

## Paleoparasitologia no Brasil

### Paleoparasitology in Brazil

Marcelo L. C. Gonçalves <sup>1</sup>  
Adauto Araújo <sup>1</sup>  
Luiz Fernando Ferreira <sup>1</sup>

**Abstract** *We review the beginning of paleoparasitology and its development in Brazil. The search of parasites in ancient human remains can throw light on such questions as origin and antiquity of parasite-host relationship, general distribution of parasites through time and prehistoric human migrations. The study of parasite DNA sequences found in mummified tissues and coprolites can be an important source of information for phylogenetic and host-parasite coevolution. The nucleic acid based techniques (molecular paleoparasitology) open a new perspective to evolution at a molecular level.*

**Key words** *Paleoparasitology, Coprolites, Ancient feces, Mummies, Ancient diseases*

**Resumo** *Neste artigo faz-se uma revisão sobre o início da paleoparasitologia no Brasil e seu desenvolvimento. A pesquisa de parasitos em vestígios humanos pode trazer informações sobre questões tais como a origem e antiguidade da relação parasito-hospedeiro, distribuição de parasitos através do tempo e migrações humanas pré-históricas. O estudo de seqüências de ADN de parasitos encontrados em tecidos mumificados e coprólitos pode ser uma importante fonte de informação para filogenia e co-evolução parasito-hospedeiro. A análise de ácidos nucléicos de parasitos encontrados em material arqueológico (paleoparasitologia molecular) abre novas perspectivas para estudos sobre evolução ao nível molecular.*

**Palavras-chave** *Paleoparasitologia, Coprólitos, Fezes antigas, Múmias, Doenças no passado*

<sup>1</sup> Departamento de Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1.480 térreo 21041-210 Rio de Janeiro RJ. mlcg@ig.com.br

## Introdução

Paleoparasitologia é o ramo da paleopatologia que estuda os parasitos em material arqueológico ou paleontológico. No início do século 20, os estudos pioneiros de Sir Marc Armand Ruffer, quando descreve ovos de *Schistosoma haematobium* nos rins de múmias egípcias, lançam a pedra fundamental da nova ciência. Ruffer desenvolveu técnicas de reidratação de tecidos mumificados, possibilitando preparações histológicas e conseqüentemente o diagnóstico de doenças em populações do antigo Egito. O intercâmbio com egiptólogos ampliou as perspectivas de estudo dos parasitos do passado (Ruffer, 1921).

A associação entre arqueólogos e parasitologistas começou a se estruturar mais tarde, com a análise de coprólitos (fezes mineralizadas ou preservadas pela dessecação) coletados em sítios arqueológicos e enviados aos laboratórios. Entretanto, por limitações técnicas, até a metade daquele século, descreveram-se em coprólitos relativamente poucos ovos e larvas de helmintos parasitos de animais e de humanos, sendo que estes últimos principalmente em corpos mumificados e no conteúdo de fossas medievais europeias (Szidat, 1944; Pizzi & Schenone, 1954; Taylor, 1955).

O uso de solução aquosa de fosfato trissódico como reidratante, uma adaptação da técnica usada para recuperar espécimens dessecados em coleções de museu, impulsionou a paleoparasitologia a partir da década de 1960. Este método, utilizado em coprólitos preservados por dessecação, permitiu o uso de técnicas parasitológicas comumente aplicadas nos laboratórios clínicos (Callen & Cameron, 1960; Reinhard *et al.*, 1988). Os achados de ovos e larvas de parasitos tornaram-se mais freqüentes e começou-se a perceber as potencialidades desta nova ciência, com todas as suas implicações no estudo da evolução das relações parasito-hospedeiro e nos estudos de dispersão das espécies. A paleoparasitologia mostrou desde logo sua vocação para a interdisciplinaridade.

As primeiras pesquisas no Brasil objetivaram refutar a crença até então existente de que as doenças parasitárias não eram significantes na pré-história do Novo Mundo. Os primeiros resultados desta linha de pesquisa, ovos de *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos datados de épocas pré-Colombianas, foram apresentados no Congresso Brasileiro de Parasitologia, em 1979 (Ferreira *et al.*, 1979). Na mesma ocasião

cunhou-se o termo Paleoparasitologia para esta nova ciência.

## A técnica clássica

Consiste no exame microscópico de um fragmento do coprólito. O exame é simples e pouco dispendioso. Através do aspecto morfológico do coprólito e do tipo e presença de restos alimentares, procura-se identificar sua origem zoológica.

A técnica consiste na retirada de um fragmento do coprólito. Caso o coprólito esteja preservado por dessecação, a reidratação é feita com solução aquosa de fosfato trissódico ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) a 0,5% por 72 horas (Callen & Cameron, 1960). Em caso de coprólito mineralizado, utiliza-se ácido clorídrico 10% até sua desagregação, conforme a técnica de Jones (1983).

Após esta etapa, o material é concentrado pela técnica de sedimentação espontânea (Reinhard *et al.*, 1988). O sedimento é então examinado através de microscopia óptica, sendo os parasitos encontrados medidos e fotografados. Através das medidas dos ovos encontrados, são usadas tabelas de ovos de parasitos e hospedeiros para comparações morfométricas, na tentativa de identificar a espécie do parasito envolvido e confirmar ou não a origem humana do coprólito (Confalonieri *et al.*, 1988; Chame *et al.*, 1991).

A datação do material é realizada por métodos físicos (radiocarbono ou termoluminescência) diretamente no coprólito ou na camada geológica onde foi encontrado, ou ainda por contexto cultural.

## Os coprólitos e a paleoepidemiologia

A análise macro e microscópica dos coprólitos, além de parasitos, pode revelar importantes informações sobre padrões de dieta, paleoclimas e adaptações paleoecológicas (Wilke & Hall, 1975). Os tipos de resíduos orgânicos presentes nos coprólitos, tais como pólenes, fibras, grãos de amido e fragmentos ósseos, assim como avaliações do contexto arqueológico do local de encontro do coprólito, permitem inferências sobre dados culturais dos povos antigos. A prática da agricultura pode ser identificada a partir do encontro de algumas variedades vegetais.

Estudos de patoecologia em agricultores pré-históricos mostraram que o grau de infec-

ção parasitária do grupo era dependente de padrões sanitários, tipo de moradia e ambiente. Infecções por *Enterobius vermicularis*, por exemplo, mostraram padrões diversos entre povos agricultores e caçadores-coletores pré-históricos. À medida que os habitantes de determinada região passaram a se sedentarizar, usando abrigos ou grutas como moradia, ou construindo habitações, a frequência de ovos de parasitos em coprólitos aumenta (Reinhard *et al.*, 1987; Reinhard, 1992).

Outras inferências podem ser feitas quanto aos hábitos alimentares e infecções parasitárias. A infecção por *Diphyllobothrium pacificum*, cestódeo parasito de mamíferos marinhos com ciclo evolutivo em peixes e crustáceos, foi diagnosticada em populações pré-históricas sul-americanas da costa do Pacífico, há pelo menos 4.000 anos (Patrucco *et al.*, 1983; Ferreira *et al.*, 1984). Os dados da paleoparasitologia mostram a persistência de hábitos alimentares por um longo período nesta região, uma vez que a infecção foi descrita na população atual, cujos hábitos alimentares, no caso o prato típico "cebiche", ainda permanecem (Baer, 1969).

### A paleoparasitologia e as migrações pré-históricas

Uma importante contribuição da paleoparasitologia refere-se às migrações pré-históricas humanas e povoamento dos continentes. Já no fim do século 19 questões referentes a parasitismo e migrações pré-históricas humanas despertavam o interesse de pesquisadores. Os estudos de Olímpio da Fonseca sobre parasitismo em populações indígenas contemporâneas isoladas trouxeram contribuições para as teorias de povoamento das Américas (Fonseca, 1972), introduzindo um novo marcador biológico às argumentações de ordem cultural sobre origem e vias migratórias de populações pré-históricas. A paleoparasitologia, por outro lado, a partir do encontro de ovos de parasitos em coprólitos humanos, trouxe uma contribuição importante aos estudos epidemiológicos que usam dados atuais para inferências sobre movimentos migratórios pré-históricos.

A análise da distribuição de infecções parasitárias no passado possibilita especulações quanto às migrações humanas em diferentes regiões ao longo do tempo assim como contatos interpopulacionais, uma vez que, sob a ótica evolucionista, uma determinada espécie bio-

lógica não surge em mais de um ponto geográfico. Com isso, pode-se confirmar ou refutar teorias de povoamento e propor alternativas com base em achados paleoparasitológicos (Horne, 1985; Nozais, 1985; Araújo & Ferreira, 1997).

Logo após a descoberta, o povoamento do continente americano foi objeto de especulações. Já em 1590 frei José de Acosta sugeria uma via terrestre entre a Ásia e a América do Norte como porta de entrada do novo mundo para os habitantes pré-colombianos. Por quase 400 anos essa explicação reinou sem sobressaltos no ambiente acadêmico, sendo a origem asiática, via Estreito de Bering, dos primeiros habitantes das Américas dada como certa.

Durante o último período glacial, no final de pleistoceno, com o abaixamento de mais de 90 metros do nível dos oceanos, o continente asiático e o americano ficaram unidos por uma faixa gelada de terra, a Beringia, possibilitando deslocamentos humanos. Utilizando rotas no norte do continente americano por entre geleiras, esses primeiros habitantes teriam povoado progressivamente as novas terras mais ao sul.

O estudo de coprólitos humanos tem levantado dúvidas sobre o modelo clássico do povoamento pré-colombiano das Américas pelo Estreito de Bering. As teorias clássicas propostas sobre o povoamento sugerem ondas migratórias por esta região, em número e época variáveis. Entretanto, este modelo não pode justificar o encontro de ovos de ancilostomídeos e de *Trichuris trichiura* em coprólitos oriundos de sítios arqueológicos das Américas há pelo menos 7.200 anos (Allison *et al.*, 1974; Ferreira *et al.*, 1980, 1983; 1987; Araújo *et al.*, 1981). O clima frio da Beringia não permitiria a persistência deste tipo de parasitismo na população migrante, agindo como um verdadeiro filtro (Manter, 1967; Fladmark, 1979; Araújo *et al.*, 1988; Ferreira & Araújo, 1996). Deste modo, a transmissão de parasitos com parte de seu ciclo evolutivo obrigatoriamente no solo seria interrompida ao longo das gerações de hospedeiros humanos que se sucederam por esta via migratória (Araújo *et al.*, 1985; Araújo & Ferreira, 1995; Hugot *et al.*, 1999).

Tais achados sugerem, na verdade, rotas alternativas, por mar, como uma possibilidade para as migrações humanas na América pré-histórica, tornando questionável a exclusividade absoluta do Estreito de Bering como porta de entrada (Araújo & Ferreira, 1996). Esta é uma linha cujos resultados se acumulam, criando dados consistentes para discussões sobre

origem de populações de hospedeiros em novos territórios.

### Os novos horizontes: biologia molecular e *ancient DNA*

O uso de técnicas de biologia molecular, especialmente a reação em cadeia da polimerase (PCR), expandiu em muito o horizonte da paleoparasitologia. A técnica baseia-se na amplificação *in vitro* de regiões específicas de DNA. Com o auxílio de *primers* complementares a seqüências específicas localizadas em uma das extremidades do segmento a ser amplificado, obtêm-se milhões de cópias do segmento de DNA amplificado.

A utilização de novas técnicas de biologia molecular em material antigo deve ser precedida de um estudo controlado em material recente experimentalmente dessecado (Bastos *et al.*, 1996). Ainda que apresente dificuldades metodológicas em sua aplicação em material antigo, sobretudo referentes à inibição da reação por elementos do solo presentes no material arqueológico, à contaminação ambiental por DNA recente ou ainda pela dificuldade de obtenção de *primers* confiáveis e específicos (Hänni *et al.*, 1991), o uso da PCR inaugura uma nova era no diagnóstico paleoparasitológico. Muito mais sensível do que o exame direto, o uso da técnica da PCR e de suas variantes tem permitido o diagnóstico de infecções parasitárias em material antigo até então inacessíveis à microscopia óptica.

Diversas infecções parasitárias têm sido diagnosticadas em populações pré-históricas através da técnica da PCR. *Borrelia burgdorferi* em carrapatos de coleção de museu (Persing *et al.*, 1990), *Mycobacterium tuberculosis* em corpos humanos mumificados (Spigelman & Lemma, 1993; Salo *et al.*, 1994; Arriaza *et al.*, 1995) são alguns exemplos do uso da biologia molecular no diagnóstico parasitológico em material antigo.

O diagnóstico de infecção chagásica em múmias sul-americanas datadas em até 4.000 anos através da técnica de PCR, com a amplificação de minicírculos do cinetoplasto do *Trypanosoma cruzi*, confirmou a antiguidade da infecção humana por este parasito (Guhl *et al.*, 1997, 1999; Ferreira *et al.*, 2000). Entretanto, a hipótese de que tenha sido conseqüente à domiciliação do *Triatoma infestans* em regiões andinas e posteriormente se distribuído pelo

continente poderá ser confrontada com novos dados paleoparasitológicos. A possibilidade do encontro de DNA de *T. cruzi* em esqueletos humanos de sítios arqueológicos, como os da Serra da Capivara, Piauí, onde se localizam alguns dos mais antigos sítios arqueológicos das Américas, descortina uma nova hipótese, a de que a doença de Chagas seja tão antiga no continente quanto os humanos. Os vestígios arqueológicos mostraram a presença de animais reservatórios e vetores em áreas ocupadas pelos primeiros habitantes da região.

### A paleoparasitologia molecular e a filogenia

A possibilidade de se trabalhar com genomas de parasitos numa perspectiva evolutiva abre um novo campo para estudos filogenéticos. O seqüenciamento de ácido nucléico de parasitos (Chilton & Gasser, 1999; Le *et al.*, 2000; Belloccq *et al.*, 2001) e a recuperação de material genético de helmintos parasitos humanos em material antigo (Loreille *et al.*, 2001) permitem antever um campo fértil para estudos sobre origem e evolução das doenças parasitárias e seus agentes etiológicos. A comparação de seqüências de ácido nucléico de parasitos separados por intervalos de tempo de alguns milhares de anos poderá trazer respostas sobre variações na virulência de patógenos que, conjuntamente com os estudos de patoecologia de parasitos, possibilitará maior entendimento sobre emergência e reemergência de doenças infecciosas (Araújo & Ferreira, 2000). Sobre este mesmo caminho, a paleoparasitologia sem dúvida contribuirá com novas teorias sobre as relações parasito-hospedeiro, voltadas sobretudo para coevolução e modelos de virulência, e o próprio conceito de parasitismo.

A paleoparasitologia tornou-se um caminho para estudos sobre a origem de hospedeiros, suas rotas de migração no passado e distribuição atual, fornecendo dados para outras ciências relacionadas às origens da espécie humana.

## Referências bibliográficas

- Allison MJ, Pezzia A, Hasegawa, I & Gerszten E 1974. A case of hookworm infection in a pre-Columbian American. *American Journal of Physical Anthropology* 41:103-106.
- Araújo A & Ferreira LF 1995. Oxiuríase e migrações pré-históricas. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos* 1: 99-109.
- Araújo A & Ferreira LF 1996. Paleoparasitology and the peopling of the Americas. *Fundamentos* 1:106-114.
- Araújo A & Ferreira LF 1997. Homens e parasitos: a contribuição da paleoparasitologia para a questão da origem do homem na América. *Revista da Universidade de São Paulo* 34:58-70.
- Araújo A & Ferreira LF 2000. Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationships. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95:89-93.
- Araújo A, Ferreira LF & Confalonieri U 1981. A contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 41:873-881.
- Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U & Chame M 1988. Hookworms and the peopling of America. *Cadernos de Saúde Pública* 2:226-233.
- Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U, Nuñez L & Ribeiro BM 1985. The finding of *Enterobius vermicularis* eggs in pre-Columbian human coprolites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80:141-143.
- Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC & Holcomb TA 1995. Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *American Journal of Physical Anthropology* 98:37-45.
- Baer JG 1969. *Diphyllobothrium pacificum*, a tapeworm from sea lions endemic in along the coastal area of Peru. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 26:717-723.
- Bastos OM, Araújo A, Ferreira LF, Santoro A, Wincker P & Morel LC 1996. Experimental paleoparasitology: identification of *Trypanosoma cruzi* DNA in desiccated mouse tissues. *Paleopathology Newsletter* 94:5-8.
- Belloq JG, Ferté H, Depaquit J, Justine JL, Tillier A & Desset MCD 2001. Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19:430-442.
- Callen EO & Cameron TWM 1960. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Scientist* 8:35-40.
- Chame M, Ferreira LF, Araújo A & Confalonieri U 1991. Experimental paleoparasitology: an approach to the diagnosis of animal coprolites. *Paleopathology Newsletter* 76:7-9.
- Chilton NB & Gasser RB 1999. Sequence differences in the internal transcribed spacers of DNA among four species of hookworm (Ancylostomatoidea: Ancylostoma). *International Journal for Parasitology* 29: 1.971-1.977.
- Confalonieri U, Ferreira LF, Araújo A & Ribeiro BM 1988. The use of a statistical test for the identification of helminth eggs in coprolites. *Paleopathology Newsletter* 62:7-8.
- Ferreira LF & Araújo A 1996. On hookworm in the Americas and trans-pacific contact. *Parasitology Today* 12:454.
- Ferreira LF, Araújo A & Confalonieri UEC 1979. Subsídios para a paleoparasitologia do Brasil. I. Parasitos encontrados em coprólitos no município de Unaí, MG. *Resumos de IV Congresso Brasileiro de Parasitologia*, Campinas, p. 56.
- Ferreira LF, Araújo A & Confalonieri UEC 1980. Finding of helminth eggs in human coprolites from Unaí, MG. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74:798-800.
- Ferreira LF, Araújo A & Confalonieri UEC 1983. The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 65-67.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri UEC, Chame M & Ribeiro BM 1987. Encontro de ovos de ancilostomídeos em coprólitos humanos datados de 7230 ± 80 anos, Piauí, Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 59:280-281.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri UEC & Nuñez L 1984. The finding of eggs of *Diphyllobothrium* in human coprolites (4,100-1,950 B.C.) from Northern Chile. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79:175-180.
- Ferreira LF, Britto C, Cardoso A, Fernandes O, Reinhard K & Araújo A 2000. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues of Chilean mummies. *Acta Tropica* 75:79-84.
- Fladmark KR 1979. Routes: Alternate migration corridors for early man in North America. *American Antiquity* 44:55-69.
- Fonseca O 1972. *Parasitismo e migrações humanas pré-históricas*. Mauro Familiar Editor, Rio de Janeiro.
- Guhl F et al. 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000-year-old mummified human tissue from Northern Chile. *American Journal of Physical Anthropology* 108:401-407.
- Guhl F, Jaramillo C, Yockteng R, Vallejo GA & Arroyo FC 1997. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *Lancet* 349:1.370.
- Hänni C, Laudet V & Stehelin D 1991. Paléontologie et biologie moléculaire: la rencontre de deux mondes. *Biofutur* 98:55-58.
- Horne PD 1985. A review of the evidence of human endoparasitism in the pre-columbian New World through the study of coprolites. *Journal of Archaeological Sciences* 12:299-310.
- Hugot JP, Reinhard KJ, Gardner SL & Morand S 1999. Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. *Parasite* 6:201-208.
- Jones AKG 1983. A coprolite from 6-8 pavement pp. 225-229. In *Environment and living conditions at two Anglo-Scandinavian sites*. University of York, York.
- Le TH, Blair D & Mcmanus DP 2000. Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny. *Acta Tropica* 77:243-246.
- Loreille O, Roumat E, Verneau O, Bouchet F & Hänni C 2001. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *International Journal of Parasitology* 31:1.101-1.106.
- Manter HW 1967. Some aspects of the geographical distribution of parasites. *Journal of Parasitology* 53:1-9.
- Nozais JP 1985. Hypothèses sur l'origine de certains parasites du continent latino-américain. *Bulletin de la*

- Société de Pathologie Exotique* 78: 401-412.
- Patrucco R, Tello R & Bonavia D 1983. Parasitological studies of coprolites of prehispanic peruvian populations. *Current Anthropology* 24:393-394.
- Persing DH, Telford SR, Rys PN, Dodge DE, White SE & Spielman A 1990. Detection of *Borrelia burgdoferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. *Science* 249:1.420-1.423.
- Pizzi T & Schenone H 1954. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. *Boletín Chileno de Parasitología* 9:73-75.
- Reinhard KJ 1992. The impact of diet and parasitism on anemia in the prehistoric West, pp. 219-258. In P. Stuart-McAdam & S. Kent (org.). Diet, demography and disease: changing perspectives of anemia. Aldine deGryeter, Nova York.
- Reinhard KJ, Confalonieri U, Ferreira LF, Herrmann B & Araújo A 1988. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo* 37:217-239.
- Reinhard KJ, Hevly RH & Anderson GA 1987. Helminth remains from prehistoric Indian coprolites from the Colorado Plateau. *Journal of Parasitology* 70: 630-639.
- Ruffer MA 1921. *Studies in paleopathology of Egypt*. R Moodie, Ed.-University of Chicago Press, Nova York-Chicago.
- Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J & Holcomb T 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-columbian peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:2.091-2.094.
- Spigelman J & Lemma E 1993. The use of polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *International Journal of Osteoarchaeology* 3:137-143.
- Szidat L 1944. Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor- und frühgeschichtlichen Moorleichen. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 13:265-274.
- Taylor EL 1955. Parasitic helminths in mediaeval remains. *Veterinary Record* 67:216-218.
- Wilke PJ & Hall HJ 1975. *Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography*. University of California, Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, Berkeley.