. Extração de DNA e fluxo de trabalho experimental;
2. Origem e evolução das espécies arcaicas de homínídeos;
3. Evolução das plantas e dos animais;
4. Estudos de conservação;
5. Origem e evolução do patógeno;

6. Estudos do património cultural;
7. Domesticação de espécies;
8. Migrações humanas, história das sociedades antigas e análise de parentesco;
9. Extinção e desextinção de espécies.

Fonte: CHEN, NEDOLUZHKO (2023)

Desde 2010, os dados sobre a paleogenética vem se expandindo e se acumulando, auxiliando na reconstrução de antigos genomas humanos e animais. A técnica que revolucionou a obtenção desses dados foi o Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) que permitiu uma investigação mais detalhada e complexa do aDNA, além da separação entre o aDNA e o DNA contaminado (CÔTÉ, LE BAILLY, 2018).

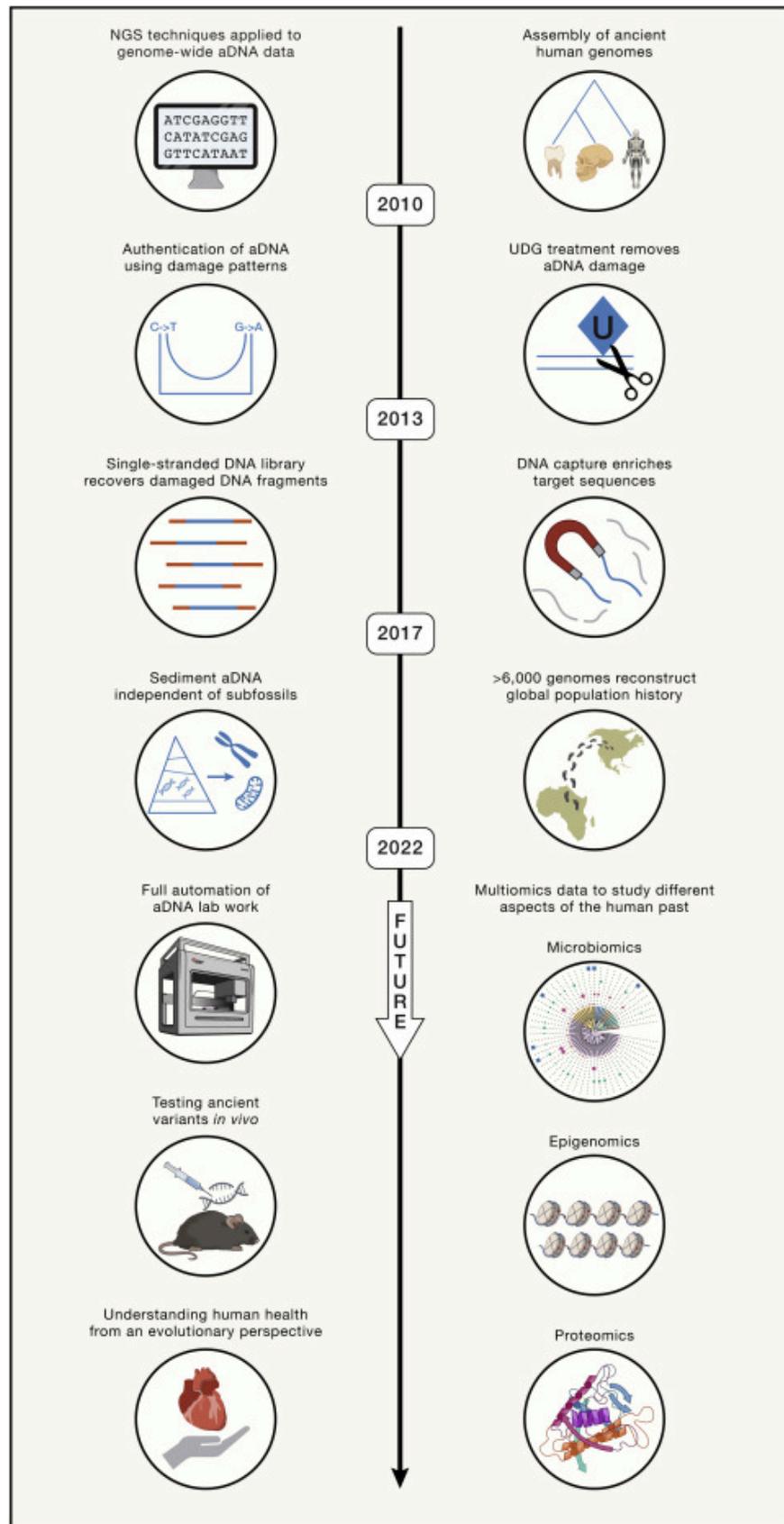
Com o passar dos anos, as técnicas de NGS foram aperfeiçoadas, permitindo a remoção de DNA danificado e a análise isolada de uma fita de DNA, permitindo a recuperação de moléculas de DNA perdidas na análise conjunta das duas fitas do DNA. Outro tipo de sequenciamento usado é o Shotgun associado a técnica de captura híbrida de DNA, permitindo a replicação de porções específicas do DNA em amostras fósseis. Essa técnica de captura híbrida, que utiliza oligonucleotídeos específicos para as regiões alvos, permitiu a difusão mundial dos estudos genômicos e da análise do *ancient* DNA ao permitir a investigação em sedimentos e não apenas em subfósseis (LIU, BENNETT, FU, 2022).

Entretanto, apesar de ser examinado pela PCR, um método com boa especificidade e sensibilidade, ele apresenta suas limitações. As principais são a contaminação desse aDNA pela mistura com o DNA ambiental, a degradação em fragmentos curtos e a mutação post-mortem (como a desaminação da citosina em uracila). Por isso, é importante a utilização de métodos distintos durante a análise das amostras (SØE *et al.*, 2018; ROCHE *et al.*, 2021). Na pesquisa realizada por Roche *et al.* (2021) foi observado que alguns parasitas, como *T. trichiura* e *Dicrocoelium*, não apresentaram uma boa amplificação durante a PCR feita com amostras ambientais, ao contrário do que ocorreu com amostras de *A. lumbricoides*. A provável explicação é a falta de proteção dos ovos, dificultando a preservação do aDNA e, conseqüentemente, a atividade da TAQ-polimerase durante a PCR.

É imprescindível, portanto, que as amostras sejam processadas em um laboratório separado e isolado, com preparação adequada dos restos mortais e

extração e purificação do DNA, para evitar contaminação com DNA moderno. Controles negativos devem sempre ser incluídos durante a preparação do DNA e a realização da PCR. O controle positivo utilizando DNA moderno deve ser evitado. Os resultados positivos devem ser repetidos utilizando a mesma extração de DNA e, quando possível, uma nova extração das mesmas amostras deve ser feita a fim de confirmar os resultados. Por fim, a caracterização quantitativa das extrações de DNA deve ser realizada para testar o comportamento molecular, pois fragmentos maiores que 1000pb não são comuns devido à natureza das moléculas antigas. É relevante mencionar, ainda, a necessidade de seguir os protocolos de campo para não haver problemas de contaminação durante a coleta das amostras (CHEN, NEDOLUZHKO, 2023; CÔTÉ, LE BAILLY, 2018). A **figura 12** apresentada abaixo mostra uma sequência histórica das técnicas e etapas empregadas para o estudo de paleogenética.

Figura 12: Avanços nas técnicas de aDNA desde 2010



Fonte: LIU, BENNETT, FU (2022)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os principais estudos genômicos do *Ascaris* que relacionem a evolução desse parasito às suas formas clínicas, seu diagnóstico e a elaboração de vacinas contra a ascaridíase.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Associar o estudo do aDNA com o avanço nas informações sobre a evolução do *Ascaris lumbricoides*;

Descrever como as informações genéticas do *Ascaris lumbricoides* podem explicar manifestações clínicas e com a resposta imunológica do hospedeiro;

Demonstrar como o estudo genômico do *Ascaris lumbricoides* pode auxiliar no desenvolvimento de vacinas e de novos métodos diagnósticos.

4 METODOLOGIA

4.1 TIPO DE ESTUDO

O presente estudo caracterizou-se como uma revisão bibliográfica do tipo narrativa com natureza exploratória dos dados. A abordagem adotada foi do tipo qualitativa, e visa apresentar o avanço da ciência e a evolução do conhecimento científico a respeito da utilização do aDNA do *Ascaris* para compreensão da evolução deste parasito. Adicionalmente, verificou-se como esse conhecimento poderia estar associado a resolução de problemas que persistem até os dias atuais, como o desenvolvimento e o emprego de técnicas para o diagnóstico mais sensível, formas de tratamento mais eficientes e prevenção e profilaxia por meio de vacinas.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Realizou-se a busca por pesquisas científicas nos bancos de dados PubMed, Scielo, Elsevier e BDTD (Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações). Os critérios de inclusão estabelecidos para o embasamento teórico deste trabalho foram: 1) artigos no idioma inglês e russo publicados entre 2018 e 2023; 2) trabalhos de mestrado e de doutorado no idioma português publicados entre 2020 e 2023. Além disso, foi aberta uma exceção para literatura relevante com mais de 5 anos de publicação. Dessa forma, pesquisas em outras línguas e com data de publicação anterior a 2018 (exceto literatura relevante) foram excluídas.

4.3 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado de maneira virtual com levantamento bibliográfico em periódicos online. Foram utilizados os seguintes descritores: “*Ascaris lumbricoides*”, “*Genoma*”, “aDNA” e “paleoparasitologia”, “diagnóstico” e “vacinas”.

5 RESULTADOS

Através da utilização dos descritores *Ascaris lumbricoides*, genômica, paleoparasitologia, diagnóstico e vacina, foram identificados um total de 4.251 documentos. Desses, 1.080 estavam disponíveis na plataforma PubMed, 2.928 na plataforma Elsevier, 188 na plataforma Scielo e 55 na plataforma BDTD. Além disso, foram obtidos dados de sites governamentais, como o da CDC, da OMS e do Ministério da Saúde do governo brasileiro.

Dessa forma, os estudos foram analisados e selecionados considerando-se os critérios de inclusão e exclusão. Foi realizada a exclusão de artigos duplicados, não relacionados ao tema, ou sem o texto completo disponível. Por fim, foram selecionados 84 estudos com informações relevantes sobre *Ascaris lumbricoides*, seu genoma e sua relação com a paleoparasitologia. Os estudos selecionados estão expostos de forma detalhada nas tabelas a seguir.

Para a descrição das características paleoparasitológicas e paleogenéticas do *Ascaris*, foram utilizados 8 artigos que estão apresentados na **Tabela 04**.

Tabela 04: artigos selecionados sobre paleoparasitologia e paleogenética

Autor	Ano	Título	Objetivo
ARAÚJO <i>et al</i>	1998	Paleoparasitology: perspectives with new techniques	Revisão sobre paleoparasitologia
LOREILLE, BOUCHET	2003	Evolution of ascariasis in humans and pigs: a multi-disciplinary approach	Ilustrar a contribuição da paleoparasitologia para a ascaridíase
CÔTÉ, LE BAILLY	2018	Palaeoparasitology and palaeogenetics: review and perspectives for the study of ancient human parasites	Aplicações da paleoparasitologia e paleogenética

ZHAN <i>et al</i>	2019	Differential change in the prevalence of the <i>Ascaris</i> , <i>Trichuris</i> and <i>Clonorchis</i> infection among past east Asian populations	Avaliar a prevalência de parasitas intestinais na China e na Coreia
GUEDES <i>et al</i>	2020	African helminth infection out of Africa: Paleoparasitological and paleogenetic investigations in Pretos Novos cemetery, Rio de Janeiro, Brazil	Identificar parasitas que infectaram indivíduos do cemitério de Pretos Novos
ROCHE <i>et al</i>	2021	Gastrointestinal parasite burden in 4th-5th c. CE Florence highlighted by microscopy and paleogenetics.	Descrever a abordagem integrativa para o estudo paleoparasitológico de uma população antiga de Florença, Itália
OH <i>et al</i>	2023	Updates on parasite infection prevalence in the Joseon period based on parasitological studies of human coprolites isolated from archaeological sites in the cities of Euijeongbu, Gumi, and Wonju	Estudos paleoparasitológicos do período Joseon para determinar prevalência da ascaridíase durante essa dinastia
EL-WAKIL, ZALAT, EL-BADRY	2023	Mapping gut parasitism patterns in a cohort of Egyptians	Mapear a distribuição de parasitas intestinais na população egípcia

Fonte: elaboração própria

Com relação aos estudos que forneceram o embasamento teórico para a compreensão do *aDNA*, foram utilizados 5 artigos que estão listados na **Tabela 05**.

Tabela 05: artigos selecionados sobre *ancient DNA*

Autor	Ano	Título	Objetivo
LOREILLE <i>et al</i>	2001	Ancient DNA from <i>Ascaris</i> : extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites	Identificar aDNA coprólitos por meio de métodos moleculares
SØE <i>et al</i>	2018	Ancient DNA from latrines in Northern Europe and the Middle East (500 BC–1700 AD) reveals past parasites and diet	Apresentar parasitas e dietas na população antiga através da análise do aDNA
TAMS <i>et al</i>	2018	Parasitic infections and resource economy of Danish Iron Age settlement through ancient DNA sequencing	Pesquisar parasitas em um lago na Dinamarca através do aDNA
LIU, BENNETT, FU	2022	Evolving ancient DNA techniques and the future of human history.	Revisar técnicas de aDNA
CHEN, NEDOLUZHKO	2023	Ancient DNA: The past for the future.	História do aDNA

Fonte: elaboração própria

Sobre os estudos que abordaram Genômica e evolução que poderiam ser aplicados para o estudo do *Ascaris*, foram utilizados 8 artigos que estão apresentados na **Tabela 06**.

Tabela 06: artigos selecionados sobre genômica e o processo de evolução do *Ascaris*

Autor	Ano	Título	Objetivo
-------	-----	--------	----------

ZUCKERKANDL, PAULING	1965	Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins	Analisar divergência e convergência evolucionária
BROWN, GEORGE, WILSON	1979	Rapid evolution of animal mitochondrial DNA	Analisar a taxa de evolução do genoma mitocondrial
LYNCH, JARRELL	1993	A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA.	Avaliar o uso do método de relógio molecular para o processo evolutivo
CAVALLERO <i>et al</i>	2013	Phylogeographical Studies of <i>Ascaris</i> spp. Based on Ribosomal and Mitochondrial DNA Sequences	Investigar a variação genética em ITS e cox 1 dentro e entre populações de <i>Ascaris</i> de origem humana e suína
VAN DER WAL, HO	2019	Molecular Clock.	Revisar sobre o método de relógio molecular
ZHOU <i>et al</i>	2020a	Study on the population evolution of <i>Ascaris lumbricoides</i> and <i>Ascaris suum</i> based on whole genome resequencing.	Avaliar a evolução do <i>A. lumbricoides</i> e <i>A. suum</i> pelo ressequenciamento dos seus genomas
ZHOU <i>et al</i>	2020b	Mitochondrial phylogenomics of human-type <i>Ascaris</i> , pig-type <i>Ascaris</i> , and hybrid <i>Ascaris</i> populations.	Analisar a filogenômica mitocondrial de <i>A. lumbricoides</i> , <i>A. suum</i> e seus híbridos
HAN <i>et al</i>	2022	Gene rearrangements in the mitochondrial genome of ten ascaris species and phylogenetic implications for Ascaridoidea and Heterakoidea families	Determinar sequências completas de mitogenoma de cinco subfamílias de Ascaridoidea e uma subfamília de Heterakoidea

Fonte: elaboração própria

Com relação aos estudos específicos sobre o genoma do *Ascaris*, foram utilizados 10 artigos que estão apresentados na **Tabela 07**.

Tabela 07: artigos selecionados sobre o genoma do *Ascaris*

Autor	Ano	Título	Objetivo
KUMAR, COWLEY, DAVIS	2019	Next-generation sequencing and emerging technologies.	Revisar o NGS
WANG <i>et al</i>	2020	Comprehensive chromosome end remodeling during programmed DNA elimination	Definir novas características e funções da PDE de metazoários
WANG, DAVIS	2020	<i>Ascaris</i>	Revisar o conhecimento sobre <i>Ascaris</i>
HU <i>et al</i>	2021	Next-generation sequencing technologies: An overview	Revisar o NGS
WANG	2021a	Genomics of the parasitic nematode <i>Ascaris</i> and its relatives	Revisar o conhecimento genômico do <i>Ascaris</i>
WANG	2021b	Genome analysis of programmed DNA elimination in parasitic nematodes	Analisar a PDE em metazoários
ZAGOSKIN, WANG	2021	Programmed DNA elimination: silencing genes and repetitive sequences in somatic cells	Estudar a função, mecanismo e evolução da PDE em metazoários
KLOMKLIEW <i>et al</i>	2022	Gut bacteriome and metabolome of <i>Ascaris lumbricoides</i> in patients	Investigar bacteriomas em helmintos por NGS
PERVEZ <i>et al</i>	2022	A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms	Destacar os NGS mais rápidos e precisos
ESTREM, WANG	2023	Programmed DNA elimination in the parasitic nematode <i>Ascaris</i>	Revisar a PDE em <i>Ascaris</i>

Fonte: elaboração própria

A respeito de informações gerais sobre a Ascariíase, foram utilizados 19 artigos que apresentavam sua epidemiologia, clínica, diagnóstico e tratamento (**Tabela 08**). Esses estudos foram importantes para fornecer o embasamento teórico para compreender as respostas imunológicas e conseqüentemente as manifestações clínicas provocadas pela infecção.

Tabela 08: artigos selecionados sobre epidemiologia, clínica, diagnóstico e tratamento da ascariíase

Autor	Ano	Título	Objetivo
KATZ, CHAVES, PELLEGRINO	1972	A simple device for quantitative stool thick-smear technique in <i>Schistosomiasis mansoni</i>	Análise do método Kato-Katz
SWITZ, D'AMBROSIO, FLETCHER	2014	Low-cost mobile phone microscopy with a reversed mobile phone camera lens	Demonstrar o uso do microscópio de telefone móvel para diagnóstico parasitário
DE ALMEIDA LOPES	2018	Imunodiagnóstico da ascariíase humana: uma nova abordagem sorológica utilizando a tecnologia IgY	Avaliar anticorpos IgY provenientes de gemas de ovos de galinhas imunizadas com extrato salino total de adultos de <i>A. suum</i>
CONTERNO <i>et al</i>	2020	Anthelmintic drugs for treating ascariasis	Comparar eficácia e segurança de anti-helmínticos
ELSE <i>et al</i>	2020	Whipworm and roundworm infections	Revisar literatura sobre <i>Trichuris trichiura</i> e <i>Ascaris lumbricoides</i> .
LAGATIE <i>et al</i>	2020a	2-Methyl-pentanoyl-carnitine (2-MPC): a urine biomarker for patent <i>Ascaris lumbricoides</i> infection	Análise do 2-MPC para diagnóstico da ascariíase

BARKHATOVA <i>et al</i>	2022	Ascaris lumbricoides-induced pancreatic lesion	Relatar complicações pancreáticas na ascaridíase
BUTPLOY, KANARKARD, MALEEWONG-INTA PAN	2021	Deep learning approach for Ascaris lumbricoides parasite egg classification.	Identificar ovos de Ascaris por ferramenta de reconhecimento de imagens
DJUARDI <i>et al</i>	2021	Soil-transmitted helminth infection, anemia, and malnutrition among preschool-age children in Nangapanda subdistrict, Indonesia	Sintomas da ascaridíase em crianças
HAILU <i>et al</i>	2022	A rare case of intestinal obstruction secondary to bolus of Ascaris Lumbricoides infestation: A case report and review of the literatures	Relato de caso de obstrução intestinal por <i>Ascaris</i>
HOLLAND <i>et al</i>	2022	Global prevalence of Ascaris infection in humans (2010–2021): a systematic review and meta-analysis	Epidemiologia da ascaridíase humana
JONES <i>et al</i>	2022	Identification of key interactions of benzimidazole resistance-associated amino acid mutations in Ascaris β -tubulins by molecular docking simulations.	Associar resistência aos benzimidazólicos com mutações nas β -tubulinas
NTONIFOR, TAMUFOR, ABONGWA	2022	Prevalence of intestinal parasites and associated risk factors in HIV positive and negative patients in Northwest	Epidemiologia HIV/Ascaridíase
ROCHA	2022	Papel protetor do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na fase aguda e crônica da ascaridíase larval experimental	Estudar o papel do receptor ACKR2 na ascaridíase em camundongos
AKANKSHA <i>et al</i>	2023	Prevalence of soil-transmitted helminth infections in HIV patients: a systematic review and meta-analysis	Epidemiologia HIV/Ascaridíase

BIRHANU <i>et al</i>	2023	Ascariasis causing small bowel obstruction in an adult female: A case report	Relato de caso de obstrução intestinal por <i>Ascaris</i>
DE LIMA CORVINO, HORRALL	2023	Ascariasis	Visão geral da ascaridíase
OYEYEMI, OKUNLOLA	2023	Soil-transmitted helminthiasis (STH) endemicity and performance of preventive chemotherapy intervention programme in Nigeria (in year 2021)	Associar a endemicidade das geohelmintíases na Nigéria com a cobertura da QP
PAWAR <i>et al</i>	2023	Smartphone-based diagnostics for biosensing infectious human pathogens	Revisar o uso de smartphones para o diagnóstico doenças

Fonte: elaboração própria

Os estudos que foram utilizados para a revisão da resposta imunológica (15 artigos) estão listados na **Tabela 09**. Adicionalmente, os trabalhos listados nesta tabela relacionam-se com o processo de desenvolvimento de vacinas contra o *Ascaris*.

Tabela 09: artigos selecionados sobre a resposta imunológica do *Ascaris* e o desenvolvimento vacinal contra a ascaridíase

Autor	Ano	Título	Objetivo
CARABALLO, CORONADO.	2018	Parasite allergens	Apresentar os principais alérgenos parasitários

TAGHIPOUR <i>et al</i>	2020	Is <i>Ascaris lumbricoides</i> a risk factor for development of asthma? A systematic review and meta-analysis	Analisar se <i>A. lumbricoides</i> é um fator de risco para Asma
WEATHERHEA <i>et al</i>	2020	Host immunity and inflammation to pulmonary helminth infections	Avaliar resposta imunológica pulmonar do hospedeiro a helmintíases
ZAWAWI, ELSE	2020	Soil-transmitted helminth vaccines: Are we getting closer?	Explorar o conhecimento de vacinas contra geohelmintíase
CARNEIRO <i>et al</i>	2021	WSB1 and IL21R Genetic Variants Are Involved in Th2 Immune Responses to <i>Ascaris lumbricoides</i>	Descrever o papel genético na resposta Th2 ao <i>A. lumbricoides</i>
DE CASTRO <i>et al</i>	2021	Vaccination with chimeric protein induces protection in murine model against ascariasis	Avaliar proteína quimérica e sua indução de proteção contra ascariíase
GUIMARÃES	2021	Desenvolvimento e produção de uma vacina quimérica multi-peptídica e avaliação de sua eficácia vacinal contra ascariíase	Identificar e caracterizar epítomos de células B e avaliar suas implicações em processos vacinais
MOHD-SHAHARUD DIN <i>et al</i>	2021	Expression of <i>Ascaris lumbricoides</i> putative virulence-associated genes when infecting a human host	Avaliar perfil de expressão de genes associados à virulência
SILVA <i>et al</i>	2021	Unraveling <i>Ascaris suum</i> experimental infection in humans	Investigar a potencial infecção humana por <i>A. suum</i> e suas alterações imunológicas
EVANGELISTA <i>et al</i>	2022	A reverse vaccinology approach identifies putative vaccination targets in the zoonotic nematode <i>Ascaris</i> .	Utilizar vacinologia reversa para identificar potenciais vacinas candidatas para <i>Ascaris</i>
VACCA, LE GROS	2022	Tissue-specific immunity in helminth infections	Analisar respostas a helmintos na imunidade específica do tecido

EVANGELISTA <i>et al</i>	2023	In silico design of a polypeptide as a vaccine candidate against ascariasis	Projetar e testar uma vacina contra ascaridíase utilizando uma metodologia <i>in silico</i>
CARABALLO, LLINÁS-CABALLE RO	2023	The relationship of parasite allergens to allergic diseases	Analisar se helmintos estão envolvidos no aumento da resposta e dos sintomas alérgicos
CASTRO <i>et al</i>	2023	Bioaccessibility and oral immunization efficacy of a chimeric protein vaccine against <i>Ascaris suum</i>	Analisar eficácia da imunização oral contra <i>A. suum</i>
WONG <i>et al</i>	2023	Soil-transmitted helminthic vaccines: Where are we now?	Mostrar o avanço nos estudos sobre vacinas para helmintos

Fonte: elaboração própria

A **Tabela 10** mostra os 6 artigos utilizados para atualizar o estado da arte sobre transcriptomas do *Ascaris*.

Tabela 10: artigos selecionados sobre o transcriptoma do *Ascaris*

Autor	Ano	Título	Objetivo
ALMEIDA, ANDRADE-NAVARO, KETTING	2019	Function and evolution of nematode RNAi pathways	Análise de RNA de interferência em nematofos
BRITTON, LAING, DEVANEY	2020	Small RNAs in parasitic nematodes – forms and functions	Análise de pequenos RNAs e suas funções

CUCHER, ANCAROLA, KAMENETZKY	2021	The challenging world of extracellular RNAs of helminth parasites	Análise de RNA extracelular em helmintos
MINKLER <i>et al</i>	2022	Expression and Secretion of Circular RNAs in the Parasitic Nematode, <i>Ascaris suum</i>	Analisar expressão e secreção de circRNA em <i>A. suum</i>
ZAGOSKIN <i>et al</i>	2022	Small RNA pathways in the nematode <i>Ascaris</i> in the absence of piRNAs	Avaliar a ação das vias de pequenos RNAs no <i>Ascaris</i>
BRITTON <i>et al</i>	2023	New technologies to study helminth development and host-parasite interactions	Aplicação do scRNA-seq para análise de expressão gênica de helmintos

Fonte: elaboração própria

6 DISCUSSÃO

5.1 PROCESSO EVOLUTIVO DO *A. LUMBRICOIDES*

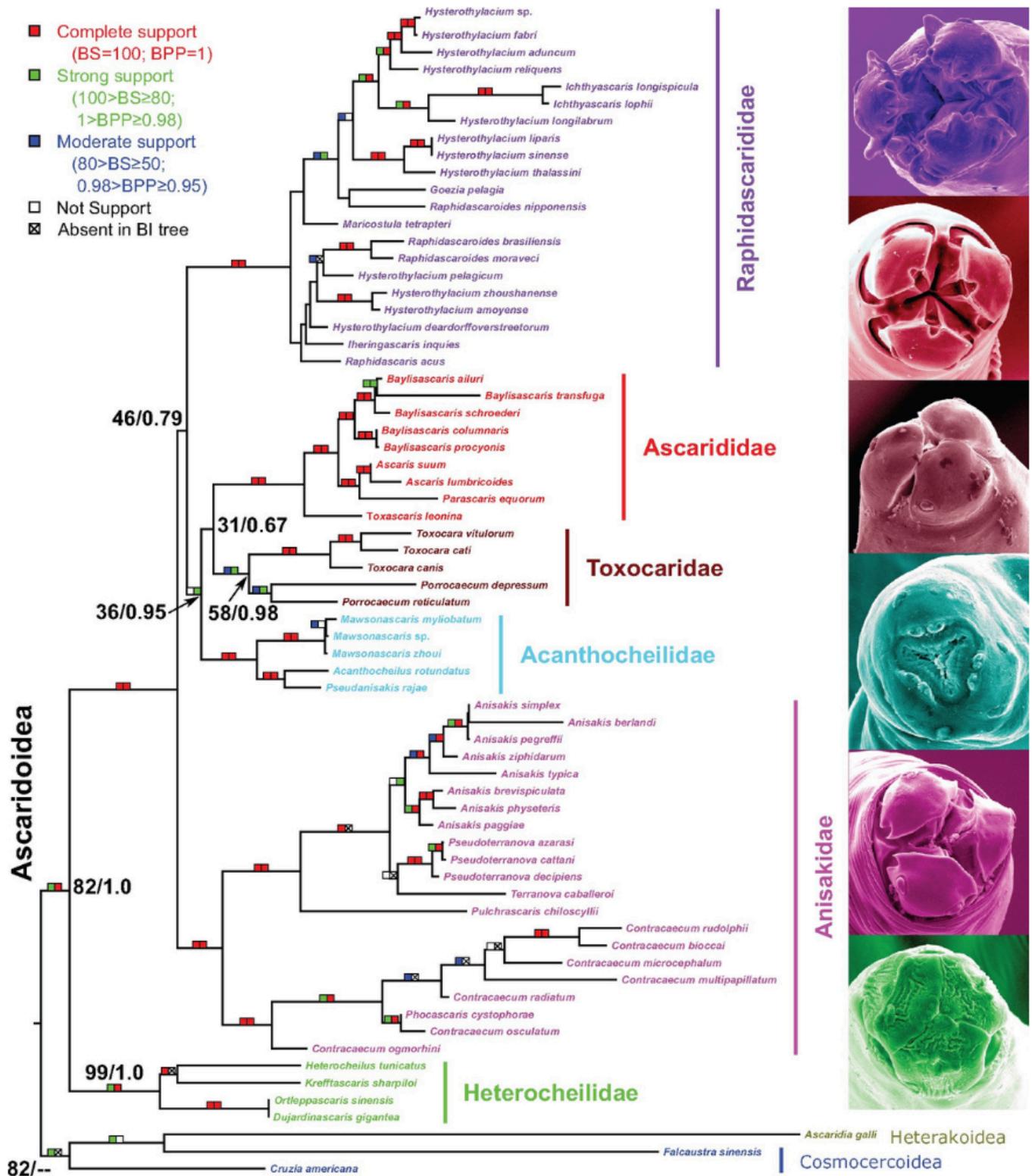
A família *Ascarididae* foi responsável pelo parasitismo da maioria das linhagens de vertebrados e apresenta mais de 800 espécies e, durante bastante tempo, foi difícil determinar sua origem evolutiva (Han *et al.*, 2022). Considerando que a abordagem multidisciplinar é a melhor forma de se obter informações sobre o *Ascaris* e a ascaridíase, é fundamental comentar que a evolução nos métodos de análise paleoparasitológicos e na paleogenética foram essenciais para a construção das árvores filogenéticas (LOREILLE, BOUCHET, 2003). Elas permitiram, por exemplo, o levantamento das hipóteses a respeito da evolução de *A. lumbricoides* e *A. suum* e se os dois eram da mesma espécie. Foi investigado se o primeiro hospedeiro do *Ascaris* foi humano ou porcino e a hipótese mais plausível é que tenha sido humano. Também foi analisado que a separação entre *A. lumbricoides* e *A. suum* é muito recente para permitir uma separação precisa das duas linhagens. Além disso, o estudo do aDNA também foi responsável por auxiliar os aspectos evolutivos do *Ascaris*, pois permitiu análises de amostras antigas com sensibilidade e especificidade não encontradas em outros métodos paleoparasitológicos (LOREILLE, BOUCHET, 2003; LOREILLE *et al.*, 2001).

O estudo do DNA mitocondrial permitiu a análise e a realização de uma classificação taxonômica da diversa família *Ascarididae*, como executado por Li *et al.* (2018) e Han *et al.* (2022), demonstrado nas **Figuras 13 e 14**. O genoma mitocondrial é abundante na célula e é herdado apenas da mãe. A combinação e o rearranjo genéticos são raros no DNA mitocondrial (mtDNA) e, quando existentes, geralmente não são espécie-específicas. Por essa razão, ele é uma opção adequada para auxiliar na diferenciação de espécies (HAN *et al.*, 2022). Assim, nos últimos anos, tem-se utilizado o mtDNA para a construção filogenética de diversas classes (ZHOU *et al.*, 2020b). A principal diferença entre as duas árvores filogenéticas é que a realizada por Li *et al.* (2018) foi construída com uso de genes nucleares, além dos mitocondriais utilizados por Han *et al.* (2022), fazendo com que a análise seja mais completa e possivelmente mais precisa.

A primeira associação entre a divergência de sequência mitocondrial e o tempo evolutivo foi publicada por Brown, George, Wilson (1979) e aplicada para a classe *mammalia*, utilizando o modelo de relógio molecular. Em 1993, Lynch e Jarrel publicaram um artigo que utilizou uma adaptação do método de relógio molecular para outras classes, desde que houvesse linearidade nos dados. O método de relógio molecular foi proposto por Zuckerkandl, Pauling (1965) e consiste na relação entre a taxa evolutiva e o tempo, assumindo que a taxa de evolução molecular é constante entre as espécies nos modelos mais simplificados. Isso permite o uso de análises filogenéticas para estimar escalas de tempo evolutivas e demográficas (VAN DER WAL, HO, 2019).

Todavia, a maioria dos estudos de construção da árvore filogenética do *A. lumbricoides* e de outros seres vivos utilizou apenas genes mitocondriais isolados como marcadores moleculares. E realizar estudos de evolução molecular baseados apenas em determinadas sequências mitocondriais provavelmente trará imprecisão na construção da árvore filogenética. Isso, pois, a análise não inclui a evolução convergente de pares de bases ou a substituição não independente entre *loci*, resultando em conflitos de árvores genéticas e dificuldade na interpretação de resultados (HAN *et al.*, 2022; ZHOU *et al.*, 2020b). Por outro lado, a investigação filogenética baseada no genoma mitocondrial completo é mais confiável, e, com o desenvolvimento da tecnologia de sequenciamento do genoma, é possível a resolução desses conflitos de árvores filogenéticas (HAN *et al.*, 2022).

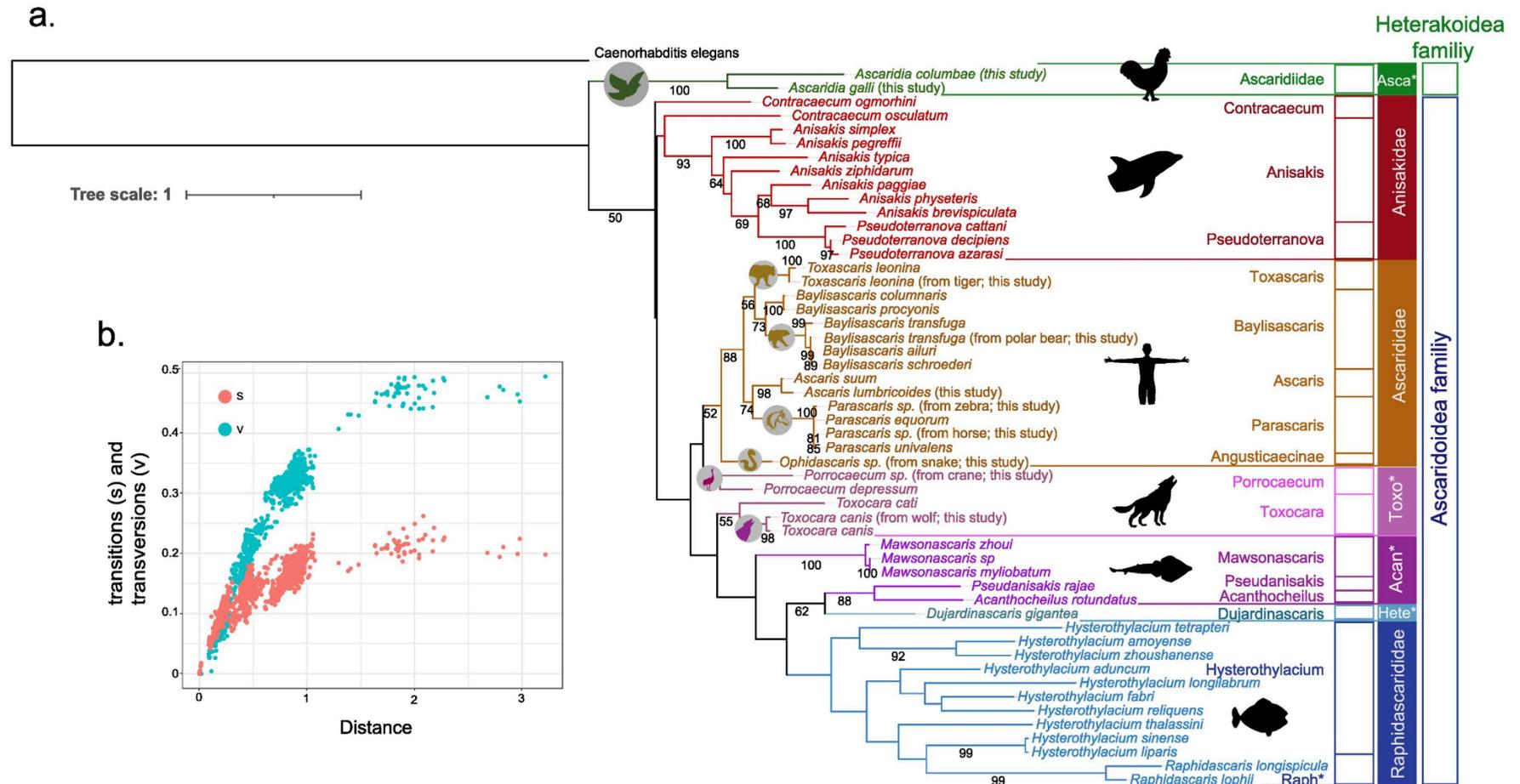
Figura 13: Relações filogenéticas da superfamília *Ascaridoidea* em 2018



Essas relações foram inferidas a partir da máxima verossimilhança e de análises Bayesianas das sequências de DNA de cinco genes nucleares e de três genes mitocondriais: ITS-1, ITS-2, 5.8S, 28S, 18S, COX1, COX2 e 12S representando dois *loci*.

Fonte: LI *et al* (2018)

Figura 14: Relações filogenéticas da superfamília *Ascaridoidea* em 2022



(a) Árvore filogenética de todas as amostras inferidas a partir de seqüências de DNA da COX2, com *C. elegans* como grupo externo; (b) As transições (s) e transversões (v) para o genoma mitocondrial completo e cada gene codificador de proteína versus a distância genética entre pares analisada pelo modelo geral reversível no tempo (GTR, do inglês *General Time Reversible*)

Fonte: HAN *et al* (2022)

Devido ao estudo genômico do Gênero *Ascaris*, observou-se que as espécies *Ascaris lumbricoides* e *Ascaris suum* são muito semelhantes geneticamente. Desse modo, surgiram algumas hipóteses a respeito desses helmintos, como aquela que considera *A. lumbricoides* e *A. suum* como parasitas da mesma espécie. Entretanto, a evolução dos métodos de análise genômica e o uso dos métodos de sequenciamento de última geração permitiu a pesquisa de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) e de marcadores moleculares do parasito aliados aos estudos do mtDNA, auxiliando no entendimento da especiação do *Ascaris* (DESLYPER *et al.*, 2020).

A caracterização desses parasitos e seus híbridos é de extrema relevância devido a suas implicações na transmissão de parasitas, no potencial zoonótico e no estabelecimento de programas de controle (CAVALLERO *et al.*, 2013). O marcador molecular ITS (*Ribosomal Internal Transcribed Spacer*) é o mais utilizado para distinguir *A. lumbricoides*, *A. suum* e a forma híbrida dos dois táxons. O ITS tipo G1 está presente no *A. lumbricoides*, o tipo G3 está presente no *A. suum* e o tipo G2 está presente nos híbridos dessas duas espécies (CAVALLERO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2020b). Em relação ao DNA mitocondrial, é bastante utilizada a análise do DNA de COX 1 e/ou COX 2 (Ciclooxigenase 1 e/ou 2). Com base no estudo das COXs foi visto que o mtDNA do *A. lumbricoides* é majoritariamente do tipo H9, enquanto o do *A. suum* é dos tipos P1 e P5. Além disso, observou-se que sequências mitocondriais P9 e H9 eram idênticas nos híbridos, mostrando a importância da análise genômica aliada ao uso de ferramentas moleculares (CAVALLERO *et al.*, 2013; EASTON *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2018; ZHOU *et al.*, 2020b). Em seu estudo, Cavallero *et al.* (2013) observou que uma porcentagem elevada de híbridos foi encontrada em amostras de humanos e de porcos, inferindo que há fluxo genético entre os dois. Dessa forma, ele concluiu que *A. suum* pode funcionar como agente relevante de ascaridíase humana em áreas não endêmicas.

Baseado nas evidências atuais, é possível afirmar que *A. lumbricoides* e *A. suum* são provavelmente de espécies distintas e que sofreram um processo de hibridização ao longo do tempo (EASTON *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2020a). É provável que o movimento histórico dos humanos e dos seus rebanhos seja responsável pelo transporte de *Ascaris* entre localidades. Tal fato permitiu extensos

cruzamentos, como mostrado pelos genomas nucleares, e resultou na discordância entre os genomas mitocondriais e nucleares (EASTON et al., 2020).

Esses híbridos são distintos das duas espécies e existem relatos de ascaridíase em humanos causadas por eles. Isso é de extrema importância para melhor compreensão da patogênese e da resposta do hospedeiro a esse helminto, além de oferecer uma possível justificativa e solução para a crescente resistência aos anti-helmínticos. Todavia, mais estudos genômicos são necessários, pois a montagem cromossômica de *Ascaris* ainda não está completa, e novas descobertas podem alterar o rumo dos estudos realizados atualmente. (DESLYPER et al., 2020; EASTON et al., 2020; ZHOU et al., 2020a).

5.2 RESPOSTA IMUNOLÓGICA DO HOSPEDEIRO

Em relação aos sintomas apresentados, a ascaridíase pode ser dividida em duas fases. A fase inicial, chamada de larval ou aguda, se caracteriza pela sua relação com a migração larval nas primeiras semanas de infecção, marcada por uma resposta inflamatória acentuada. A segunda fase, também conhecida como crônica, é definida por uma infecção de longo prazo que diversas vezes tem como consequência o acúmulo desse verme nos órgãos (GUIMARÃES, 2021). As alterações estruturais na parede intestinal durante a ascaridíase se caracterizam por hipertrofia da musculatura lisa, diminuição da profundidade das criptas intestinais e pela presença de hiperemia e hemorragias pontuais (BARKHATOVA et al., 2022). O acúmulo de *A. lumbricoides* no intestino e outros órgãos pode causar obstrução e levar a quadros que cursam com desenvolvimento de volvulus (torção ou nó do trato gastrointestinal) e intussuscepção (parte do intestino sofre uma invaginação). Outros sintomas comuns são a distensão e dor abdominal, cólica, náusea e diarreia.

Na maior parte das vezes, o helminto adulto está localizado no duodeno ou no jejuno proximal, mas ele é capaz de migrar e atingir outros locais, observável pelos danos causados no fígado, no pâncreas, nas vias biliares e nas vias aéreas superiores e inferiores (BARKHATOVA et al., 2022; WEATHERHEAD et al., 2020). O verme pode migrar através da papila duodenal maior e entrar na vesícula biliar pelo ducto cístico, além de migrar para os ductos pancreáticos. Devido à preferência do *Ascaris* por um ambiente alcalino e pelo fato dos ductos serem estreitos, essa é uma

complicação relativamente rara, embora em áreas endêmicas a ascaridíase seja uma importante causa de pancreatite (BARKHATOVA *et al.*, 2022).

Inúmeros sintomas, entretanto, estão relacionados à resposta imunológica que o *Ascaris* causa, como aqueles causados pela Síndrome de Löffler, advindos de uma exacerbada resposta imunológica local, como ocorre frequentemente nos pulmões. Além disso, o helminto secreta produtos solúveis ou vesículas extracelulares contendo substâncias danosas e imunomoduladoras, como proteases e seus inibidores, enzimas glicolíticas, alérgenos e lectinas, que podem ter ação parácrina ou endócrina. (GUIMARÃES, 2021; VACCA, LE GROS, 2022; WEATHERHEAD *et al.*, 2020).

O conhecimento do transcriptoma revolucionou os estudos parasitológicos, pois permitiu o conhecimento mais aprofundado do desenvolvimento do organismo, das interações parasita-hospedeiro e das respostas do hospedeiro à infecção. A hibridização por microarranjos foi uma das técnicas mais utilizadas para traçar o perfil de expressão gênica, com o uso de sondas de sequências genéticas conhecidas. Ela ofereceu dados sobre a expressão gênica nas diferentes etapas do ciclo de vida dos parasitas e sobre as respostas das células hospedeiras à infecção. Todavia, o surgimento do RNA-seq permitiu uma maior sensibilidade da análise da expressão gênica, além de fornecer o perfil de expressão ao nível genômico e não apenas molecular. Atualmente, há um tipo de sequenciamento ainda mais completo, o Sequenciamento de RNA de Células Únicas (scRNA-seq), que fornece detalhes sobre a expressão de uma célula no momento em que ela é analisada. Contudo, essa técnica ainda não foi muito utilizada para estudos em *Ascaris* e poderia contribuir para uma maior compreensão da resposta imunológica a esse helminto. (BRITTON *et al.*, 2023)

Os estudos realizados para análise da resposta imunológica do hospedeiro utilizaram variadas ferramentas metodológicas, moléculas e genes alvos. Alguns dos estudos usaram os alérgenos mais vistos na ascaridíase, outros buscaram receptores de interleucinas e seus genes relacionados, em busca de uma associação com a resposta imune do tipo Th2. A maioria dos resultados foi de uma associação significativa entre a molécula ou gene estudado e o aumento de interleucinas Th2 (IL-5 e IL-13) e IgE específicas do *A. lumbricoides* (CARABALLO, ACEVEDO, 2019; CARABALLO, CORONADO, 2018; CARABALLO,

LLINÁS-CABALLERO, 2023; CARNEIRO *et al.*, 2021; MOHD-SHAHARUDDIN *et al.*, 2021).

Foi observado, ainda, que a resposta Th2 era maior nos indivíduos com menor intensidade da infecção enquanto era menor em indivíduos com infecção mais intensa, sugerindo que esse tipo de resposta protege o hospedeiro da ascaridíase. Em síntese, demonstrou-se que os parasitas desenvolveram adaptações moleculares que manipulam, inibem ou ativam diferentes células e/ou vias de sinalização imunológicas do hospedeiro para maximizar o sucesso do seu parasitismo. É válido pontuar que esses estudos só puderam ser executados e chegaram a tais conclusões devido à evolução dos métodos de sequenciamento e aos mais recentes rascunhos do genoma do *Ascaris* (CARABALLO, ACEVEDO, 2019; CARABALLO, CORONADO, 2018; CARABALLO, LLINÁS-CABALLERO, 2023; CARNEIRO *et al.*, 2021; MOHD-SHAHARUDDIN *et al.*, 2021).

Os alérgenos são moléculas resultantes da resposta Th2/IgE no hospedeiro (**Tabela 11**), sendo os alérgenos do *A. lumbricoides* listados pela OMS as seguintes poliproteínas: Asc 1 (ABA-1), Asc I 3 (tropomiosina) e Asc I 13 (glutathione-S-transferase). A ABA-1, proteína ligante de ácidos graxos, foi primariamente identificada no *A. suum*, mas hoje sabe-se que está presente em ambas as espécies. Ela está relacionada à proteção do hospedeiro contra esse parasita, e é considerada um marcador espécie-específico para infecções decorrentes de nematódeos. A tropomiosina é a proteína mais abundante nos helmintos e é um dos alérgenos mais característicos do *A. lumbricoides*, pois pode induzir degranulação de mastócitos e liberação de histamina em basófilos. Em relação a glutathione-S-transferase, o *Ascaris* apresenta muitas isoformas, mas a isoforma considerada alergênica é a sigma (Asc I 13). A sua frequência e reatividade na população geral é baixa, embora ela possa ser particularmente importante nos primeiros anos de vida do ser humano, quando a imunidade contra esse parasita começa a se desenvolver. Além disso, a Asc 1 13 pode ser clinicamente relevante em casos de sensibilização por ácaros (CARABALLO, LLINÁS-CABALLERO, 2023; CARABALLO, CORONADO, 2018).

Entretanto, o estudo de Caraballo (2023) demonstra que, apesar de serem considerados alérgenos (pela ligação com IgE), algumas moléculas como ABA-1 não têm testes *in vivo* que mostrem sua capacidade de desencadear o processo alérgico. É importante ressaltar que existem poucos estudos que demonstram

experimentalmente que moléculas específicas do *A. lumbricoides* desencadeiam uma resposta Th2 no hospedeiro, já que essa resposta poderia ser desencadeada por outros antígenos não específicos.

Carneiro *et al.* (2021) utilizaram Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS, do inglês *Genome Wide Association Studies*) para analisar se a resposta Th2 desencadeada pelo *Ascaris lumbricoides* estava relacionada com o gene WSB1 e o Receptor de Interleucina 21 (IL21R). O gene WSB1 está localizado no cromossomo 17 e tem papel crucial no desenvolvimento e na maturação do IL21R. Esse estudo mostrou que os dois elementos estavam associados a uma maior produção de IgE-específica do *A. lumbricoides* e podem estar relacionados ao aumento da resistência à infecção. As variantes de nucleotídeo único (SNV, do inglês *Single Nucleotide Variant*) encontradas nas respostas aumentadas de IgE ao *Ascaris* foram rs7213148 e rs8065359 para WSB1, e rs115350516 e rs3093308 para IL21R. Essas duas últimas variantes também foram associadas ao aumento de IL-5 (Interleucina 5), que tem sido associada à resistência a infecções parasitárias. Ademais, foi observado que a expressão de WSB1 era menor em indivíduos infectados por *A. lumbricoides* do que em indivíduos não infectados, provavelmente devido à regulação epigenética, como a metilação do DNA.

Tabela 11: Alérgenos e suas funções imunológicas

Alérgenos	Função imunológica associada
ABA-1 (As s 1)	Proteção do hospedeiro Marcador espécie-específico para infecções decorrentes de nematódeos
Tropomiosina (Asc I 3)	Degranulação de mastócitos e liberação de histamina em basófilos
Glutathione-S-transferase (Asc I 13)	Importante nos primeiros anos de vida Clinicamente relevante em casos de sensibilização por ácaros

Fonte: elaboração própria (2023)

5.3 DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

O desenvolvimento de vacinas eficientes contra geohelmintíases é um desafio maior se comparado com o desenvolvimento de vacinas antibacterianas e antivirais. Em parte, isso advém dos complexos ciclos de vida desses parasitos e de um conhecimento imunológico ainda incompleto sobre as interações parasita-hospedeiro (ZAWAWI, ELSE, 2020).

As primeiras vacinas anti-helmínticas foram baseadas em preparações brutas de antígeno com parasitas atenuados ou mortos por irradiação. A partir disso, extensas pesquisas sobre helmintos exploraram a imunogenicidade de moléculas excretadas e secretadas por parasitas (ZAWAWI, ELSE, 2020). Atualmente, a maioria dos estudos imunológicos e de estudos centrados no desenvolvimento de uma vacina contra a ascaridíase tem como base extratos brutos de *A. suum* e focam na resposta imune contra a ascaridíase (WONG *et al.*, 2023).

A resposta imune do hospedeiro contra o *Ascaris* tem como alvo principal a migração larval nos pulmões e o desenvolvimento larval no intestino, além de impedir o desenvolvimento de infecções crônicas por vermes adultos no intestino. A imunidade protetora é desenvolvida pela ativação da resposta Th2, com eosinófilos e macrófagos M2, da resposta sistêmica Th2/Th17 e pela produção de anticorpos IgG específicos de *Ascaris* (GUIMARÃES, 2021; ROCHA, 2022).

Com base nessa espécie, os potenciais alérgenos candidatos ao uso para a construção de vacinas de subunidades proteicas são As16, As14, As24, As37 e As-Enol. O As37 é um antígeno dominante em *A. suum* e faz parte da superfamília de imunoglobulinas (IgSF), podendo ser encontrado em músculos e na hipoderme. Devido às suas características e ao fato de ser bem conservado em outros helmintos, é o que apresenta maior potencial, pois pode estar envolvido na criação de uma vacina pan-helmíntica (WONG *et al.*, 2023).

5.3.1 Construção de Proteínas Quiméricas

De Castro *et al.* (2021) realizou a construção de uma proteína quimérica formada pelos alérgenos As37, As16 e As14, pois vacinas multivalentes são uma boa estratégia para alcançar uma melhor imunização e essas três proteínas têm sido relatadas como as mais promissoras para essa finalidade. Nesse estudo, foram utilizados camundongos BALB/c e a imunização foi realizada com três doses, com intervalo de 10 dias entre as doses, por via subcutânea. Além disso, foram

aplicadas três diferentes formulações nos camundongos: apenas a proteína quimérica, a proteína quimérica com uso de monofosforil lipídio A (MPLA) como adjuvante e apenas o MPLA. Seus resultados mostraram um aumento de IgG e da imunidade protetora contra *A. suum* quando utilizada a proteína quimérica com adição de MPLA, com redução de 73% das larvas nos pulmões. Isso foi observado, além da análise imunológica, pela redução da inflamação e do espessamento do septo alveolar. Porém, não houve redução do infiltrado inflamatório decorrente da migração larval desse parasita nos pulmões.

Em um estudo mais recente, Castro *et al.* (2023) utiliza a mesma proteína quimérica, mas de forma oral, a fim de obter uma resposta sistêmica e também local nas mucosas. Foi observado, assim, uma biodisponibilidade de 63% da proteína após digestão gástrica e intestinal e uma redução larval de 66,2% após a infecção por *Ascaris suum*. O principal desafio dessa formulação é a indução de tolerância aos antígenos orais, pois pode haver deleção clonal de células T e supressão imunológica.

Em sua pesquisa, Guimarães (2021) também utilizou uma proteína quimérica para investigar uma possível vacina para *A. lumbricoides*. Primeiro, foi utilizado uma seleção de epítomos de célula B por *pipeline* da bioinformática e houve um total de 480 epítomos selecionados, considerando os maiores scores de predição. Na segunda etapa, utilizou-se immunoblotting para testar os peptídeos previamente selecionados quanto à reatividade específica. Para tal, foi usado soro de camundongos como controle negativo, soro de camundongos imunizados com antígenos de *Ascaris sp.* e soro de camundongos infectados três vezes com ovos de *Ascaris sp.* (hiperimunes). Posteriormente, foram selecionados 35 peptídeos após análise de especificidade e reatividade a IgG e IgE, com exclusão daqueles com baixa ou nenhuma reatividade, e foram selecionados 10 peptídeos altamente específicos anti-*A. suum*. Foram construídas duas proteínas quiméricas, a ASCVac-1, formada pelos 35 primeiros peptídeos, e a ASCVac-2, formada pelos 10 últimos peptídeos selecionados. O protocolo de imunização com essas duas proteínas está exposto na **Figura 15**.

O grupo de camundongos BALB/c foi imunizado com três doses de uma das vacinas mais o adjuvante (MPLA), havendo crescimento gradual e significativo na produção de IgG vacina-específico para ASCVac-1 e ASCVac-2. Além disso, foi avaliada a recuperação de larvas no lavado broncoalveolar (BAL, do inglês

Bronchoalveolar Lavage) e no tecido pulmonar após 8 dias de infecção. Em comparação feita com os grupos controle PBS e MPLA, foi visto que apenas os animais imunizados com ASCVac-1+MPLA apresentaram redução significativa no número de larvas no BAL e nos tecidos pulmonares (50,15% em comparação com o PBS e 33,7% em comparação com o MPLA). A autora também avaliou a participação das subclasses de IgG, IgE e IgA em todos os grupos e relacionou com a resposta protetora encontrada no grupo dos animais vacinados com ASCVac-1+MPLA (Guimarães, 2021).

Devido à evolução dos estudos genômicos, tornou-se mais fácil fazer a seleção de possíveis candidatos a vacinas por meio da técnica de vacinologia reversa. Ela consiste na combinação de informações genômicas e ferramentas de bioinformática para identificar possíveis vacinas a partir de proteomas previstos, avaliando se as proteínas possuem características úteis ou não. Ela já foi aplicada com sucesso a outros nematóides, como *Toxocara canis* e *Trichuris muris*. Essa técnica é muito útil, pois apresenta baixo custo e é relativamente rápida (EVANGELISTA *et al.*, 2022).

5.3.2 Construção de Proteínas Multi-epítotos

Evangelista *et al.* (2023) projetou em seu trabalho a criação e análise imunológica de uma proteína multi-epítotos potencial para o desenvolvimento de uma vacina contra a ascaridíase. Para isso, sete sequências de aminoácidos de proteínas de *Ascaris* foram recuperadas do banco de dados WormBase. Quatro dessas proteínas são altamente expressas em vermes adultos (ATtype, APiezo, ALtype e Aproto) e três dessas proteínas são expressas em estágios larvais e adultos (As37, As16 e As14). Elas foram selecionadas com base em análises recentes de bioinformática e ensaios de imunização anteriores.

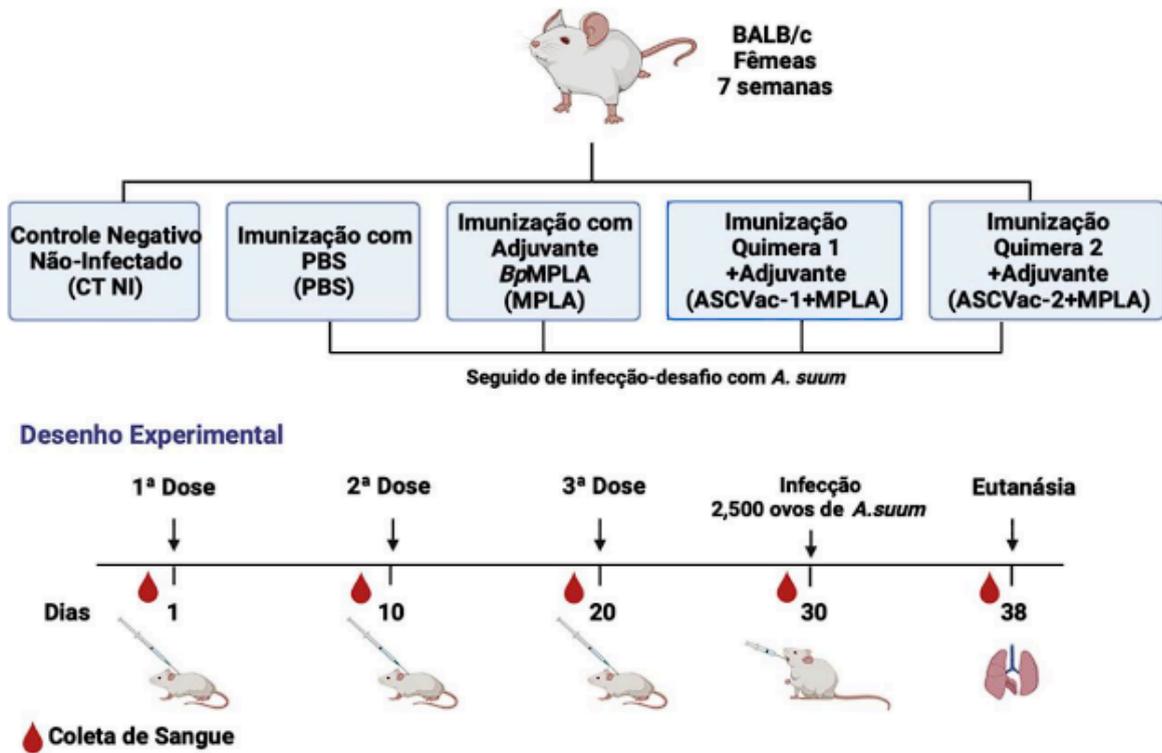
Os epítotos de células B e Th são bem descritos para AProto, ATtype, ALtype e APiezo, então eles selecionaram dois epítotos B e dois Th para As37, As16 e As14 com base nos resultados do Bepipred 2.0 e do IEDB (*Immune Epitope Database*), ferramentas preditivas de epítotos B e T. As proteínas selecionadas estavam presentes nos proteomas tanto de *A. lumbricoides* quanto de *A. suum*, e isso é importante devido aos casos de infecção cruzada. Como os epítotos não causam uma resposta imunológica por si próprios, é necessária a seleção dos seus

ligantes. Eles devem melhorar o processamento e a apresentação do antígeno, além de fornecer a rigidez estrutural e a flexibilidade exigidas pela vacina. A **Figura 16** resume as etapas de construção desse polipeptídeo multi-epítipo.

A simulação imunológica sugeriu o desenvolvimento de uma resposta imune favorável após a imunização por via intramuscular. O cenário de três doses teve o título de anticorpos mais elevado do que o de duas doses, apesar de um aumento semelhante nas populações de células B e Th. Adicionalmente, a estimulação de IL-4 e IL-10 apresentou um pico menor após o segundo reforço no cenário de aplicação de três doses. O aumento previsto na produção de IgG é desejável para a ascaridíase, pois está associado à redução de larvas e à proteção contra a infecção. Essa simulação imunológica corrobora os dados da análise de epítomos de indução de produção de IL-4, IL-10 e IgG. Desse modo, essa vacina pode ser usada como modelo para testes *in vitro* e *in vivo* que forneçam compreensão da capacidade da vacina de estimular uma resposta imunitária adequada.

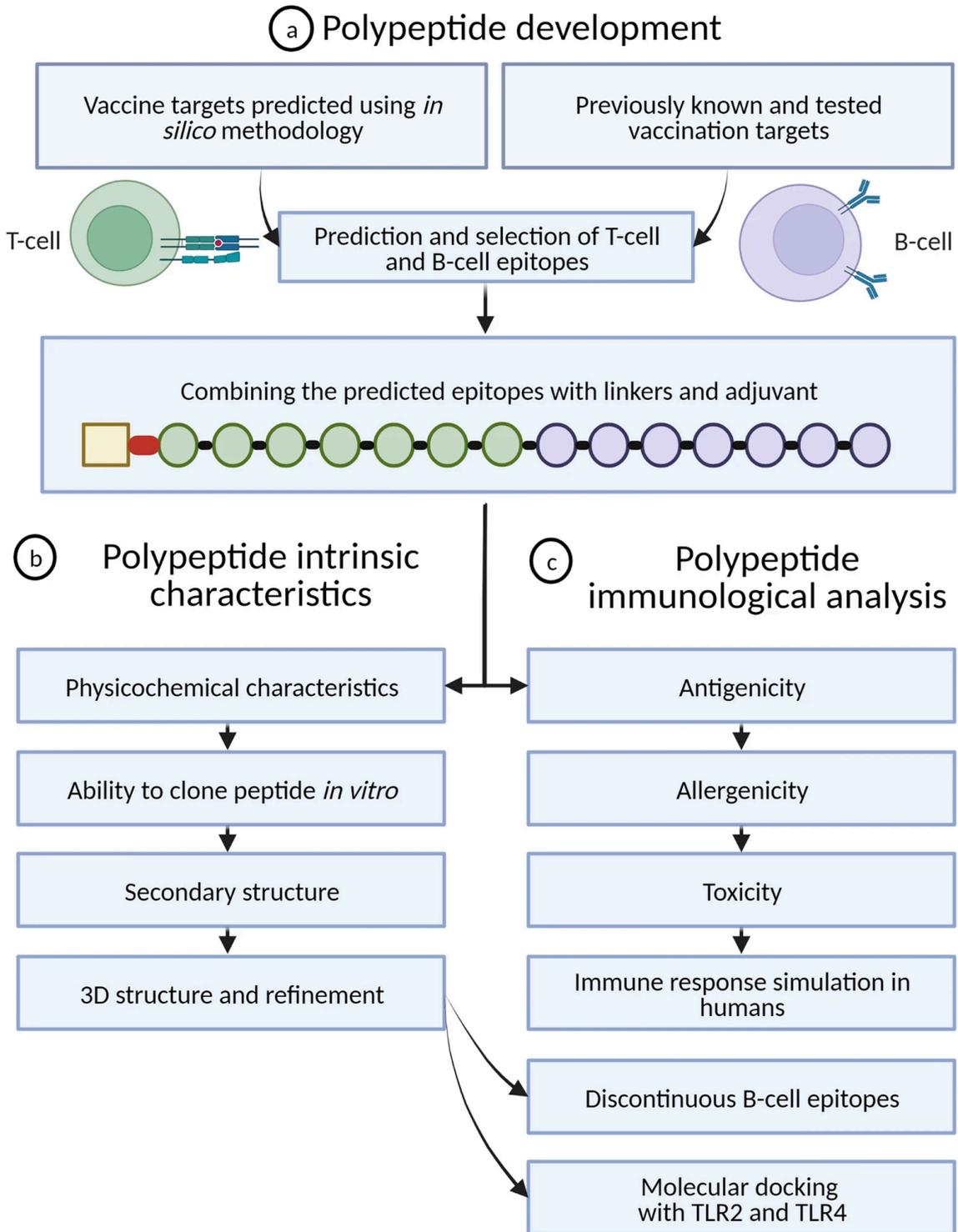
Com a análise desses estudos utilizando proteínas quiméricas e multi-peptídeos para obter imunização protetora contra *Ascaris lumbricoides*, pode-se afirmar que essas são metodologias promissoras para a construção de uma vacina para ascaridíase, especialmente se utilizadas de forma conjunta. Contudo, sua maior limitação é o uso de camundongos, pois o *Ascaris* não finaliza seu ciclo de vida nesse hospedeiro, então não se sabe os efeitos das vacinas na fase adulta (EVANGELISTA *et al.*, 2023).

Figura 15: Delineamento experimental do protocolo de imunização com ASCVac-1 e ASCVac-2



Fonte: GUIMARÃES (2021)

Figura 16: Resumo do fluxo de trabalho da abordagem usada para projetar e analisar o polipeptídeo multi-epítipo



(a) Etapas de desenvolvimento de polipeptídeos, incluindo seleção de alvos de vacina e respectivos epítomos de células T e B. (b) Etapas da análise das características intrínsecas do polipeptídeo. (c) Componentes da análise imunológica.

Fonte: Evangelista *et al* (2023)

5.4 NOVOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Os principais métodos diagnósticos atuais para *Ascaris lumbricoides* são baseados na identificação de ovos presentes nas fezes do indivíduo infectado, sendo Kato-Katz o método mais recomendado pela OMS. Porém, esses métodos, apesar de úteis, apresentam algumas limitações e desvantagens, citadas na **tabela 02** (LAGATIE *et al.*, 2020b; DE ALMEIDA LOPES, 2018). Desse modo, é necessária a criação de métodos mais sensíveis, específicos e que permitam identificação massiva de ovos desse ascarídeo, pois isso é importante em áreas com altas taxas de reinfecção após administração de QP (OYEYEMI, OKUNLOLA, 2023). Nesse contexto, a criação de métodos imunodiagnósticos é uma alternativa interessante para a resolução dessa problemática.

Atualmente, os métodos imunodiagnósticos mais utilizados são o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e o immunoblotting, no qual o anticorpo primário reage com um epítipo específico presente na proteína alvo e depois há a reação com o anticorpo secundário conjugado com uma enzima. A detecção por colorimetria do produto da reação catalisada permite a quantificação do antígeno (DE ALMEIDA LOPES, 2018). Com eles, podem ser detectados antígenos parasitários, anticorpos específicos e imunocomplexos em amostras de fezes, soro, lavado broncoalveolar e saliva. Entretanto, esses métodos apresentam suas limitações, como a reatividade cruzada com outros parasitos (DE ALMEIDA LOPES, 2018). Um dos novos métodos imunológicos que estão sendo desenvolvidos é a análise de coproantígenos em amostras de fezes. Ele já é um método amplamente utilizado na medicina veterinária e também já foi investigado em humanos para outros parasitas como *Strongyloides stercoralis* e *Taenia solium* (LAGATIE *et al.*, 2020b).

Em seus estudos, Lagatie *et al.* (2020b) tentou adaptar o teste de ELISA para pesquisa de ABA-1 nas fezes, demonstrando no exame qualitativo uma especificidade de 95,3% e uma sensibilidade de 91,5% para detecção *A. lumbricoides*. A análise quantitativa também foi realizada, buscando diferenciar infecções leves, moderadas e intensas, mas apenas 68,4% dos indivíduos com infecção moderada/alta foram identificados corretamente. Eles também analisaram fezes de pacientes tratados com albendazol e observaram que os níveis de ABA-1 são diretamente proporcionais à quantidade de ovos encontrados nas fezes, embora

não tenham zerado ao fim do tratamento. Isso pode acontecer devido a outras infecções ou vestígios de ABA-1 remanescentes no intestino. Adicionalmente, porcos infectados com *A. suum* foram analisados e verificou-se que no dia 42 da infecção eles começaram a expelir ovos nas fezes e também foi identificada a presença de ABA-1. Possivelmente a ABA-1 está associada aos ovos ou fragmentos desses ovos, sendo necessárias mais pesquisas para confirmar essa hipótese. A maior vantagem da utilização desse teste seria para a testagem de ascaridíase no próprio local de coleta.

Outra pesquisa de um possível método imunológico foi realizada por De Almeida Lopes (2018) na qual anticorpos IgY (Imunoglobulina Y) anti-*A. suum* foram produzidos, fracionados, purificados, caracterizados e aplicados no teste diagnóstico pela análise de imunocomplexos circulantes. O método de identificação desse anticorpo para a confirmar a presença de *Ascaris sp.* foi o ELISA sanduíche. Os anticorpos IgY estão presentes na gema do ovo de galinha e são os únicos anticorpos presentes nesse local. Eles são obtidos de forma clonal quando os ovos são imunizados com diferentes tipos de antígenos. Diferente da IgG, esses anticorpos não são invasivos, não ativam o sistema complemento nem os fatores reumatóides dos mamíferos, e apresentam alta rentabilidade. Além disso, foi analisada a reatividade cruzada com *Ancylostoma ceylanicum* e *S. venezuelensis* e não foi evidenciada atividade da IgY. Assim, são promissores para utilização em humanos, pois irá apresentar menos resultados falso-positivos que o uso de IgG. De fato, houve uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 90%, embora o teste tenha sido falso-positivo em 6 dos 30 casos analisados. Portanto, é um método com muitas vantagens e necessita de maiores estudos para ser padronizado e avaliado em função de sua aplicabilidade em laboratório e em campo.

Métodos não imunológicos também estão sendo pesquisados, um exemplo é a análise da presença de 2-Methyl-pentanol-carnitina (2-MPC) na urina como um potencial biomarcador para infecção por *A. lumbricoides*. Essa pesquisa foi realizada porque o 2-MPC é uma forma do hospedeiro humano excretar o ácido graxo 2-metilpentanoato. Essa molécula é descrita como um dos metabólitos finais do metabolismo de carboidrato do *Ascaris*, como mostrado na **Figura 17**. O 2-MPC não foi encontrado em outras infecções helmínticas (*T. trichiura* e *S. mansoni*), teve sua produção aumentada em infecções por *Ascaris* mais severas e apresentou baixos níveis em pessoas tratadas com Albendazol após o diagnóstico de ascaridíase. Por

essas razões, pode ser um marcador promissor para detecção de *Ascaris* de forma mais simples e rápida. Mas não se pode excluir a possibilidade de que o 2-MPC esteja naturalmente presente na urina de indivíduos não infectados, podendo ser produzido por algumas bactérias intestinais. Desse modo, mais estudos são necessários para confirmar a eficácia de utilização desse marcador urinário no diagnóstico de *Ascaris lumbricoides* (LAGATIE *et al.*, 2020a).

O diagnóstico de *A. lumbricoides* também é utilizado na paleoparasitologia e tem como finalidade a identificação desse parasita em amostras ancestrais. Essa identificação era realizada por métodos coproscópicos até a descoberta e utilização do aDNA, havendo um número expressivo de falsos negativos, pois muitas vezes os ovos haviam sido destruídos e não podiam ser detectados (TAMS *et al.*, 2018; ZHAN *et al.*, 2019; ROCHE *et al.*, 2021). Desta maneira, o aDNA permitiu a determinação da positividade das amostras na ausência de ovos e de quais parasitas estavam presentes nas amostras. Isso é muito útil porque os ovos têm uma longa durabilidade no solo, protegendo relativamente bem o DNA presente no local (TAMS *et al.*, 2018).

Outro estudo sobre novos métodos diagnósticos para parasitas intestinais transmitidos pelo solo examinou se a técnica de imagens microscópicas baseadas em smartphones era capaz de detectar a presença de *A. lumbricoides* nas fezes. Essa tecnologia se beneficiou do uso de LEDs de baixa potência e lentes de câmera de alta qualidade, o que permite a produção de imagens de diagnóstico de alta resolução e alta qualidade. A microscopia baseada em smartphone tem a capacidade de detectar características morfológicas como forma, tamanho, cor e brilho, podendo ser usadas como marcadores para identificação de DNA, patógenos, células sanguíneas e células cancerígenas. Para a identificação de *A. lumbricoides* foram captadas imagens nas amostras fecais contendo ovos com o uso de lentes invertidas de câmeras de smartphones para imagens de microscopia de campo claro (PAWAR *et al.*, 2023). O sistema microscópico e a foto da amostra estão exibidos na **Figura 18**. As principais vantagens desse método são o baixo custo e a portabilidade do equipamento, permitindo o diagnóstico em locais de difícil acesso. Sua maior limitação é a baixa qualidade de imagem em locais pouco iluminados (SWITZ, D'AMBROSIO, FLETCHER, 2014). Porém, essa análise foi feita com smartphones hoje considerados ultrapassados, e seria interessante uma análise

dessa tecnologia com os celulares mais recentes, já que possuem um sistema de câmera e de imagem mais complexos.

Figura 17: Via metabólica presumível do 2-MPC

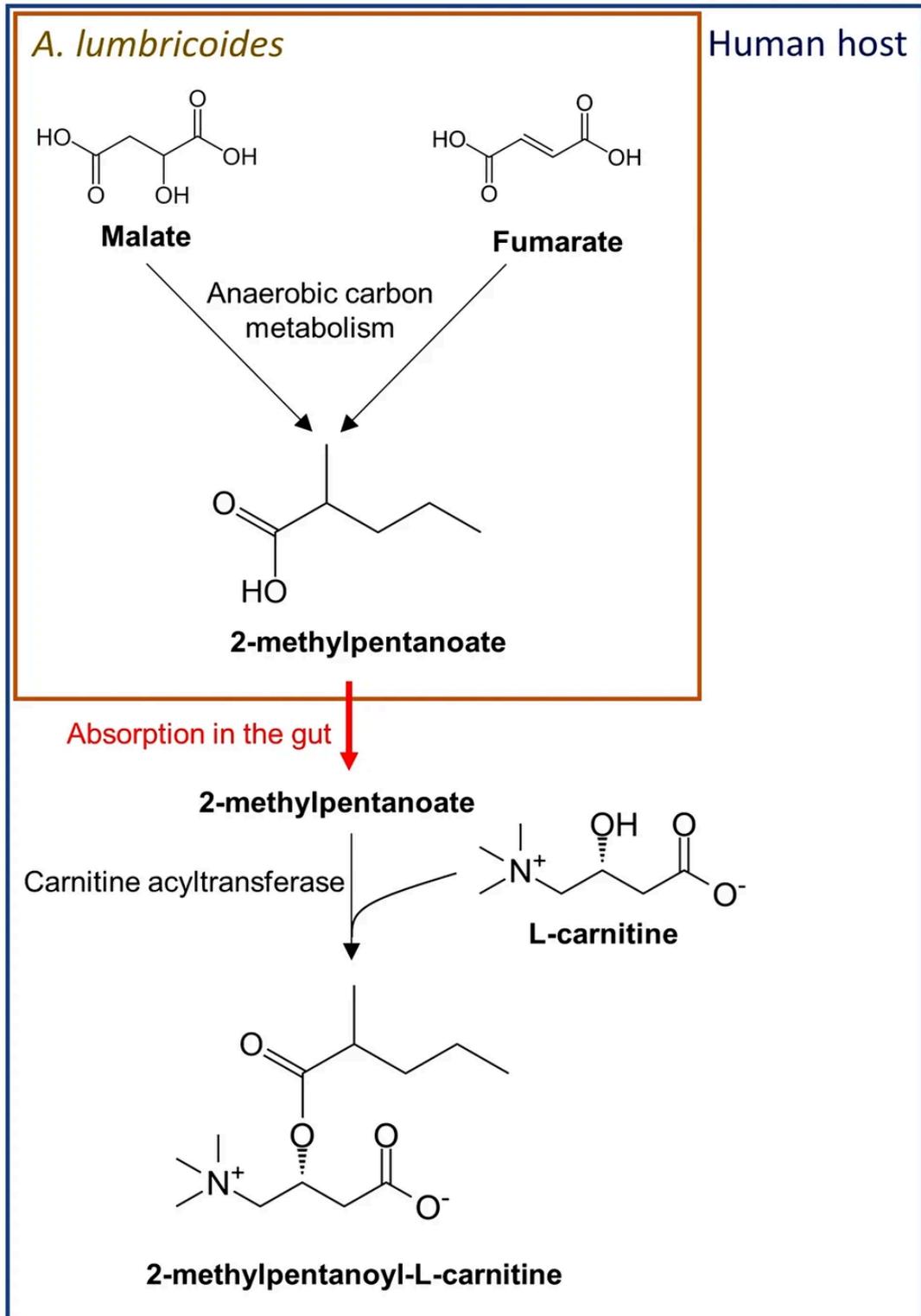
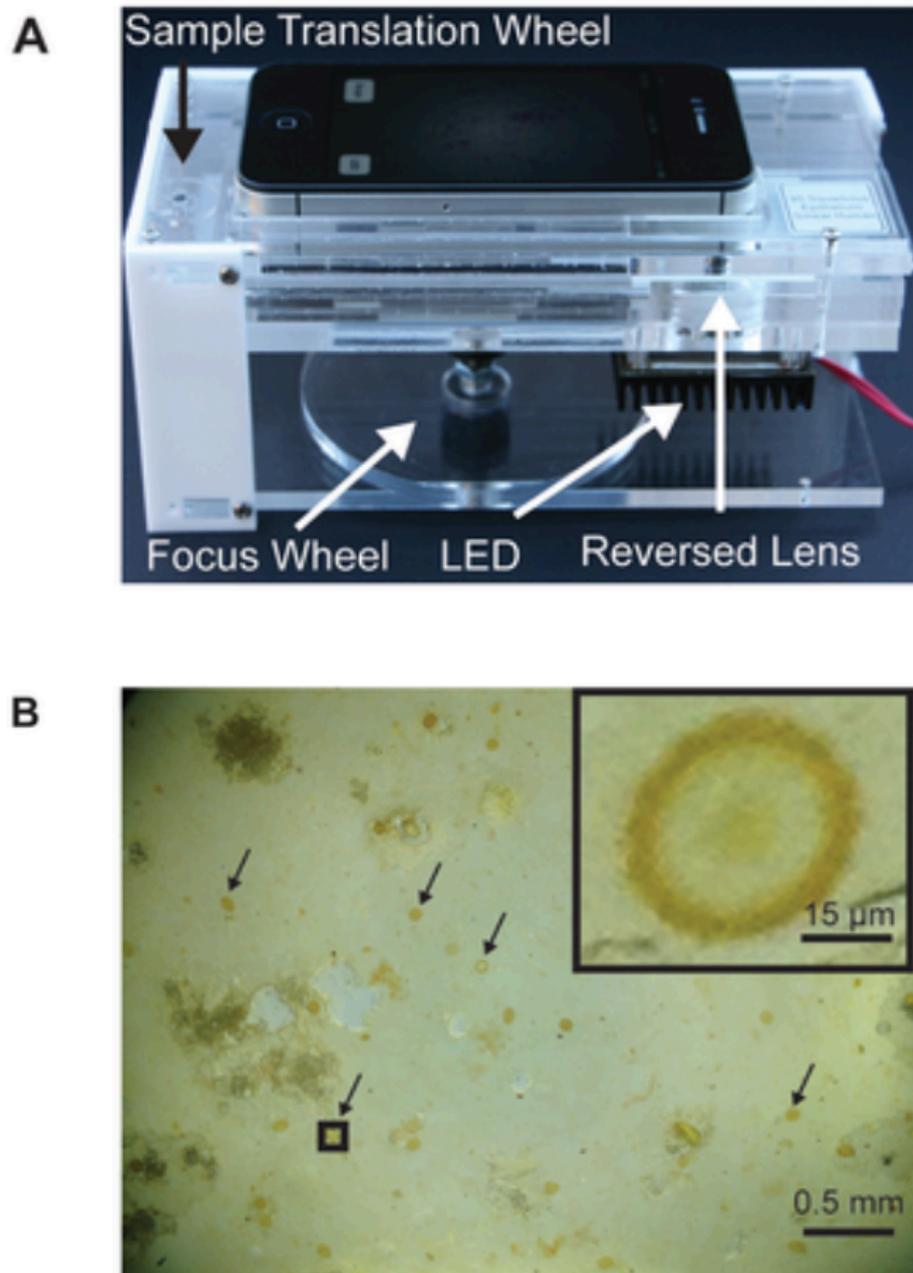


Figura 18A e 18B: Microscópio de lente invertida e amostra de fezes analisada



(A) Imagem do microscópio de lente invertida de US\$30 com iluminação LED integrada (custo exclui controle de intensidade de iluminação). O grupo de lentes invertidas do celular é encaixado em um pedaço de acrílico de 4,5 mm, e uma fonte de luz LED é posicionada abaixo da lente. (B) Imagem de uma amostra de fezes contendo ovos do helminto *Ascaris lumbricoides* obtido com modelagem de iluminação (amostra cortesia do Dr. Isaac Bogoch, Hospital Geral de Toronto). As setas indicam ovos de helmintos. A imagem ampliada de um ovo de helminto *Ascaris lumbricoides* é mostrada no canto superior direito.

Fonte: SWITZ, D'AMBROSIO, FLETCHER (2014)

7 CONCLUSÃO

O presente trabalho ressalta a importância do estudo genômico do *Ascaris* para o avanço nos conhecimentos genéticos e moleculares sobre esse gênero. Foi observado que o *Ascaris* apresenta dois genomas, um germinativo e um somático com a presença de 24 e 36 cromossomos, respectivamente, gerados a partir da eliminação programada do DNA.

Aliado à pesquisa sobre o conhecimento genômico, conseqüentemente, tem-se o estudo paleoparasitológico do aDNA. Ele permitiu análises de origens evolutivas associadas aos processos de migrações de humanos e animais, além de conhecimento sobre o surgimento, interações e desaparecimentos de populações humanas passadas. Também foi essencial para a criação e o entendimento da árvore filogenética da família *Ascarididae*, cujo entendimento continua em processo de aperfeiçoamento.

Com os avanços dos métodos de sequenciamento e de análise molecular foi possível o desenvolvimento da proteômica e da epigenética. Essas duas ferramentas foram imprescindíveis para a compreensão dos efeitos imunológicos que o *Ascaris* tem sobre seus hospedeiros. Com isso, foi possível evidenciar os principais alérgenos desse helminto e a resposta imunológica e sistêmica que eles desencadeiam. Além disso, com base nos estudos desses alérgenos foi possível realizar pesquisas sobre desenvolvimento de métodos para imunodiagnósticos e de vacinas para auxiliar no combate à ascaridíase. É válido ressaltar, ainda, a necessidade de interesse e financiamento público, especialmente em países endêmicos, a fim de que mais pesquisas para vacinas sejam realizadas. Elas podem ser feitas *in vitro* e *in vivo*, aplicando o conhecimento já disponível, incluindo o auxílio da tecnologia *in silico*.

Apesar das descobertas realizadas com base nos estudos paleoparasitológicos e genômicos, ainda existem inconsistências na construção da filogenética do *Ascaris lumbricoides*. A mais relevante delas é a incerteza de diferenciação entre as espécies *A. suum* e *A. lumbricoides*, pois foram observados muitos híbridos entre os dois e sua separação é muito recente. Portanto, mais pesquisas são necessárias para elucidar tais questionamentos.

REFERÊNCIAS

1. AKANKSHA, K. et al. Prevalence of soil-transmitted helminth infections in HIV patients: a systematic review and meta-analysis. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2023.
2. ALMEIDA, M. V.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; KETTING, R. F. Function and evolution of nematode RNAi pathways. **Non-coding RNA**, v. 5, n. 1, p. 8, 2019.
3. ARAÚJO, A. et al. PALEOPARASITOLOGY: PERSPECTIVES WITH NEW TECHNIQUES. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 40, n. 6, p. 371–376, 1998.
4. **Ascariasis**. Disponível em: <<https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/indicator-groups/indicators/indicator-details/MDB/ascariasis>>. Acesso em: 1 set. 2023.
5. BARKHATOVA, N. A. et al. Ascaris lumbricoides-induced pancreatic lesion. **Khirurgiia**, n. 7, p. 71, 2022.
6. BIRHANU, A. M. et al. Ascariasis causing small bowel obstruction in an adult female: A case report. **International journal of surgery case reports**, v. 109, n. 108486, p. 108486, 2023.
7. BRITTON, C. et al. New technologies to study helminth development and host-parasite interactions. **International journal for parasitology**, v. 53, n. 8, p. 393–403, 2023.
8. BRITTON, C.; LAING, R.; DEVANEY, E. Small RNAs in parasitic nematodes – forms and functions. **Parasitology**, v. 147, n. 8, p. 855–864, 2020.
9. BROWN, W. M.; GEORGE, M., Jr; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 4, p. 1967–1971, 1979.
10. CARABALLO, L.; ACEVEDO, N.; ZAKZUK, J. Ascariasis as a model to study the helminth/allergy relationships. **Parasite immunology**, v. 41, n. 6, p. e12595, 2019.
11. CARABALLO, L.; CORONADO, S. Parasite allergens. **Molecular immunology**, v. 100, p. 113–119, 2018.
12. CARABALLO, L.; LLINÁS-CABALLERO, K. The relationship of parasite allergens to allergic diseases. **Current allergy and asthma reports**, v. 23, n. 7, p. 363–373, 2023.
13. CARNEIRO, V. L. et al. WSB1 and IL21R Genetic Variants Are Involved in Th2 Immune Responses to Ascaris lumbricoides. **Frontiers in immunology**, v. 12, 2021.
14. CASTRO, J. C. et al. Bioaccessibility and oral immunization efficacy of a chimeric protein vaccine against Ascaris suum. **Microbes and infection**, v. 25, n. 3, p. 105042, 2023.
15. CAVALLERO, S. et al. Phylogeographical Studies of Ascaris spp. Based on Ribosomal and Mitochondrial DNA Sequences. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 4, p. e2170, 2013.
16. CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL; PREVENTION. CDC - Ascariasis. 2010.
17. CHEN, N.; NEDOLUZHKO, A. Ancient DNA: The past for the future. **BMC genomics**, v. 24, n. 1, p. 309, 2023.

18. CONTERNO, L. O. et al. Anthelmintic drugs for treating ascariasis. **Cochrane database of systematic reviews**, v. 4, n. 4, p. CD010599, 2020.
19. CÔTÉ, N. M.-L.; LE BAILLY, M. Palaeoparasitology and palaeogenetics: review and perspectives for the study of ancient human parasites. **Parasitology**, v. 145, n. 5, p. 656–664, 2018.
20. CUCHER, M. A.; ANCAROLA, M. E.; KAMENETZKY, L. The challenging world of extracellular RNAs of helminth parasites. **Molecular immunology**, v. 134, p. 150–160, 2021.
21. DE ALMEIDA LOPES, C. **Imunodiagnóstico da ascaridíase humana: uma nova abordagem sorológica utilizando a tecnologia IgY**. [s.l.] Universidade Federal de Uberlândia, 27 jul. 2018.
22. DE CASTRO, J. C. et al. Vaccination with chimeric protein induces protection in murine model against ascariasis. **Vaccine**, v. 39, n. 2, p. 394–401, 2021.
23. DE LIMA CORVINO, D. F.; HERRALL, S. **Ascariasis**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2023.
24. DESLYPER, G. et al. *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* vary in their larval burden in a mouse model. **Journal of helminthology**, v. 94, n. e128, p. e128, 2020.
25. DJUARDI, Y. et al. Soil-transmitted helminth infection, anemia, and malnutrition among preschool-age children in Nangapanda subdistrict, Indonesia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009506, 2021.
26. EASTON, A. et al. Molecular evidence of hybridization between pig and human *Ascaris* indicates an interbred species complex infecting humans. **eLife**, v. 9, 2020.
27. ELSE, K. J. et al. Whipworm and roundworm infections. **Nature reviews. Disease primers**, v. 6, n. 1, p. 1–23, 2020.
28. EL-WAKIL, E. S.; ZALAT, R. S.; EL-BADRY, A. A. Mapping gut parasitism patterns in a cohort of Egyptians. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2023.
29. ESTREM, B.; WANG, J. Programmed DNA elimination in the parasitic nematode *Ascaris*. **PLoS pathogens**, v. 19, n. 2, p. e1011087, 2023.
30. EVANGELISTA, F. M. D. et al. A reverse vaccinology approach identifies putative vaccination targets in the zoonotic nematode *Ascaris*. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, 2022.
31. EVANGELISTA, F. M. D. et al. In silico design of a polypeptide as a vaccine candidate against ascariasis. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2023.
32. GUEDES, L. et al. African helminth infection out of Africa: Paleoparasitological and paleogenetic investigations in Pretos Novos cemetery, Rio de Janeiro, Brazil (1769–1830). **Acta tropica**, v. 205, n. 105399, p. 105399, 2020.
33. GUIMARÃES, A. C. G. **Desenvolvimento e produção de uma vacina quimérica multi-peptídica e avaliação de sua eficácia vacinal contra ascaridíase**. [s.l.] Universidade Federal De Minas Gerais, 21 set. 2021.
34. HAILU, S. et al. A rare case of intestinal obstruction secondary to bolus of *Ascaris Lumbricoides* infestation: A case report and review of the literatures. **International journal of surgery open**, v. 44, n. 100504, p. 100504, 2022.
35. HAN, L. et al. Gene rearrangements in the mitochondrial genome of ten *Ascaris* species and phylogenetic implications for Ascaridoidea and Heterakoidea families. **International journal of biological macromolecules**, v. 221, p. 1394–1403, 2022.

36. HOLLAND, C. et al. Global prevalence of *Ascaris* infection in humans (2010–2021): a systematic review and meta-analysis. **Infectious diseases of poverty**, v. 11, n. 1, 2022.
37. HU, T. et al. Next-generation sequencing technologies: An overview. **Human immunology**, v. 82, n. 11, p. 801–811, 2021.
38. JONES, B. P. et al. Identification of key interactions of benzimidazole resistance-associated amino acid mutations in *Ascaris* β -tubulins by molecular docking simulations. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022.
39. KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397–400, 1972.
40. KLOMKLIEW, P. et al. Gut bacteriome and metabolome of *Ascaris lumbricoides* in patients. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 2022.
41. KUMAR, K. R.; COWLEY, M. J.; DAVIS, R. L. Next-generation sequencing and emerging technologies. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 45, n. 7, p. 661–673, 2019.
42. LAGATIE, O. et al. 2-Methyl-pentanoyl-carnitine (2-MPC): a urine biomarker for patent *Ascaris lumbricoides* infection. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020a.
43. LAGATIE, O. et al. Detection of *Ascaris lumbricoides* infection by ABA-1 coproantigen ELISA. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 10, p. e0008807, 2020b.
44. LI, L. et al. Molecular phylogeny and dating reveal a terrestrial origin in the early carboniferous for ascaridoid nematodes. **Systematic biology**, v. 67, n. 5, p. 888–900, 2018.
45. LIU, Y.; BENNETT, E. A.; FU, Q. Evolving ancient DNA techniques and the future of human history. **Cell**, v. 185, n. 15, p. 2632–2635, 2022.
46. LOREILLE, O. et al. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 10, p. 1101–1106, 2001.
47. LOREILLE, O.; BOUCHET, F. Evolution of ascariasis in humans and pigs: a multi-disciplinary approach. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. suppl 1, p. 39–46, 2003.
48. LYNCH, M.; JARRELL, P. E. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 135, n. 4, p. 1197–1208, 1993.
49. MINKLER, S. J. et al. Expression and Secretion of Circular RNAs in the Parasitic Nematode, *Ascaris suum*. **Frontiers in genetics**, v. 13, 2022.
50. MOHD-SHAHARUDDIN, N. et al. Expression of *Ascaris lumbricoides* putative virulence-associated genes when infecting a human host. **Parasites & vectors**, v. 14, n. 1, p. 176, 2021.
51. NTONIFOR, N. H.; TAMUFOR, A. S. W.; ABONGWA, L. E. Prevalence of intestinal parasites and associated risk factors in HIV positive and negative patients in Northwest Region, Cameroon. **Scientific reports**, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2022.
52. OH, C. S. et al. Updates on parasite infection prevalence in the Joseon period based on parasitological studies of human coprolites isolated from archaeological sites in the cities of Euijeongbu, Gumi, and Wonju. **Parasites, Hosts and Diseases**, v. 61, n. 1, p. 89–93, 2023.

53. OYEYEMI, O. T.; OKUNLOLA, O. A. Soil-transmitted helminthiasis (STH) endemicity and performance of preventive chemotherapy intervention programme in Nigeria (in year 2021). **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 10155, 2023.
54. PAWAR, A. A. et al. Smartphone-based diagnostics for biosensing infectious human pathogens. **Progress in biophysics and molecular biology**, v. 180–181, p. 120–130, 2023.
55. PERVEZ, M. T. et al. A comprehensive review of performance of next-generation sequencing platforms. **BioMed research international**, v. 2022, p. 1–12, 2022.
56. **Projeto Qualibio - Exemplos Regionais de Animais**. Disponível em: <<https://qualibio.ufba.br/041.html>>. Acesso em: 10 set. 2023.
57. ROCHA, L. K. **Papel protetor do receptor atípico de quimiocinas ACKR2 na fase aguda e crônica da ascaridíase larval experimental**. [s.l.] Universidade Federal De Minas Gerais, 25 fev. 2022.
58. ROCHE, K. et al. Gastrointestinal parasite burden in 4th-5th c. CE Florence highlighted by microscopy and paleogenetics. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 90, n. 104713, p. 104713, 2021.
59. SILVA, T. E. DA et al. Unraveling *Ascaris suum* experimental infection in humans. **Microbes and infection**, v. 23, n. 8, p. 104836, 2021.
60. SØE, M. J. et al. Ancient DNA from latrines in Northern Europe and the Middle East (500 BC–1700 AD) reveals past parasites and diet. **PloS one**, v. 13, n. 4, p. e0195481, 2018.
61. SWITZ, N. A.; D'AMBROSIO, M. V.; FLETCHER, D. A. Low-cost mobile phone microscopy with a reversed mobile phone camera lens. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e95330, 2014.
62. TAGHIPOUR, A. et al. Is *Ascaris lumbricoides* a risk factor for development of asthma? A systematic review and meta-analysis. **Microbial pathogenesis**, v. 142, n. 104099, p. 104099, 2020.
63. TAMS, K. W. et al. Parasitic infections and resource economy of Danish Iron Age settlement through ancient DNA sequencing. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0197399, 2018.
64. VACCA, F.; LE GROS, G. Tissue-specific immunity in helminth infections. **Mucosal immunology**, v. 15, n. 6, p. 1212–1223, 2022.
65. VAN DER WAL, C.; HO, S. Y. W. Molecular Clock. Em: **Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 719–726.
66. WANG, J. et al. Comprehensive chromosome end remodeling during programmed DNA elimination. **Current biology: CB**, v. 30, n. 17, p. 3397–3413.e4, 2020.
67. WANG, J. Genomics of the parasitic nematode *Ascaris* and its relatives. **Genes**, v. 12, n. 4, p. 493, 2021a.
68. WANG, J. Genome analysis of programmed DNA elimination in parasitic nematodes. Em: **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer US, 2021b. v. 2369p. 251–261.
69. WANG, J.; DAVIS, R. E. *Ascaris*. **Current biology: CB**, v. 30, n. 10, p. R423–R425, 2020.
70. WONG, M. T. J. et al. Soil-transmitted helminthic vaccines: Where are we now? **Acta tropica**, v. 239, n. 106796, p. 106796, 2023.

71. ZAGOSKIN, M. V. et al. Small RNA pathways in the nematode *Ascaris* in the absence of piRNAs. **Nature communications**, v. 13, n. 1, 2022.
72. ZAGOSKIN, M. V.; WANG, J. Programmed DNA elimination: silencing genes and repetitive sequences in somatic cells. **Biochemical Society transactions**, v. 49, n. 5, p. 1891–1903, 2021.
73. ZAWAWI, A.; ELSE, K. J. Soil-transmitted helminth vaccines: Are we getting closer? **Frontiers in immunology**, v. 11, 2020.
74. ZHAN, X. et al. Differential change in the prevalence of the *Ascaris*, *Trichuris* and *Clonorchis* infection among past east Asian populations. **The Korean journal of parasitology**, v. 57, n. 6, p. 601–605, 2019.
75. ZHOU, C. et al. Study on the population evolution of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* based on whole genome resequencing. **Veterinary parasitology**, v. 279, n. 109062, p. 109062, 2020a.
76. ZHOU, C. et al. Mitochondrial phylogenomics of human-type *Ascaris*, pig-type *Ascaris*, and hybrid *Ascaris* populations. **Veterinary parasitology**, v. 287, n. 109256, p. 109256, 2020b.
77. ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Evolutionary Divergence and Convergence in Proteins. Em: **Evolving Genes and Proteins**. [s.l.] Elsevier, 1965. p. 97–166.