



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

Fundação Oswaldo Cruz

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

***“PARASITISMO POR ECHINOSTOMA SP. (TREMATODA:  
DIGENEA: ECHINOSTOMATIDAE) EM POPULAÇÕES  
PRÉ-COLOMBIANAS: UM ESTUDO DE CASO”***

**Luciana Sianto**

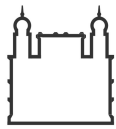
Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Saúde Pública.

Orientador: Adauto Araújo

Prof<sup>a</sup> Colaboradora: Marcia Chame

Rio de Janeiro

2004



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

Fundação Oswaldo Cruz

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca



***“Parasitismo por Echinostoma sp. (Trematoda: Digenea: Echinostomatidae) em populações pré-colombianas: um estudo de caso”***

Apresentada por:

**Luciana Sianto**

Membros da Banca Examinadora:

Professor Dr. Arnaldo Maldonado Jr.

Professora Dra. Françoise Bouchet

Professor Dr. Adauto Araújo

Dissertação defendida em novembro de 2004.

Rio de Janeiro

2004

Para Marlon, por suportar e perdoar  
todo meu estresse.  
E claro, para meus pais.

*“Em tempos de crise, só a imaginação  
é mais importante que o conhecimento.”*

Albert Einstein

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Adauto J. G. Araújo (ENSP/FIOCRUZ) por me apresentar ao apaixonante mundo da Paleoparasitologia. Nos dois últimos anos aprendi a respeitá-lo e admirá-lo como mestre e ser humano. Obrigada pela disponibilidade, paciência, carinho, amizade e, principalmente, por ter acreditado. Minha eterna gratidão.

Ao Dr. Sérgio Chaves (ENSP/FIOCRUZ) pelo apoio quando o mestrado ainda era um sonho distante.

Ao Dr. Arnaldo Maldonado Jr. (IOC/FIOCRUZ) pelo empréstimo do material zoológico, pelas sugestões, disponibilidade e alegria característica.

Ao Dr. Karl Reinhard (Universidade de Nebraska/EUA) pela ajuda na metodologia, na elaboração do artigo e companhia agradável.

À Dr<sup>a</sup>. Sheila Mendonça (ENSP/FIOCRUZ) que pela convivência e carinho se tornou um pouco orientadora.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferreira (ENSP/FIOCRUZ), cujas palavras calmas ou furiosas, são nossa fonte de inspiração.

Ao Dr. Antônio Duarte (ENSP/FIOCRUZ) e a Prof<sup>a</sup>. Elaine Martinez (UERJ), por tirar dúvidas, emprestar material e por serem tão prestativos e sorridentes.

Ao Dr. Paulo Barata (ENSP/FIOCRUZ), pelo auxílio no complexo mundo da estatística.

Aos inúmeros professores do DENSP e do curso de mestrado, por me mostrarem o exemplo a seguir e, às vezes, o que não seguir.

Aos amigos e companheiros paleoparasitólogos Marcelo, Alexandre, por tornar o dia-a-dia muito mais divertido.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia e anexos, Salvatore e seus pupilos, Martha, André, Ronaldo, Kadu, por me aturarem nos bons e nos maus momentos principalmente. Obrigada Rita.

Aos amigos do mestrado, Izabel, Elaine, Arlindo, Marília, José, Valéria, Rosana e em especial Artur, um dos poucos que entende meu sarcasmo.

Ao Daniel, André, Sheila, Guilherme, Michela e todos da equipe que se esconde no beco mais animado do departamento. Obrigada pelos mapas!

Aos amigos Giovane, Leila, Verônica, Filipe, Ana Paula Motta, Sérgio Silva e tantos outros, dentro e fora do mundo acadêmico, por todos os minutos de atenção.

Aos amigos da secretaria do DENSP, Carla, Cristiano, Evandro, Amâncio, Jussara e Nair pela paciência nos últimos quatro anos. À Lucilene e todos que me aturam pela manhã, sonolenta, procurando café.

A toda equipe da paleo, Paulo César, Marquinhos e Natalina por toda a organização que faz o laboratório funcionar.

Ao pessoal da pós-graduação, André, Morgana, Joselmo, Alex, por sempre localizar meu orientador, quando me sentia desorientada. Aos funcionários da biblioteca da ENSP e da secretaria acadêmica.

Ao Dr. André Prous (UFMG) por ceder o material utilizado neste estudo.

À CAPES pelo financiamento deste trabalho.

À Marcia Chame (ENSP/FIOCRUZ), exemplo de força, coragem e determinação... não tenho palavras para agradecer. Sem você eu não estaria aqui.

## RESUMO

Os estudos de paleoparasitologia, somados a outros de diversas áreas, podem ajudar no conhecimento sobre origem e evolução de doenças e das relações evolutivas entre parasitos e hospedeiros. Graças a esses estudos sabemos que as zoonoses conhecidas hoje já eram freqüentes em tempos remotos.

Neste trabalho foram analisados coprólitos retirados de um corpo naturalmente mumificado encontrado na Lapa do Boquete, Minas Gerais, Brasil, datado entre 600-1200 anos A.P. Encontraram-se ovos de duas espécies de helmintos. O primeiro foi identificado como *Necator americanus* ou *Ancylostoma duodenale*. Tal achado soma elementos ao debate sobre a distribuição de infecções por Ancylostomidae na América pré-colombiana. A segunda espécie de ovo foi identificada como *Echinostoma* sp. Este é provavelmente o primeiro registro de equinostomíase no Brasil. Falso parasitismo foi descartado pela quantificação dos ovos.

Esta zoonose, endêmica na região asiática, é vinculada pelos hábitos alimentares. Assim, o encontro de *Echinostoma* sp. em habitante pré-colombiano no Brasil levanta dúvidas sobre sua presença não só em grupos humanos nativos atuais, que mantiveram maioria de seus hábitos alimentares, como em habitantes das grandes cidades que têm experimentado mudanças de hábitos alimentares e, portanto, adquirido novas infecções parasitárias.

Palavras-chave: Paleoparasitologia, *Echinostoma*, Ancilostomídeos, coprólitos, falso parasitismo, América, saúde pública.

## ABSTRACT

The knowledge about the origin and evolution of infectious diseases, as well as host-parasite relationships, may be improved by paleoparasitological studies. Thanks to these studies we know that some zoonosis commonly found today were also found in remote times.

We analyzed coprolites from a naturally mummified male body found in Lapa do Boquete, Minas Gerais State, Southwestern Brazil, dated of 1200 to 600 years before present. Eggs of two helminth species were found. Hookworm (*Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale*) eggs were found, adding new contributions to the debate about the distribution of hookworm infection in Pre-Columbian America. Eggs of another helminth species was identified as *Echinostoma* sp. This is probably the first record of echinostomiasis in Brazil. False parasitism was discarded by quantifying eggs.

Echinostomiasis is endemic in Asia related to food habits. The finding of *Echinostoma* sp. in a Pre-Columbian inhabitant of Brazil raises questions on the presence of human echinostomiasis not only in Native Americans of modern times, but also among urban inhabitants due to diet changes and introduction of new food habits. Therefore new parasitic infections were acquired.

Keywords: Paleoparasitology, *Echinostoma*, Ancylostomids, coprolites, false parasitism, America, public health.



## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE GRÁFICOS.....	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	05
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	06
3.1. DIAGNÓSTICO DO MATERIAL UTILIZADO NESTE ESTUDO.....	06
3.2. ANÁLISE LABORATORIAL.....	06
3.2.1. Análise da dieta.....	07
3.2.2. Análise parasitológica.....	07
3.2.3. Quantificação do número de ovos por grama de coprólito.....	07
3.2.4. Estudo estatístico.....	08
4. RESULTADOS.....	12
4.1. DIETA.....	12
4.2. ANÁLISE PARASITOLÓGICA.....	12
4.2.1. Quantificação do número de ovos por grama de coprólito.....	13
5. DISCUSSÃO.....	18
5.1. A RESPEITO DO TRABALHO EM PALEOPARASITOLOGIA.....	18
5.2. DOS RESULTADOS DA ANÁLISE LABORATORIAL.....	20
5.2.1. Dieta.....	20
5.2.2. Análise parasitológica.....	21
5.2.3. Quantificação do número de ovos por grama de coprólito.....	23
5.2.4. Estudo estatístico.....	24
5.3. A RESPEITO DOS HELMINTOS ENCONTRADOS.....	24
5.3.1. <i>Echinostoma</i> sp.....	24
5.3.1.1. O Ciclo biológico do <i>Echinostoma</i> spp.....	25
5.3.1.2. Equinostomíase.....	26
5.3.1.3. A manutenção do ciclo biológico do <i>Echinostoma</i> spp. no Vale do Peruaçu.....	26
5.3.2. Ancylostomidae.....	27
6. CONCLUSÃO.....	38

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
8. ANEXOS.....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem de satélite mostrando a Área de Proteção Ambiental Cavernas do Peruaçu, MG, Brasil. Retirada da base de dados da EMBRAPA em setembro de 2004.....	09
Figura 2: Mapa temático mostrando a vegetação que compõe a Área de Proteção Ambiental Cavernas do Peruaçu, MG, Brasil. Retirado da base de dados do IBGE, 2004.....	10
Figura 3: Pelve com coprólito no interior. Visão caudal.....	11
Figura 4: Pelve com coprólito. Visão posterior.....	11
Figura 5: Pelve com coprólito (detalhe).....	11
Figura 6: <i>Lycopodium</i> sp. Microscópio eletrônico 600x.....	14
Figura 7: Grão de amido (400x).....	14
Figura 8: Exoesqueleto de inseto (400x).....	14
Figura 9: Fragmentos de ossos.....	14
Figura 10: Esporos de fungos (400x).....	14
Figura 11: Grãos de amido (400x).....	15
Figura 12: Traqueídeos (400x).....	15
Figura 13: Células esclerenquimatosas (400x).....	15
Figura 14: Células esclerenquimatosas (400x).....	15

Figura 15: Pêlo (espinho) vegetal (400x).....	15
Figura 16: Ovo de Ancylostomidae (400x).....	16
Figura 17: Ovo de Ancylostomidae (400x).....	16
Figura 18: Ovo de <i>Echinostoma</i> sp. (400x).....	16
Figura 19: Ovo de <i>Echinostoma</i> sp. (400x).....	17
Figura 20: Ácaro (400x).....	17
Figura 21: Ovo de <i>Echinostoma luisreyi</i> (400x).....	37

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Lista das espécies de *Echinostoma* (Platyelminthes: Trematoda: Digenea) com ocorrência no Brasil.....30

Tabela 2: Lista das espécies de *Echinostoma* (Platyelminthes: Trematoda: Digenea) mais freqüentes na bibliografia sem ocorrência no Brasil que apresentam registros de ocorrência humana.....33

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1: Amplitude de medidas ( $\mu\text{m}$ ) de comprimento de ovos das espécies de *Echinostoma* descritas no Brasil.....31
- Gráfico 2: Amplitude de medidas ( $\mu\text{m}$ ) de largura de ovos das espécies de *Echinostoma* descritas no Brasil.....32
- Gráfico 3: Amplitude de medidas ( $\mu\text{m}$ ) de comprimento de ovos das espécies de *Echinostoma* mais comumente encontradas em literatura, sem ocorrência no Brasil.....34
- Gráfico 4: Amplitude de medidas ( $\mu\text{m}$ ) de largura de ovos das espécies de *Echinostoma* mais comumente encontradas em literatura, sem ocorrência no Brasil.....35
- Gráfico 5: Dispersão das medidas ( $\mu\text{m}$ ) de comprimento e largura dos ovos de *Echinostoma* sp. e *E. luisreyi*.....36

## **LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

AD – Ano Domini

AP – Antes do Presente

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DENSP – Departamento de Endemias Samuel Pessôa

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

MG – Minas Gerais

N – Número

PAPES - Vice-Presidência de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

SD – (do inglês standard deviation) Desvio Padrão

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

## 1. INTRODUÇÃO

Parasitologia é a ciência que estuda o fenômeno parasitismo. Parasitismo é uma relação ecológica resultante da associação de dois ou mais organismos do mesmo grupo taxonômico ou de grupo distinto em relações metabólicas e genéticas, com maior ou menor dependência entre ambos, em pelo menos uma etapa de seu ciclo de vida. Chamam-se parasitos os organismos que encontram seu nicho ecológico em outro organismo, chamado hospedeiro (Araújo *et al.*, 2003). Consideram-se parasitos desde fragmentos de material genético em genoma de células, até animais vertebrados ou vegetais.

Um dos ramos da parasitologia, a paleoparasitologia, originou-se da paleopatologia, o estudo de doenças em populações antigas (Ruffer, 1921), e recebeu este nome no ano de 1979, quando o pesquisador Luiz Fernando Ferreira definiu, dessa forma, a busca por parasitos em material arqueológico ou paleontológico.

Os estudos paleoparasitológicos, no entanto, iniciaram-se bem antes, no início do século XX quando o médico francês Sir Marc Armand Ruffer (1910) aplicou técnicas de reidratação a tecidos mumificados e encontrou ovos de *Schistosoma haematobium* (Trematoda: Digenea: Schistosomatidae) em fígado de múmias egípcias. Foi o início da busca de parasitos e diagnóstico de doenças em populações do passado.

Um importante grupo de parasitos que se encontra com técnicas paleoparasitológicas é o dos helmintos, que possui representantes nos filos Platyhelminthes e Nematelminthes, e são parasitos intestinais de diversos animais e humanos. Ovos de helmintos podem ser recuperados pelo estudo dos coprólitos, que são fezes mineralizadas ou preservadas pela dessecação, encontrados comumente no sedimento de sítios arqueológicos como resultado da atividade humana no lugar. Os coprólitos podem ser retirados do interior do tubo digestivo de múmias, diretamente do solo em sua forma original ou fragmentados e amorfos, no sedimento da área pélvica de restos ósseos encontrados sepultados, ou ainda em latrinas utilizadas para despejo de dejetos humanos, principalmente da época romana e medieval da Europa.

No passado, os parasitos em coprólitos eram obtidos pelo método de reidratação em solução aquosa a 2% de hidróxido de sódio (NaOH) e 0,5% de ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (Araújo, 1987). Essa técnica caiu em desuso quando na década de 1960 Callen e Cameron (1960) desenvolveram a reidratação de coprólitos com o uso de solução aquosa de fosfato trissódico (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a 0,5% que garantia a



integridade das formas evolutivas dos parasitos recuperados. A partir de então os achados parasitológicos se tornaram cada vez mais freqüentes e as equipes de arqueologia passaram a contribuir, cada vez mais, não só fornecendo o material para análise, mas nas discussões e interpretação dos resultados (Reinhard *et al.*, 1988; Gonçalves *et al.*, 2002; Sianto *et al.*, 2003).

Dentre os achados paleoparasitológicos da América, destacam-se os estudos pioneiros na Fundação Oswaldo Cruz que refutaram a crença de que as infecções parasitárias não eram significantes na pré-história do Novo Mundo pelo encontro de ovos de helmintos como *Trichuris trichiura* (Nematoda: Trichuroidea) e ancilostomídeos (Nematoda: Strongylida), em coprólitos datados de épocas pré-colombianas. Tais achados, além de eliminar a teoria de que tais parasitos tinham vindo para o Novo Mundo com as expedições portuguesas e o tráfico de escravos africanos, reforçou teorias de colonização do continente americano até então desacreditadas (Ferreira *et al.*, 1980; 1983a; 1988; Confalonieri, 1983; Araújo, 1987).

Araújo, em sua tese de doutorado em 1987, explica que a dispersão de ancilostomídeos pelo estreito de Bering seria impossível por causa da temperatura do solo demasiadamente baixa e defende que tal parasito chegou à América pré-colombiana por meio de rotas marítimas de povos primitivos. A mesma teoria é aplicável a *Trichuris trichiura* que, assim como os ancilostomídeos, depende de temperaturas ideais de solo para completar seu ciclo de vida e portanto da mesma forma que os citados anteriormente não teria chegado ao continente pela Beríngia.

*Enterobius vermicularis* é outro nematóide humano comumente encontrado em restos arqueológicos da América pré-colombiana (Gonçalves *et al.*, 2003). Este, no entanto, possui transmissão direta hospedeiro-hospedeiro e pode ter sido trazido tanto pela travessia marítima ou pela Beríngia.

O encontro de parasitos de animais em coprólitos de origem humana não é raro (Gonçalves *et al.*, 2003) e mostram como as zoonoses conhecidas hoje já eram freqüentes em tempos remotos. O termo zoonose aplica-se às parasitoses ou doenças de animais que se transmitem eventualmente ao homem (Rey, 2001). Essa transmissão é possível pois a determinação de hospedeiros de parasitos faz-se por processo evolutivo ou seja, existe uma especificidade parasitária que determina fisiológica ou ecologicamente quais os hospedeiros apropriados para os vários parasitos.

Pode-se dividir parasitos em parasitos estenoxenos, como são chamados aqueles estreitamente adaptados a um único hospedeiro, ou a hospedeiros pertencentes a grupos zoológicos filogeneticamente muito próximos, possuindo assim alta especificidade; e

parasitos eurixenos que admitem ampla variedade de hospedeiros possíveis, às vezes, a grupos zoológicos bastante distanciados filogeneticamente, ou seja, têm baixa especificidade sendo parasitos de amplo espectro.

Um bom exemplo do encontro de parasitos de origem animal em humanos é dado por Baer (1969), em infecções recentes, e Ferreira *et al.* (1984), em populações pré-históricas, em seus trabalhos sobre a presença do gênero *Diphyllobothrium* (Cestoda) em populações peruanas e chilenas. Jean Baer, parasitologista suíço, foi chamado ao Peru para estudar parasitos encontrados em pessoas com quadro clínico intestinal. Os ovos encontrados se assemelhavam aos de *Diphyllobothrium latum*, mas com tamanho bem menor. As populações da região da costa do Pacífico consomem uma comida preparada com carne crua de peixe marinho, conhecida como *cebiche*. Baer identificou nos pacientes a espécie *D. pacificum*, parasito de leões marinhos, cujas larvas contaminam peixes e crustáceos de água salgada. Baer levantou a hipótese de que populações pré-históricas também teriam essa parasitose, face à semelhança dos vasilhames de cerâmica, vistos por ele no museu de Lima, com os utilizados na atualidade para servir esse prato tradicional nas ruas da cidade. Sua hipótese foi confirmada anos mais tarde pelo encontro de ovos de *D. pacificum* em coprólitos chilenos datados de 4.000 anos por Ferreira *et al.* (1984) que comentam a coincidência desses achados. Outros pesquisadores também confirmaram a presença desse parasito em populações pré-históricas da costa do pacífico (Patruco *et al.* 1983; Reinhard & Barnum, 1991; Reinhard & Urban, 2003).

Assim como os peruanos, os índios brasileiros mantiveram seus hábitos alimentares tradicionais e obtêm proteína animal por meio da caça de animais silvestres (Morán, 1990; Melatti, 1993). Muitos dos animais caçados são hospedeiros naturais de parasitos, incluindo helmintos (Futuyma, 1986; Hoberg, 1997; Rey, 2001).

A identificação de parasitos de animais silvestres em amostras de coprólitos humanos de diversos períodos históricos, fornece informações sobre a ocorrência desses parasitos em populações antigas. Fornece, ainda, subsídios sobre a fauna silvestre e sua relação com a saúde de humanos pré-históricos e atuais, ajudando a compreender melhor como se dá a circulação de parasitos entre hospedeiros animais e humanos bem como, as circunstâncias ecológicas e sociais que favorecem o aparecimento, a manutenção ou o desaparecimento de parasitos nas diversas populações. Permite ainda, estudos sobre hábitos alimentares que podem estar perpetuados até a atualidade, ou que foram interrompidos por processos culturais, ajudando o diagnóstico de parasitoses

intestinais desconhecidas e contribuindo para estudos sobre a saúde de populações indígenas.

Diante das modificações ecossistêmicas, culturais, e sociais ocorridas durante os séculos de colonização do Brasil e as mudanças advindas da fragmentação e isolamento de ambientes naturais, o estudo das zoonoses do passado pode ajudar a compreender os processos de reemergência e emergência das doenças no futuro. Assim, os estudos de paleoparasitologia podem ser aplicados a questões de saúde pública, de expressão importante para grupos de determinadas culturas cujos hábitos alimentares podem levar a patologias significativas.

O objetivo geral deste trabalho é chamar atenção sobre a possibilidade de infecção humana por parasitos da fauna silvestre em populações pré-históricas. Toma-se como exemplo, um estudo de caso proveniente de um sítio arqueológico no Estado de Minas Gerais, cujas análises mostraram um parasito não específico de humanos.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar em amostras de coprórito humano a presença de parasitos não humanos.
- Buscar identificar os hospedeiros intermediários e definitivos naturais das espécies encontradas.
- Avaliar se os parasitos de animais, encontrados nas amostras de coprólitos humanos, representam casos de parasitismo verdadeiro ou falso.
- Relacionar a ocorrência dos parasitos identificados com as infecções parasitárias atualmente encontradas.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. DIAGNÓSTICO DO MATERIAL UTILIZADO NESTE ESTUDO**

Foram coletadas amostras de coprólitos do que restou do tubo digestivo do corpo de um adulto, possivelmente do sexo masculino, encontrado sepultado em fossa oval, parcialmente mumificado por processo natural, datado entre 600 e 1200 A.P. Esta múmia, juntamente com outros cinco corpos e restos de ossos, formam os sepultamentos do sítio arqueológico da Lapa do Boquete, no vale do rio Peruaçu, conforme descrito por Prous & Schlobach (1997) da equipe de arqueologia do Museu de História Natural da Universidade Federal de Minas Gerais. Apesar da quantidade de sepultamentos no sítio, apenas a múmia analisada neste trabalho apresentava conteúdo fecal e pôde ser utilizada nos estudos paleoparasitológicos.

O sítio está localizado na Área de Proteção Ambiental Cavernas do Peruaçu, que possui uma área de 143.866 ha e perímetro de 229 km, no município de Januária, norte de Minas Gerais (Figura 1). A vegetação da região é composta pelo cerrado recortado por matas de galeria (Figura 2). O rio Peruaçu é o rio principal, corta o vale de mesmo nome e é um dos vários afluentes do rio São Francisco que mesmo se mantendo subterrâneo em períodos de maior estiagem, garante abastecimento contínuo de água na região (IBAMA, 2003).

Foram analisadas quatro amostras de coprólitos de partes diferentes da cavidade abdominal desse corpo mumificado para realização de exames da dieta e parasitos intestinais. As amostras foram retiradas em duas oportunidades. Na primeira coletaram-se fragmentos soltos do interior da cavidade pélvica. Na segunda, procedeu-se à limpeza, com pincéis, revelando-se o coprólito com sua forma mantida no interior do reto (Figuras 3, 4 e 5).

#### **3.2. ANÁLISE LABORATORIAL**

Parcelas de fragmentos soltos e materiais colhidos do interior do coprólito, em torno de 2 a 3 cm, foram reidratados em solução aquosa de fosfato trissódico a 0,5% por um período de 72 horas (Callen & Cameron, 1960), homogeneizados e coados em gaze dupla dobrada quatro vezes para cálices cônicos para sedimentar, segundo a técnica preconizada por Lutz, (1919) para diagnóstico da esquistosomíase mansônica e adotada no Laboratório de Paleoparasitologia como a mais indicada (Reinhard *et al.*, 1986).

### **3.2.1. Análise da dieta**

Para estudo da dieta, analisou-se o material retido na gaze em lupa estereoscópica. Todos os fragmentos vegetais encontrados como grãos de amido, fitólitos e outros, bem como restos animais e fragmentos minerais foram catalogados, fotografados e identificados quando possível para identificação de restos alimentares no momento da morte do indivíduo.

### **3.2.2. Análise parasitológica**

O material que percolou pela gaze no momento da filtração foi mantido em repouso por 24 horas para análise parasitológica, segundo a técnica de sedimentação espontânea de Lutz (1919). Com o sedimento acumulado foram montadas 80 lâminas (20 de cada amostra), analisadas em microscópio óptico (400X) segundo procedimentos de rotina adotados em análise paleoparasitológica (Reinhard *et al.*, 1986; Bouchet *et al.*, 2003).

Todos os ovos de helmintos não deformados encontrados foram catalogados, medidos (comprimento e largura) com ocular micrométrica, fotografados sendo as imagens digitalizadas para fins de registro e comparação com dados morfométricos de literatura para determinação de origem e identificação. Em breve, segundo acordo estabelecido entre o laboratório de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública com o Laboratório Harold Manter da Universidade de Nebraska e o Laboratório de Paleoparasitologia da Universidade de Reims, todas as imagens estarão disponíveis em rede para consulta de interessados.

### **3.2.3. Quantificação do número de ovos por grama de coprólito**

A quantificação do número de ovos por grama de coprólito pode ajudar a diferenciar falso parasitismo de infecção verdadeira. Segundo Reinhard (1990) uma grande quantidade de ovos nas fezes indica infecção verdadeira, já uma pequena quantidade de ovos por grama de coprólito, ou o encontro de ovos isolados, é mais indicativa de um caso de falso parasitismo, embora isso possa se modificar no decurso da infecção.

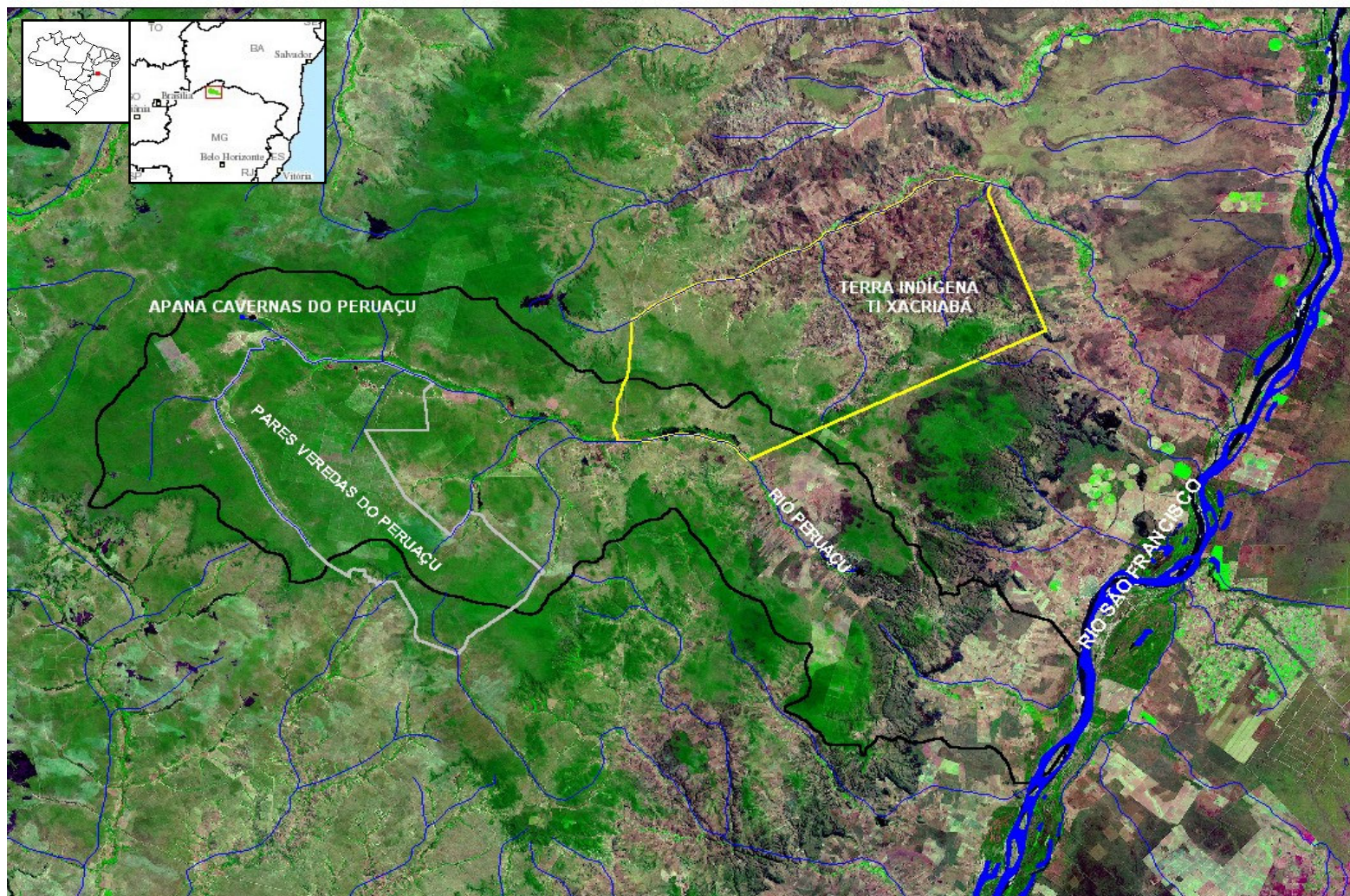
Para quantificação do número de ovos por grama de coprólito, foi utilizada a metodologia desenvolvida por Warnock & Reinhard (1994) adaptada do método de quantificação palinológica. Um tablete contendo 12.542 esporos de *Lycopodium* sp. (Lycopodiaceae) (Figura 6) foi dissolvido em ácido clorídrico a 10% e adicionado a

meio grama de coprólito seco reidratado. *Lycopodium* sp. é uma planta de altas altitudes e não é encontrada na região de Minas Gerais. O coprólito contendo os esporos de *Lycopodium* sp. foi homogeneizado, peneirado e centrifugado até obtenção do sedimento. Trinta lâminas foram montadas e examinadas. Todos os esporos de *Lycopodium* sp. e ovos de helmintos encontrados foram contados. Para efetuar o cálculo utilizou-se a fórmula adaptada da original de Maher (1981) para concentração polínica:

$$\text{Ovos/grama} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ de ovos} / \text{n}^\circ \text{ de esporos}) \times 12.542]}{\text{gramas de coprólito utilizado}}$$

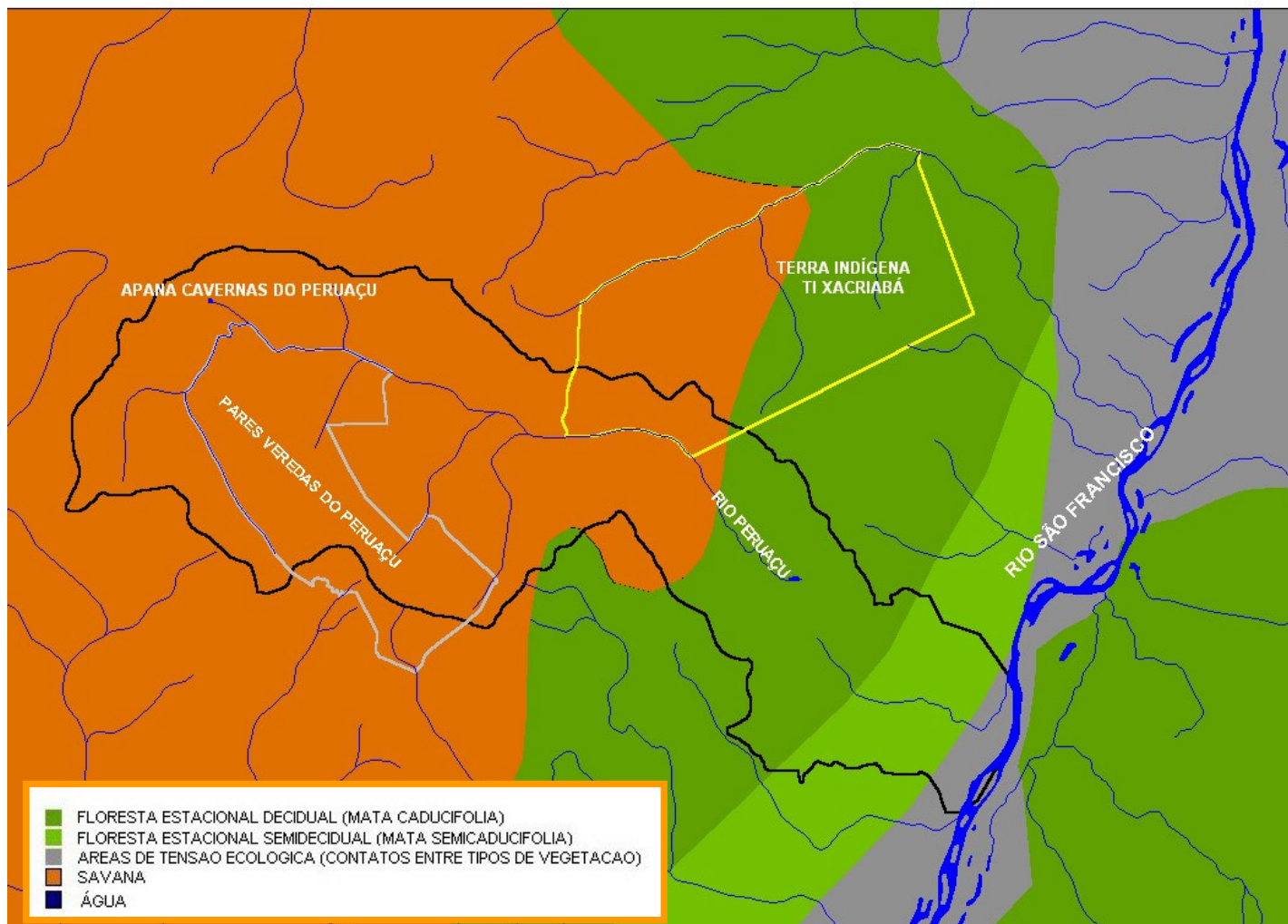
#### **3.2.4. Estudo estatístico**

Para facilitar a identificação de espécies não comumente encontradas, os ovos de helmintos obtidos dos coprólitos foram confrontados com material de referência composto por ovos retirados de exemplares adultos identificados, existentes em coleção zoológica. Tal análise teve como objetivo a confrontação da dispersão das medidas de comprimento e largura dos ovos encontrados no coprólito e os identificados. Para tanto, os ovos foram medidos em ocular micrométrica (400x) e comparados com as medidas obtidas dos ovos de helmintos encontrados no coprólito. Foram analisadas as medidas de comprimento e largura dos ovos, suas médias, variância, desvio padrão, e construídos gráficos de dispersão dessas medidas.



**Figura 1: Imagem de satélite mostrando a Área de Proteção Ambiental Cavernas do Peruaçu, MG, Brasil. Retirada da base de dados da EMBRAPA em setembro de 2004.**





**Figura 2: Mapa temático mostrando a vegetação que compõe a Área de Proteção Ambiental Cavernas do Peruaçu, MG, Brasil. Retirado da base de dados do IBGE, 2004.**



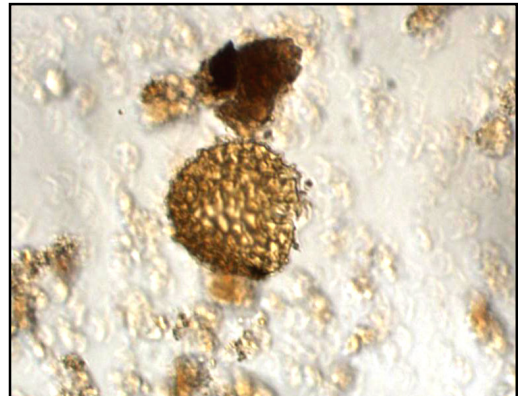
**Figura 3: Pelve com coprólito no interior. Visão caudal.**



**Figura 4: Pelve com coprólito. Visão posterior.**



**Figura 5: Pelve com coprólito (detalhe).**



**Figura 6: *Lycopodium* sp. Microscópio eletrônico 600x.**

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DIETA

Macroscopicamente, a maior parte do material analisado compunha-se de fibras vegetais do tipo encontrado em raízes e/ou tubérculos. Esse material foi identificado como mandioca (*Manihot* sp.) por sua morfologia, forma dos pêlos radiculares e encontro de grãos de amido característicos nos restos microscópicos (Figura 7). Pedacos do tegumento de sementes foram classificados como sendo de feijão (*Phaseolus* sp.) e um tipo de epiderme vegetal, porosa e densa foi identificada como pertencente a um fruto, provavelmente da família Myrtaceae.

Foram encontrados restos de insetos (Figura 8), fragmentos de ossos identificados como de peixe (Figura 9) e fragmentos de carvão. Não foi encontrado qualquer outro tipo de osso, pêlo ou resto alimentar que indicasse o consumo de outro tipo de animal vertebrado além do peixe.

A análise microscópica revelou a presença de esporos de fungos e restos vegetais diversos como pêlos (espinho), fitólitos, células esclerenquimatosas, ráfides, traqueídeos e grãos de amido (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

### 4.2. ANÁLISE PARASITOLÓGICA

Ao exame parasitológico encontraram-se dois tipos de ovos de helmintos: os primeiros, identificados como de Nematoda, têm forma elipsóide e apresentam casca fina e massa embrionária clara, classificados como pertencentes à família Ancylostomidae e com amplitude de medidas variando de 57,5 – 65 x 35 – 40  $\mu$ m e tamanho médio de 63,12 (SD 2,74) x 37,81 (SD 2,23)  $\mu$ m (N=5) (Figuras 16 e 17).

Ovos de cor amarelada, não embrionados, com casca fina e opérculo (ou somente a abertura), apresentando na extremidade oposta um ligeiro engrossamento da casca foram identificados como pertencentes à classe Cestoda ou Trematoda (Figuras 18 e 19). Mediu-se um total de 37 ovos. O tamanho médio dos ovos foi de 99,76 (SD 4,97) x 63,97 (SD 4,52)  $\mu$ m, e sua amplitude, ficou entre 90-107,5 x 55-73,3  $\mu$ m. Apenas os ovos não deformados e com opérculo tiveram suas medidas consideradas para diagnóstico. Encontraram-se também ácaros (Arachnida: Acarina), porém ainda não identificados (Figura 20).

#### **4.2.1. Quantificação do número de ovos por grama de coprólito**

A quantificação dos ovos de Cestoda/Trematoda encontrados foi calculada em aproximadamente 8.300 ovos por grama de coprólito seco.



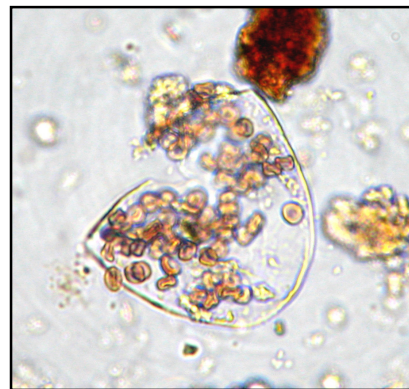
**Figura 7: Grão de amido (400x).**



**Figura 8: Exoesqueleto de inseto (400x).**



**Figura 9: Fragmentos de ossos.**



**Figura 10: Esporos de fungos (400x).**



**Figura 11: Grãos de amido (400x).**



**Figura 12: Traqueídeos (400x).**



**Figura 13: Células esclerenquimatosas (400x).**



**Figura 14: Células esclerenquimatosas (400x).**



**Figura 15: Pêlo (espinho) vegetal (400x).**



Figura 16: Ovo de Ancylostomidae (400x).



Figura 17: Ovo de Ancylostomidae (400x).

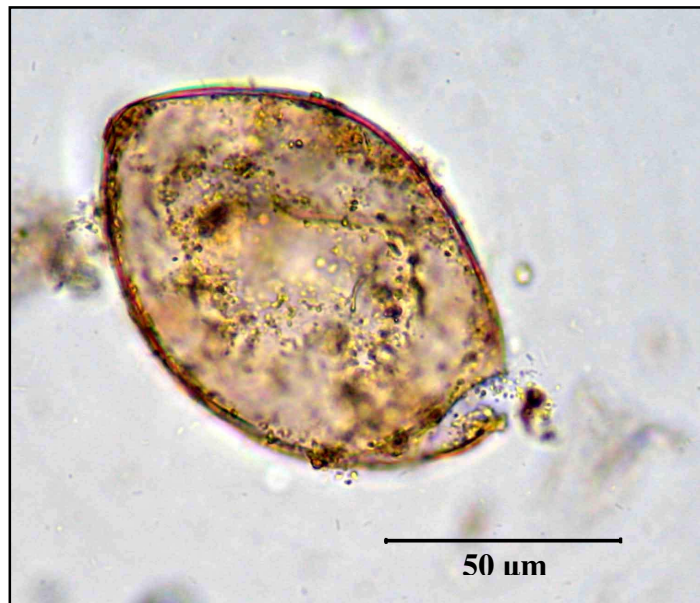


Figura 18: Ovo de *Echinostoma* sp. (400x).

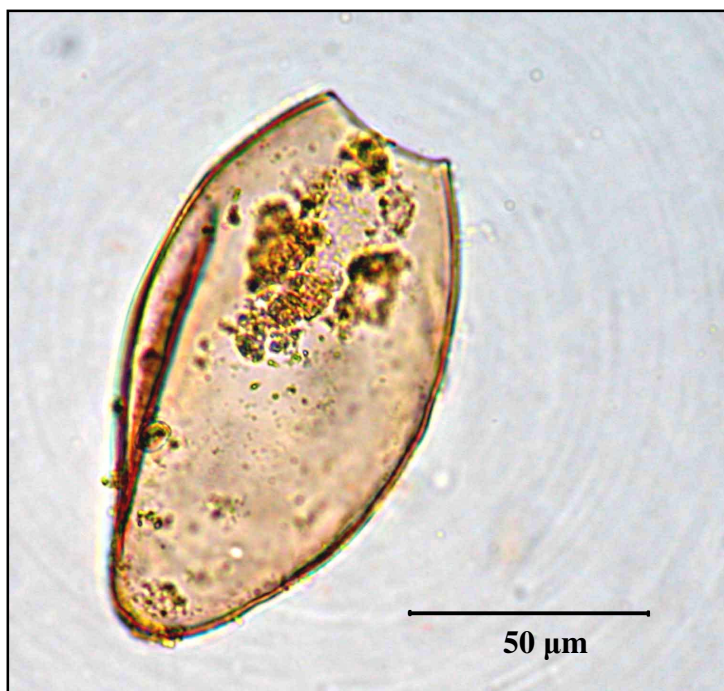


Figura 19: Ovo de *Echinostoma* sp. (400x).

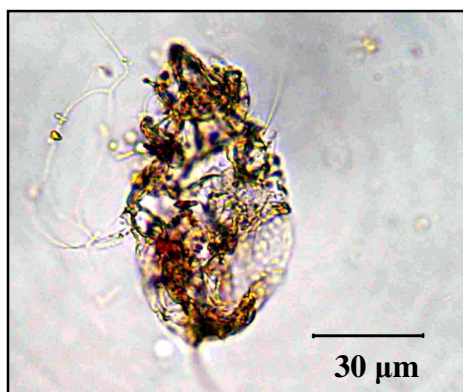


Figura 20: Ácaro (400x).



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. A RESPEITO DO TRABALHO EM PALEOPARASITOLOGIA

O primeiro aspecto a ser discutido quando se trabalha com paleoparasitologia é a origem do material que está sendo analisado, se humano ou animal.

Quando os coprólitos são encontrados no ambiente, ou seja, no sedimento de sítios arqueológicos, deve-se empregar técnicas capazes de determinar sua origem zoológica. Informações obtidas no local de coleta, como a posição do coprólito no sedimento em relação ao sítio arqueológico, sua associação com outros vestígios orgânicos, a quantidade de fragmentos, e quaisquer outras observações são importantes. No laboratório, os dados obtidos na coleta juntam-se a estudos morfométricos (diâmetro, comprimento e forma) dos coprólitos, uma vez que estes podem por si indicar a procedência do material (Chame *et al.*, 1991; Chame, 2003).

Deve-se proceder a estudos detalhados no laboratório. Exames dos restos alimentares macroscópicos e microscópicos podem indicar o consumo de animais ou vegetais e a observação de como esses itens se apresentam nos coprólitos podem indicar se os alimentos sofreram algum tipo de preparo antes do consumo, como por exemplo, passagem pelo fogo controlado, técnica usada somente por humanos.

Por fim, os testes parasitológicos complementam o diagnóstico da origem do material. Ao se encontrar parasitos específicos de determinadas espécies pode-se afirmar com certeza sua origem zoológica. Por exemplo, ao se firmar o diagnóstico de ovos de *Enterobius vermicularis* em um coprólito tem-se certeza de que o material é de origem humana, uma vez que este é um parasito específico da espécie humana (Wilke & Hall, 1975; Araújo & Ferreira, 1995; Hugot *et al.*, 1999). O mesmo ocorre com parasitos específicos para determinada espécie de animal hospedeiro.

Quando o material fecal é retirado diretamente do corpo de um humano, no entanto, sua procedência é indiscutível e assegura a especificidade dos resultados obtidos nas análises. Alguns parasitos, no entanto, são comuns a animais e humanos e, portanto, seu aparecimento em coprólitos de origem humana deve ser analisado com bastante cautela, podendo indicar que o indivíduo estava infectado.

Quando um parasito entra em contato com um hospedeiro não específico, pode ocorrer ou não uma associação entre ambos. Por exemplo, amebas de vida livre (Protozoa: Sarcomastigophora: Amoebida e Schizopyrenida), quando em contato com o ser humano podem desencadear quadros patológicos graves e matar o hospedeiro

(Roberts & Janovy 2000; Rey, 2001). O resultado mais comum desses encontros, no entanto, é a destruição do parasito pelo organismo do hospedeiro ou sua eliminação natural. A eliminação pelas fezes, por exemplo, de ovos de helminto não específico para determinado hospedeiro, e portanto incapaz de infectá-lo, representa um episódio conhecido como falso parasitismo.

No entanto, parasitos de animais podem infectar humanos. Alguns, apesar de geralmente não sobreviverem por muito tempo, conseguem causar doenças extremamente patogênicas que podem levar o indivíduo à morte (Cheng, 1973; Roberts & Janovy, 2000).

Assim, quando parasitos de animais são encontrados em material humano, o maior número possível de dados deve ser levado em consideração na busca de evidências que possam indicar se, de fato, se trata de parasitismo verdadeiro, falso parasitismo ou contaminação. Para evitar confusão, será feita aqui a diferenciação dos dois últimos termos citados em ordem.

O termo falso parasitismo é utilizado para descrever episódios de ingestão acidental de alguma forma evolutiva parasitária. Isto é comum quando alimentos contaminados são ingeridos sem cozimento ou tratamento apropriado. O alimento pode ser um hospedeiro definitivo contaminado que apresenta em seu organismo algum órgão repleto de formas evolutivas do parasito, ou ainda fêmeas adultas cujos ovários repletos de ovos são ingeridos juntamente com as vísceras do animal. Neste caso, os ovos ingeridos junto com o alimento passam diretamente pelo tubo digestivo do indivíduo que os consumiu, sem causar qualquer dano à saúde. Ao exame microscópico, suas fezes apresentam as formas evolutivas do parasito ingerido, no caso os mesmos ovos, sem no entanto, representar um caso verdadeiro de infecção parasitária. Tais episódios se devem à impossibilidade de infecção por falta de adaptação do parasito ao hospedeiro que o consumiu (Ferreira, 1973; Reinhard, 1990). Essa falta de especificidade impede que o parasito complete seu ciclo biológico ou se multiplique nesse hospedeiro. Caso o parasito ingerido possuísse a capacidade de infectar o indivíduo ou este a condição de ser parasitado, isto aconteceria apesar de não garantir uma condição clínica de doença. Um exemplo interessante foi o encontro de oocistos de uma espécie de *Eimeria* (Apicomplexa: Sporozoa) parasito de esquilos, em um corpo conservado mumificado nas turfeiras, da Europa, conhecido como *Bog Man de Grauballe* datado entre 1540 e 1749 anos AP (antes do presente) (Hill, 1990). Outro exemplo, foi o encontro de ovos de tricostrongilídeo (Strongylida: Trichostrongylidae) em fezes humanas retiradas de corpo mumificado de Itacambira, norte de Minas Gerais (Araújo *et al.*, 1984). Ainda

entre os achados de Araújo e a equipe de paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública destaca-se o encontro de ovos do nematóide do gênero *Meloydogine* em coprólitos de humano em Minas Gerais (comunicação pessoal). *Meloydogine* spp. são parasitos de plantas cujos ovos, uma vez consumidos pelo ser humano, passam direto pelo tubo digestivo sem causar infecção.

É importante não confundir o falso parasitismo com pseudoparasitismo e contaminação. O termo pseudoparasito se refere aos itens encontrados ao exame microscópico que se confundem com parasitos mas não o são, como por exemplo fungos, pólen, estruturas vegetais diversas e qualquer outro tipo de estrutura que faça lembrar uma forma evolutiva parasitária. Contaminação, como o nome diz, se refere à incorporação de elementos ou substâncias que não pertencem originariamente ao item examinado. Em fezes retiradas do solo, a exposição ao ambiente permite que sejam incorporados elementos diversos como areia, pólen, larvas de vida livre, exoesqueletos de insetos, sementes e diversos outros itens de origem animal, vegetal e mineral, além da contaminação fecal por outros animais e conseqüente presença de seus parasitos.

Para diferenciar cada caso, observações do local de coleta, da morfologia das fezes e exames laboratoriais específicos como análise da dieta, a identificação da espécie do parasita e de sua especificidade juntamente com outros estudos de diversas áreas, pode determinar o tipo de relação parasitária existente. Ao se obter diagnósticos precisos, crescem as possibilidades de estudos sobre origem e evolução de doenças e das relações evolutivas entre parasitos e hospedeiros.

## **5.2. DOS RESULTADOS DA ANÁLISE LABORATORIAL**

### **5.2.1. Dieta**

Entre os vegetais cultivados na região pelos habitantes pré-históricos do sítio do Boquete estão a mandioca e o feijão e uma Myrtaceae: *Eugenia dysenterica* DC. conhecida vulgarmente como cagaita (Veloso & Resende, 1992; Resende *et al.*, 1995; Cardoso & Resende, 2000), confirmando os achados nos coprólitos.

Fragmentos de carvão são comumente encontrados em coprólitos humanos, resultado do preparo de alimentos diretamente no fogo, sem utilização de qualquer tipo de recipiente para cozimento (Bryant & Willians-Dean, 1975; Ferreira *et al.*, 1980).

Os restos de insetos (pedaços de exoesqueleto) não puderam ser identificados taxonomicamente por serem pequenos e estarem muito fragmentados.

Os ossos encontrados não permitem identificação taxonômica da espécie do peixe por serem pequenos e fragmentados. Contudo, mostra que o indivíduo fazia uso de pescado em sua alimentação. O fato de não terem sido encontrados restos de nenhum outro animal vertebrado, além do peixe, não significa que estes não fossem consumidos, uma vez que os achados arqueológicos da região mostram que seus habitantes utilizavam a caça de animais silvestres como fonte alimentar regular (Prous, 1996).

A ausência de restos alimentares, que indiquem o consumo de outros animais vertebrados além do peixe, diminui as chances dos ovos encontrados terem sido consumidos juntamente com algum hospedeiro definitivo infectado, o que representaria um caso provável de falso parasitismo.

### 5.2.2. Análise parasitológica

Os ácaros encontrados nas amostras ou foram consumidos com algum alimento ou são contaminantes *post mortem*, mas não se tem diagnóstico específico, ainda em curso.

Os ovos de ancilostomídeos podem ser de *Necator americanus* ou *Ancylostoma duodenale*, mas não é possível identificar a espécie pela morfometria, uma vez que ambos apresentam morfologia e tamanhos muito próximos.

Os ovos operculados encontrados pertencentes às classes Cestoda ou Trematoda foram comparados com dados disponíveis em literatura sobre morfometria de ovos e com o banco de dados do laboratório de paleoparasitologia para identificação.

Ovos de *Diphyllobothrium* spp. (Cestoda), Fasciolidae, Echinostomatidae e *Paragonimus* spp. (Trematoda) apresentam características morfológicas semelhantes e podem ser confundidos, se não se levar em consideração detalhes morfológicos e de tamanho. Os ovos encontrados neste estudo não apresentavam escudos no opérculo, característico nos ovos de *Paragonimus* spp., e portanto, apesar do tamanho aproximado (84-117 x 53-76  $\mu\text{m}$ ), a possibilidade dos ovos encontrados pertencerem a este gênero foram descartadas (Cheng, 1973; Cabaret *et al.*, 1999; Sloss *et al.*, 1999).

Ovos do gênero *Diphyllobothrium* foram encontrados em coprólitos humanos na América do Sul e identificados como de *D. pacificum*, sem ocorrência no Brasil, em período pré-colombiano (Patrucco *et al.*, 1983; Ferreira *et al.*, 1984; Reinhard & Urban, 2003). No entanto, tanto para *D. pacificum* como para *D. latum*, as medidas dos ovos são inferiores aos encontrados neste estudo (~70 x 50  $\mu\text{m}$ ).

*Fasciola hepatica* pertence à família Fasciolidae (Echinostomatida) e seus ovos são morfologicamente semelhantes aos encontrados, mas com valores de comprimento de 130–150  $\mu\text{m}$ , sendo, dessa forma, diferenciados (Roberts & Janovy, 2000).

Os ovos do gênero *Echinostoma* apresentam morfologia e tamanho idênticos aos ovos encontrados neste estudo e, portanto, foram identificados como pertencentes a esse gênero. Este diagnóstico foi feito por levantamento sistemático da literatura sobre medida e morfologia dos ovos. Espécies de Echinostomatidae (Digenea: Echinostomatida) parasitam todas as classes de vertebrados e têm várias espécies de molusco como hospedeiro intermediário, além de girinos, planárias e peixes (Roberts & Janovy, 2000). As medidas dos ovos entre as espécies de *Echinostoma* encontradas comumente em literatura variam de 62 – 128 x 38,4 – 86  $\mu\text{m}$ , correspondentes aos ovos encontrados.

No estado de Minas Gerais descreveu-se *E. rodriguesi* em molusco *Physa rivalis* (Gastropoda: Pulmonata) (Hsu *et al.*, 1968) e estudos realizados com o rato d'água *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae), mostraram que este roedor é hospedeiro natural de *E. paraensei* (Maldonado Jr. *et al.*, 2001b). Esta espécie apresenta ovos com medidas entre 104 – 122 x 74 – 86  $\mu\text{m}$  sendo bem maiores do que os encontrados nos coprólitos. Os ovos de *E. rodriguesi* apresentam valores entre 96 – 128 x 56 – 68  $\mu\text{m}$ , também maiores, ainda que com sobreposição na medida de alguns ovos. *E. lindoense*, parasita mamíferos e aves e foi descrito a partir de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda: Pulmonata) em Minas Gerais (Lie, 1968). Os ovos desta espécie variam de 104-116 x 64-74  $\mu\text{m}$  e são portanto maiores do que os encontrados na múmia deste estudo. Atualmente *E. lindoense* é considerado sinonímia de *E. echinatum* (Fried & Graczyk, 2000; Roberts & Janovy, 2000). Este parasita humanos na Ásia e é, portanto, se considerada a sinonímia, a única espécie de *Echinostoma* com ocorrência no Brasil capaz de parasitar humanos.

Recentemente, uma nova espécie foi descrita no Brasil, *E. luisreyi* (Maldonado Jr. *et al.*, 2003), com medidas de ovos variando entre 89-113 x 65-82  $\mu\text{m}$ , equivalentes àqueles encontrados nos coprólitos. Esse parasito foi obtido do molusco *Physa marmorata*, no município de Sumidouro, Rio de Janeiro. Os hospedeiros definitivos naturais ainda não são conhecidos mas infecções experimentais em laboratório foram obtidas em roedores (*Mus musculus* e *Mesocricetus auratus*).

Outras espécies brasileiras de *Echinostoma* cujos ovos possuem medidas semelhantes aos encontrados neste estudo são *E. erraticum* (75-112 x 49-67  $\mu\text{m}$ ), *E. exile* (93-121 x 56-65  $\mu\text{m}$ ), *E. neglectum* (75-105 x 38-64  $\mu\text{m}$ ) e *E. nephrocystis* (93-

116 x 47-79  $\mu\text{m}$ ), todas parasitos de aves, descritas por Lutz (1924). Estas espécies não foram mais encontradas e suas existências são contestadas por estudos internacionais.

No Brasil, 25 espécies do gênero *Echinostoma* foram descritas até o ano de 2001 como parasitos de animais (Travassos *et al.*, 1969; Maldonado Jr. *et al.*, 2001a). Atualmente esse número é aparentemente menor, mas se diferenciam quanto ao tamanho dos ovos, número de espinhos, distribuição geográfica e hospedeiros (Tabela 1 e Gráficos 1 e 2). Na revisão feita por Fried & Graczyk (2000) várias espécies foram classificadas como sinônimas de outras e num levantamento bibliográfico detalhado há várias espécies antes classificadas como pertencentes ao gênero *Echinostoma* que mudaram de gênero ou simplesmente não foram mais encontradas, como as acima descritas para aves, caindo em esquecimento.

A espécie mais comum em humanos na região das Filipinas e Indonésia é *E. ilocanum*, cujos ovos, curiosamente, têm tamanho compatível com os encontrados no corpo parcialmente mumificado de Minas Gerais, com medidas em torno de 83-116 x 58-69  $\mu\text{m}$  (Cheng, 1973), isto levanta aspectos interessantes sobre a possível presença de um parasito introduzido de outras regiões, no passado, e que não se manteve no continente. Além de *E. ilocanum*, duas outras espécies de *Echinostoma* que infectam humanos da Ásia e Europa apresentam tamanhos semelhantes aos da múmia: *E. macrorchis* (92-103,6 x 56-61  $\mu\text{m}$ ) e *E. revolutum* (88-115 x 60-74  $\mu\text{m}$ ), porém os registros de ocorrência humana de *E. revolutum* são duvidosos uma vez que esta espécie não parasita outros tipos de mamíferos (Tabela 2 e Gráficos 3 e 4). Assim, somente *E. macrorchis* ocorre em humanos com certeza (Haseeb & Eveland, 2000).

A possibilidade do parasito encontrado ser *E. ilocanum*, *E. macrorchis* ou *E. revolutum* é no entanto remota, embora não se deva afastá-la completamente. Pelas medidas dos ovos encontrados é provável que esta seja uma ocorrência humana de *E. luisreyi*, contudo, apenas as medidas dos ovos não são suficientes para fazer tal afirmação e outros testes seriam necessários para determinar a espécie encontrada neste estudo.

### **5.2.3. Quantificação do número de ovos por grama de coprólito**

O valor de 8.300 ovos por grama de coprólito é considerado elevado. Como foi visto na metodologia, este valor elevado é indicativo de um caso de infecção verdadeira.

Para fins de comparação, podemos ainda avaliar a quantidade de ovos por grama transformando a quantidade de coprólito na medida equivalente de fezes frescas. No

Laboratório de Parasitologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro foram produzidos coprólitos experimentalmente pela dessecação de fezes frescas. Esses experimentos gentilmente cedidos pela Professora Elaine Machado Martinez (comunicação pessoal) demonstraram que as fezes perdem em média 3,62 partes de água ao se transformarem em coprólitos. Assim, um grama de coprólito equivale a aproximadamente 3,62 gramas de fezes frescas e portanto, a quantificação de ovos por grama de fezes frescas no caso da múmia de MG seria de 2.293 ovos, valor considerado normal num quadro de infecção por determinadas espécies de *Echinostoma* (Huffman, 2000).

#### **5.2.4. Estudo estatístico**

Os ovos de *Echinostoma* sp. obtidos dos coprólitos foram comparados com material de referência composto por ovos de *Echinostoma luisreyi* (Figura 21) retirados do útero de fêmeas adultas identificadas, pertencentes à coleção do Dr. Arnaldo Maldonado do Instituto Oswaldo Cruz. O uso de *E. luisreyi* é justificado pela tentativa de confrontação de valores de comprimento e largura dos ovos deste parasito com aqueles encontrados no coprólito, uma vez que suspeita-se que ambos sejam a mesma espécie.

Como resultado, pudemos constatar que as distribuições da dispersão das medidas de comprimento e largura de *E. luisreyi* e *Echinostoma* sp. encontrado na múmia, são semelhantes (Gráfico 5).

Os valores das médias, variância e desvio padrão foram os seguintes: *Echinostoma* sp. (n=37) apresentou média igual a 99,76  $\mu$ m, variância 24,78 e desvio padrão 4,97 para comprimento e média 63,97  $\mu$ m, variância 20,50 e desvio padrão 4,52 para largura. *E. luisreyi* (n=37) apresentou média 98,85  $\mu$ m, variância 23,47 e desvio padrão 4,84 para comprimento e 60,60  $\mu$ m de média, variância de 14,37 e desvio padrão de 3,79 para largura.

Esses resultados, não são suficientes para dizer se ambos pertencem ou não à mesma espécie, ou seja, *E. luisreyi*. Somente dados biológicos combinados, ou um exame de DNA, podem vir a determinar a espécie de *Echinostoma* encontrada neste estudo.

### **5.3. A RESPEITO DOS HELMINTOS ENCONTRADOS**

#### **5.3.1. *Echinostoma* sp.**

Os ovos operculados encontrados no coprólito da múmia de Minas Gerais apresentam tamanho e morfologia compatível com o gênero *Echinostoma* e portanto foram assim identificados. *Echinostoma* sp., parasita todas as classes de vertebrados, além de humanos. Para determinar se este é um caso de falso parasitismo ou infecção verdadeira é necessário reunir evidências de testes laboratoriais e no conhecimento parasitológico a respeito do gênero *Echinostoma*, incluindo lista de espécies possíveis, conhecimento de hábitat, hospedeiros, formas de transmissão e considerações sobre a doença por ele provocada, a equinostomíase.

#### 5.3.1.1. O Ciclo biológico do *Echinostoma* spp.

Os parasitos do gênero *Echinostoma* apresentam um complicado ciclo de vida de sete gerações (ovo, miracídeo, esporocisto, rédia, cercária, metacercária e adulto) envolvendo dois hospedeiros intermediários e um hospedeiro definitivo. O ciclo depende, quase em sua totalidade, da presença de água para desenvolvimento dos estágios larvares.

Embora os hospedeiros, locais de penetração e desenvolvimento dos estágios larvares possam variar entre as espécies de *Echinostoma*, aqui se descreve somente o ciclo de vida típico que possibilita a infecção humana (Lie & Basch, 1967; Hsu *et al.*, 1968; Lie & Nasemary, 1973; Lo, 1995; Fried & Huffman, 1996; Fried & Graczyk, 2000; Toledo *et al.*, 2000).

1. Os **ovos** não embrionados são liberados junto com as fezes e entram em contato com a água. Após um período médio de dez dias, o ovo libera um **miracídeo** que nada e penetra ativamente em alguma parte mole do corpo do caramujo (primeiro hospedeiro intermediário).
2. Uma vez dentro do hospedeiro intermediário, geralmente no local da penetração, o miracídeo se transforma em **esporocisto**. Este migra para a cavidade cardíaca ou aorta, onde irá se desenvolver.
3. Depois de cerca de uma semana o esporocisto produz a primeira geração de **rédia**. Esta, por sua vez, irá produzir novas gerações de rédia (que podem ser várias). A primeira geração de rédia produz apenas rédia, mas da segunda geração em diante pode-se observar tanto produção de rédia como **cercária**.
4. Após migrarem para várias partes do corpo do hospedeiro, as cercárias aumentam de tamanho e são liberadas na água. O encistamento das cercárias ocorre na superfície ou dentro do segundo hospedeiro intermediário. O



segundo hospedeiro intermediário pode ser caramujo ou outro invertebrado, e ainda alguns anfíbios e peixes.

5. A cercária encistada, agora conhecida como **metacercária**, é ingerida pelo hospedeiro definitivo (neste caso o ser humano) quando este consome um hospedeiro intermediário contaminado. Uma vez dentro do organismo, a metacercária se desenvolve dando origem a **adultos** localizados em lugares específicos no tubo digestivo do hospedeiro.

#### 5.3.1.2. Equinostomíase

*Echinostoma* spp. infecta uma grande variedade de aves e mamíferos. Em humanos pode acarretar uma zoonose conhecida como equinostomíase, endêmica da região asiática, vinculada atualmente a pelo menos dezesseis espécies de Echinostomatídeos (Fried *et al.*, 2004). Seus sintomas envolvem anemia, diarreia, eosinofilia, dor abdominal entre outros (Graczyk & Fried, 1998). O ser humano pode se contaminar pela ingestão de molusco, peixe ou carne de anfíbios crus ou mal cozidos (Roberts & Janovy, 2000). O diagnóstico é feito pela presença geralmente em grande quantidade, de ovos não embrionados característicos nas fezes (Graczyk & Fried, 1998).

Dados de morbidade e mortalidade por equinostomíase são difíceis de serem obtidos principalmente, porque seus sintomas são os mesmos apresentados por outras doenças causadas por diversos trematódeos. Pobreza, desnutrição, condições sanitárias precárias e falta de fiscalização entre outros, são fatores que contribuem para a ocorrência da equinostomíase em vários países. Alterações nesse quadro, além de mudança de hábitos alimentares, são as medidas de controle e prevenção mais eficientes a serem adotadas (Fried *et al.*, 2004).

Existe um registro de infecção humana por *E. echinatum* no Brasil, no entanto, este caso foi considerado, na revisão feita por Fried & Graczyk (2000), como infecção isolada provavelmente adquirida fora do continente. Além deste, não existem outros relatos de equinostomíase no Brasil em nenhum período histórico.

#### 5.3.1.3. A manutenção do ciclo biológico do *Echinostoma* spp. no Vale do Peruaçu

A região em que o corpo foi encontrado apresenta condições ideais para a manutenção do ciclo de vida do *Echinostoma* spp. e, portanto, possibilidade de contato e infecção. Há cerca de 1200 anos (durante o Holoceno tardio) os cenários de clima,

vegetação e hidrografia eram bem semelhantes ao atual (Scheel-Ybert, 2001; Kipnis, 2002).

O Vale do Peruaçu apresentava características que possibilitavam uma ocupação permanente pelos seus habitantes. Na região do centro oeste é normal as árvores perderem suas folhas durante as estações de seca, no entanto, no Vale do Peruaçu as árvores mantêm-se verdes o ano todo e o fluxo de água é garantido pelo Rio Peruaçu, que mesmo subterrâneo em períodos de maior estiagem, garante abastecimento contínuo de água na região.

Ainda que se mantendo verdes durante todo o ano, a produção de frutos e sementes cai bastante durante a estação seca e, por isso, não é difícil imaginar que durante tais períodos os habitantes pré-históricos recorressem a uma alimentação mais rica em proteínas. Moluscos e peixes são encontrados abundantemente, independentemente da estação do ano (Souza *et al.*, 2001; Ibama, 2003) e foram provavelmente importante fonte alimentar para os moradores locais. É importante destacar que os moluscos tinham papel importante na cultura dos índios pré-históricos, que os utilizavam como adornos, instrumentos musicais, utensílios de cozinha e na alimentação, quando eram consumidos apenas a parte mole do animal (Prous, 1990; Moreira *et al.*, 1991). Infelizmente para este estudo, a parte mole dos moluscos consumidos não deixa vestígios na alimentação ao contrário do consumo total do animal quando é possível verificar a presença de rádulas nos restos alimentares.

Assim, num cenário como esse, o ciclo do *Echinostoma* spp. poderia ser mantido facilmente pela disponibilidade de água e de hospedeiros intermediários e definitivos diversos, incluindo o homem, que circulavam nas margens do rio alimentando-se de seus recursos.

### **5.3.2. Ancylostomidae**

O encontro de ovos de ancilostomídeos amplia a distribuição dessa infecção na América pré-colombiana e acrescenta novos dados ao debate sobre sua introdução.

Em 1974, Allison *et al.* descreveu o encontro de larvas de ancilostomídeos no intestino de uma múmia peruana datada de 890 a 950 A.D. (Ano Domini). Na América do Norte Faulkner *et al.* (1989) encontraram ovos de ancilostomídeos em coprólitos no Tennessee.

Os primeiros ovos de ancilostomídeos encontrados no Brasil datados da América pré-colombiana foram encontrados em coprólitos da Gruta do Gentio, município de Unaí, Estado de Minas Gerais (Ferreira *et al.*, 1980). Logo que este achado foi

publicado no *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, M. M. Kliks publicou uma crítica contestando a autenticidade dos resultados quanto à origem do coprólito (se humano ou animal), quanto a identificação dos ovos encontrados, a datação dos coprólitos e até mesmo a respeito do conhecimento da biologia do parasito por parte dos autores. A crítica de Kliks foi publicada nessa mesma revista no ano de 1982. Tal crítica em forma de carta ao editor além de fazer vários comentários contrários aos achados de Ferreira *et al.* (1980) ainda satiriza os autores com a seguinte frase: “...*all that glisters is not gold.*”. A resposta derrubando tais críticas foi publicada no ano seguinte com a frase: “... The archaeological site is at Minas Gerais, the Brazilian State where most of our gold mines are found, and there, very often *what glitters is really gold.*”, além de um novo artigo com achados de ovos de ancilostomídeos identificados em coprólitos retirados do interior de uma múmia do mesmo local (Ferreira *et al.*, 1983a; 1983b). Tanto a crítica de Kliks, quanto a resposta de Ferreira e seus artigos, foram publicados mais tarde no livro *Paleoparasitologia no Brasil* (Ferreira *et al.*, 1988).

Em 1987 Araújo defendeu sua tese de doutorado intitulada “*Paleoepidemiologia da Ancilostomose*”. Nela Araújo defende a teoria de que os ancilostomídeos não poderiam ter chegado a América junto com os primeiros habitantes pelo estreito de Bering principalmente pela baixa temperatura do solo, caráter desfavorável para a manutenção do ciclo biológico do parasito cujas larvas só eclodem e evoluem em solos com temperatura entre 23 e 30°C para *Ancylostoma duodenale* e 30 e 35°C para *Necator americanus* (Rey, 2001). As rotas marítimas transpacífica e transatlântica percorridas pelos homens primitivos em pequenas embarcações forneceriam condições favoráveis para o transporte desses parasitos para o Novo Mundo. No entanto, não foram ainda encontradas outras evidências, além das paleoparasitológicas, da existência dessas rotas e portanto qualquer inferência a elas vem gerando discussão no meio acadêmico.

Nos anos seguintes a discussão sobre a presença de ancilostomídeos na América pré-colombiana foi recebendo reforços tanto pelos achados de diversos sítios arqueológicos quanto pelas críticas que essas teorias continuaram causando no meio científico (Araújo & Ferreira, 1996; Araújo & Ferreira, 1997; Fuller, 1997; Reinhard *et al.*, 2001).

Entre as referências acima citadas é interessante destacar o artigo de Fuller (1997). Kathleen Fuller é antropóloga e publicou um artigo na *Medical Anthropology* no ano de 1997 questionando os achados sobre ancilostomídeos na América pré-

colombiana. Segundo ela, todos os achados de ovos, larvas e vermes adultos não passam de erros de diagnóstico e não aceita outra teoria além da que diz que os ancilostomídeos vieram para o Novo Mundo com os colonizadores europeus. Claro que esse artigo gerou reação dos pesquisadores cuja reputação e seriedade foram colocadas em dúvida. Uma resposta das equipes de paleoparasitologia norte e sul americanas foi publicada na mesma revista em 2001 (Faulkner & Patton, 2001; Reinhard *et al.*, 2001) evidenciando os erros de crítica cometidos por parte da antropóloga graças à sua falta de conhecimento em biologia e parasitologia.

Com o passar dos anos os achados de ancilostomídeos na América pré-colombiana começaram a ser citados e aceitos como verdadeiros (Desowitz, 1997; Rey, 2001; Náquira, 1990).

O encontro de ovos de ancilostomídeos na múmia de Minas Gerais é, assim, um achado importante que acrescenta novos dados à importante discussão da presença e distribuição dos ancilostomídeos no Novo Mundo antes da presença dos conquistadores europeus. A origem do coprólito utilizado neste estudo não pode ser contestada por ter sido retirado diretamente do tubo digestivo do indivíduo. A datação do corpo, apesar do intervalo de variação de 600 anos, tem uma origem pré-colombiana incontestável.

**Tabela 1: Lista das espécies de *Echinostoma* (Platyelminthes:Trematoda: Digenea) com ocorrência no Brasil.**

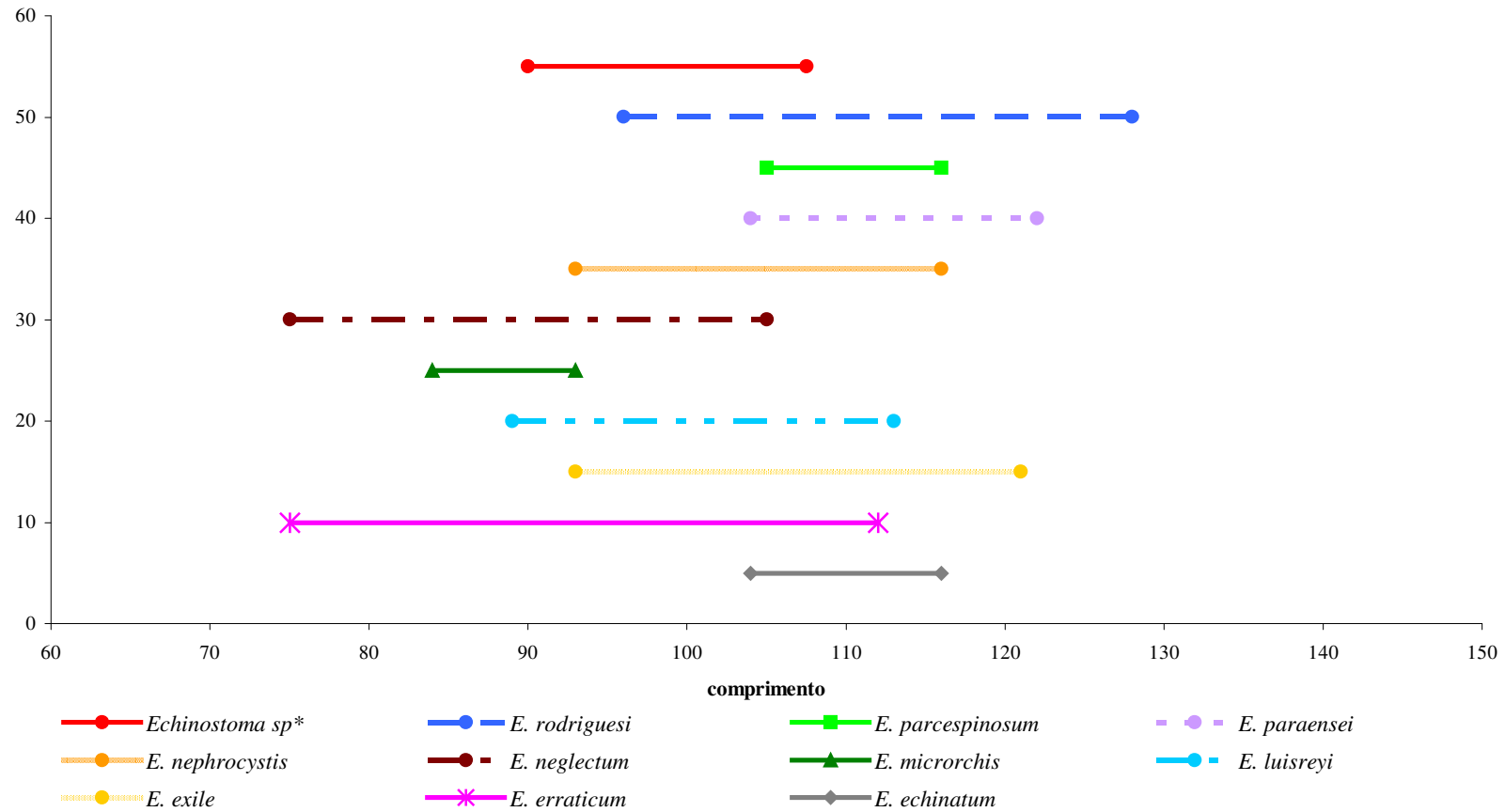
<b>Espécie</b>	<b>Nº de Espinhos (Colar Peristômico)</b>	<b>Tamanho dos Ovos em µm</b>	<b>Distribuição Geográfica</b>	<b>Hospedeiro Definitivo</b>	<b>Hospedeiro Intermediário</b>	<b>Referência</b>
<i>E. echinatum</i> * (Syn: <i>E. barbosai</i> , <i>E. lindoense</i> )	37	104-116 x 64-74	Europa, Ásia, Am. Sul, Minas Gerais, Pernambuco	aves**, mamíferos, homem	molusco	Lie (1968)
<i>E. erraticum</i>	36-39	75-112 x 49-67	Brasil	aves**	molusco	Maldonado <i>et al.</i> (2003); Lutz (1924); Kohn <i>et al.</i> (1975)
<i>E. exile</i>	--	93-121 x 56-65	Rio de Janeiro	aves**	molusco	Lutz (1924); Kohn <i>et al.</i> (1975)
<i>E. luisreyi</i>	37	89-113 x 65-82	Rio de Janeiro	mamíferos**	molusco	Maldonado <i>et al.</i> (2003)
<i>E. microrchis</i>	37	84-93 x 47-56	Rio de Janeiro	aves	--	Maldonado <i>et al.</i> (2003); Lutz (1924); Kohn <i>et al.</i> (1975)
<i>E. neglectum</i>	37-45	75-105 x 38-64	Rio de Janeiro	aves**	molusco	Lutz (1924); Kohn <i>et al.</i> (1975)
<i>E. nephrocystis</i>	35-42	93-116 x 47-79	Rio de Janeiro	aves**	--	Kohn <i>et al.</i> (1975)
<i>E. paraensei</i>	37	104-122 x 74-86	Rio de Janeiro, Minas Gerais	mamíferos	molusco	Maldonado <i>et al.</i> (2001); Fujino <i>et al.</i> (2000); Lie & Basch (1967)
<i>E. parcespinosum</i>	29-31	105-116 x 52-64	Rio de Janeiro	aves**	molusco	Lutz (1924); Kohn <i>et al.</i> (1975)
<i>E. rodriguesi</i> (Syn: <i>E. trivolvis</i> )	37-41	96-128 x 56-68	Minas Gerais, América do Norte	mamíferos, aves	molusco	Maldonado <i>et al.</i> (2001; 2003); Fried & Graczyk (2000); Fried <i>et al.</i> (2000); Fried & Huffman (1996); Hsu <i>et al.</i> (1968)

(\*) ocorrência humana

(\*\*) hospedeiro experimental

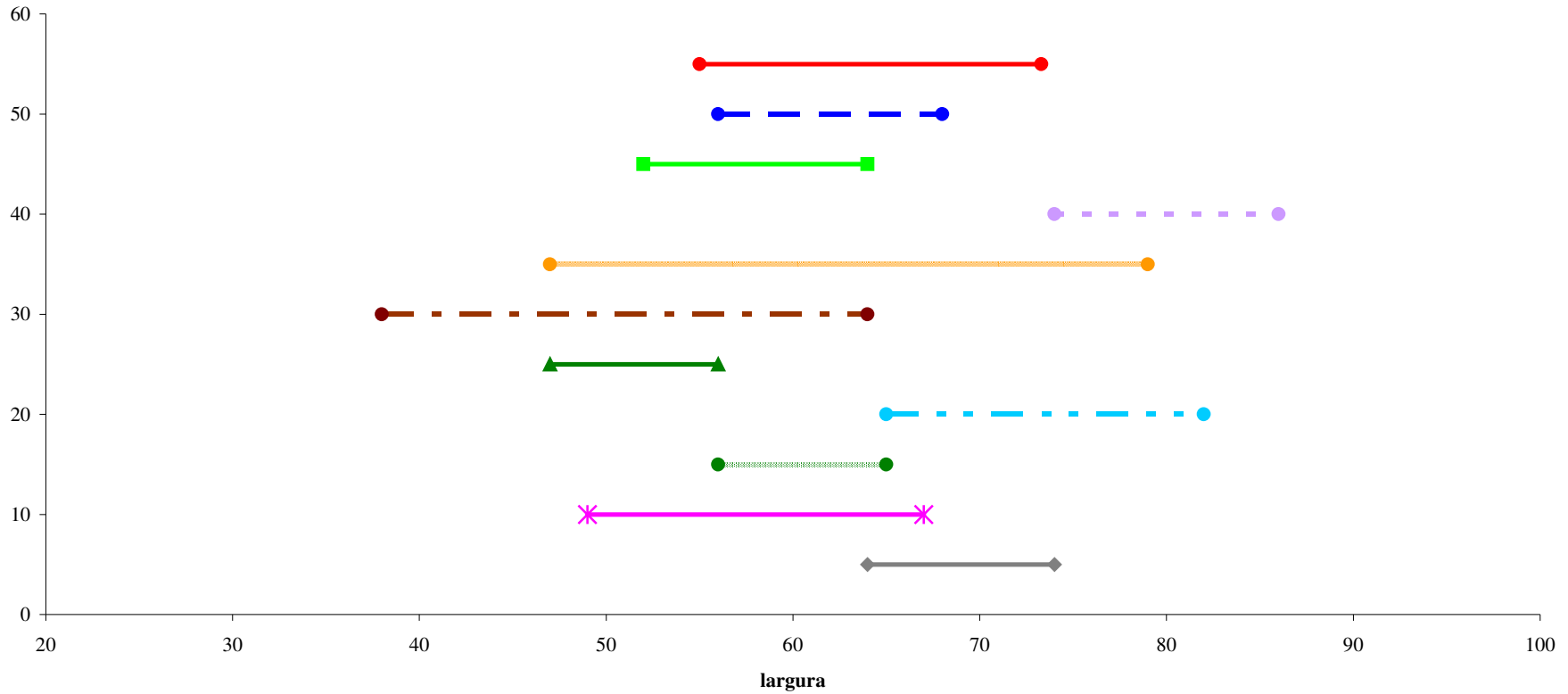
(-) informação não obtida pela autora

**Gráfico 1: Amplitude de medidas (µm) de comprimento de ovos das espécies de *Echinostoma* descritas no Brasil.**



\* Encontrado em corpo mumificado no Sítio Arqueológico da Lapa do Boquete, Vale do Peruaçu, Município de Januária, MG, Brasil.

Gráfico 2: Amplitude de medidas ( $\mu\text{m}$ ) de largura de ovos das espécies de *Echinostoma* descritas no Brasil.



—●— *Echinostoma sp\**    —●— *E. rodriguesi*    —■— *E. parcespinosum*    —●— *E. paraensei*    —●— *E. nephrocystis*    —●— *E. neglectum*

—▲— *E. microrchis*    —●— *E. luisreyi*    —●— *E. exile*    —\*— *E. erraticum*    —◆— *E. echinatum*

\* Encontrado em corpo mumificado no Sítio Arqueológico da Lapa do Boquete, Vale do Peruaçu, Município de Januária, MG, Brasil.

**Tabela 2: Lista das espécies de *Echinostoma* (Platyelminthes: Trematoda: Digenea) mais frequentes na bibliografia sem ocorrência no Brasil que apresentam registros de ocorrência humana.**

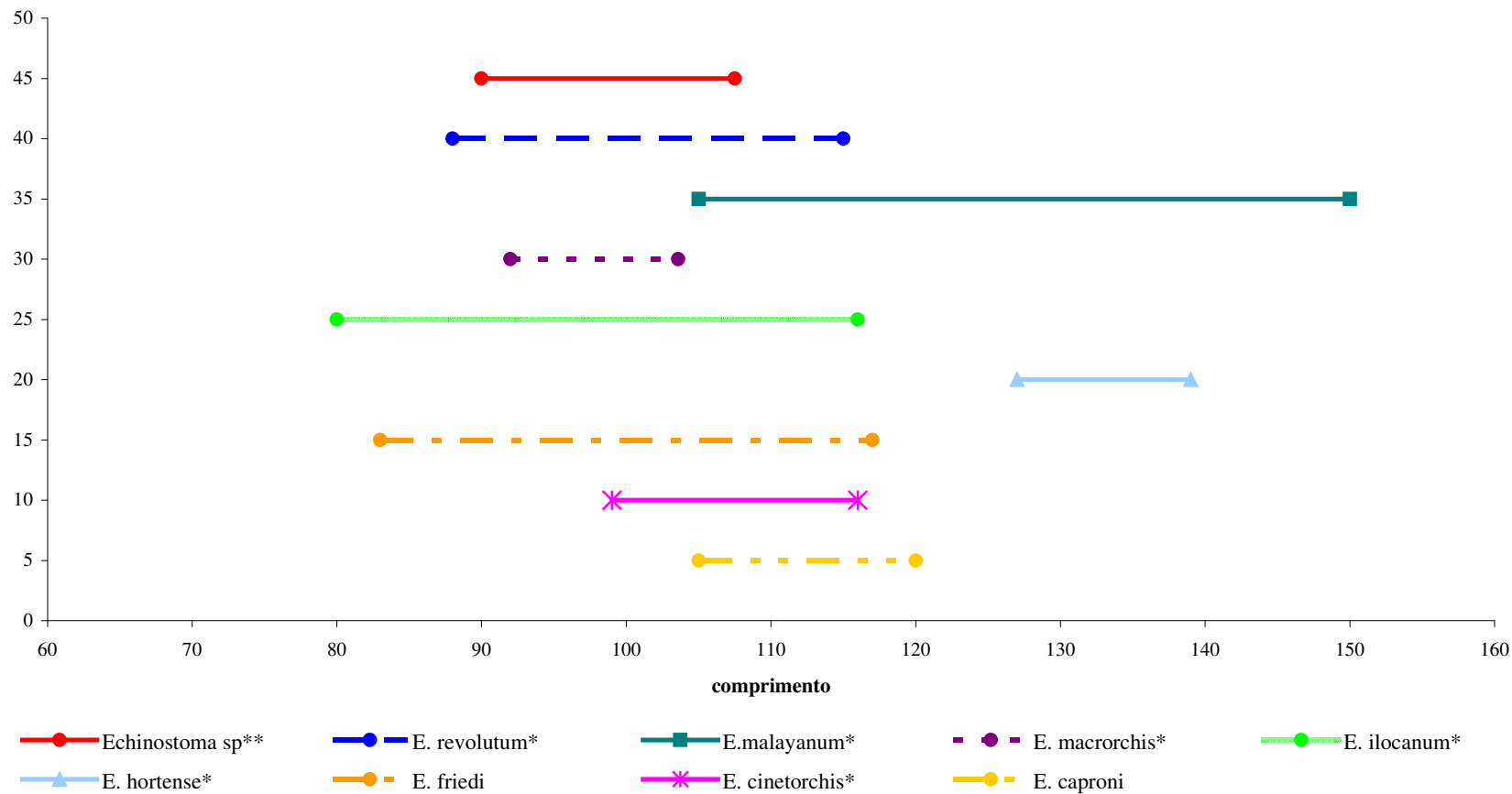
<b>Espécie</b>	<b>Número de Espinhos do Colar Peristômico</b>	<b>Tamanho dos Ovos em µm</b>	<b>Distribuição Geográfica</b>	<b>Hospedeiro Definitivo</b>	<b>Hospedeiro Intermediário</b>	<b>Referência</b>
<i>E. cinetorchis</i>	37	99-116 x 65-76	Ásia	mamíferos, homem	peixe, molusco, anfíbio	Chai & Lee (2002); Fried & Graczyk (2000)
<i>E. hortense</i>	27-28	127-139 x 71-81	Ásia	mamíferos, homem	peixe, molusco, anfíbio	Chai & Lee (2002); Fried & Graczyk (2000)
<i>E. ilocanum</i>	51	80-116 x 58-69	Ásia	mamíferos, homem	molusco	Kumar (1999); Cheng (1973); Lie & Nasemary (1973); Fried & Graczyk (2000)
<i>E. macrorchis</i>	45	92-103,6 x 56-61	Ásia	mamíferos, homem	molusco	Fried & Graczyk (2000); Lo (1995)
<i>E. malayanum</i>	43	105-150 x 63-87	Ásia	homem, mamíferos	molusco, peixe, anfíbio	Kumar (1999); Fried & Graczyk (2000)
<i>E. revolutum*</i>	37	88-115 x 60-74	Europa, Ásia	aves, homem	molusco, anfíbio	Travassos <i>et al.</i> (1969); Maldonado <i>et al.</i> (2001); Fried & Graczyk (2000); Kumar (1999)

(\*) ocorrência duvidosa

(-) informação não obtida pela autora



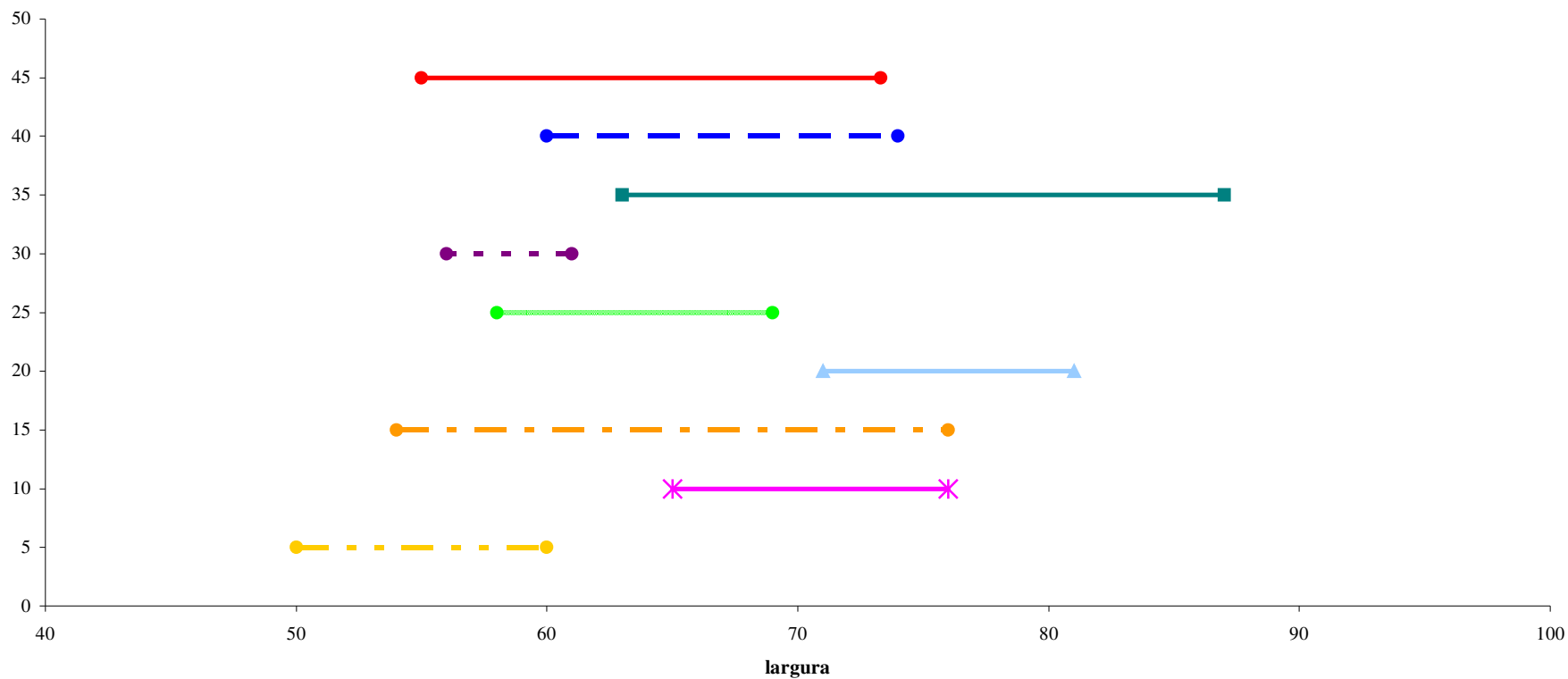
**Gráfico 3: Amplitude de medidas (µm) de comprimento de ovos das espécies de *Echinostoma* mais comumente encontradas na literatura, sem ocorrência no Brasil.**



\* Ocorrência humana.

\*\* Encontrado em corpo mumificado no Sítio Arqueológico da Lapa do Boquete, Vale do Peruaçu, Município de Januária, MG, Brasil.

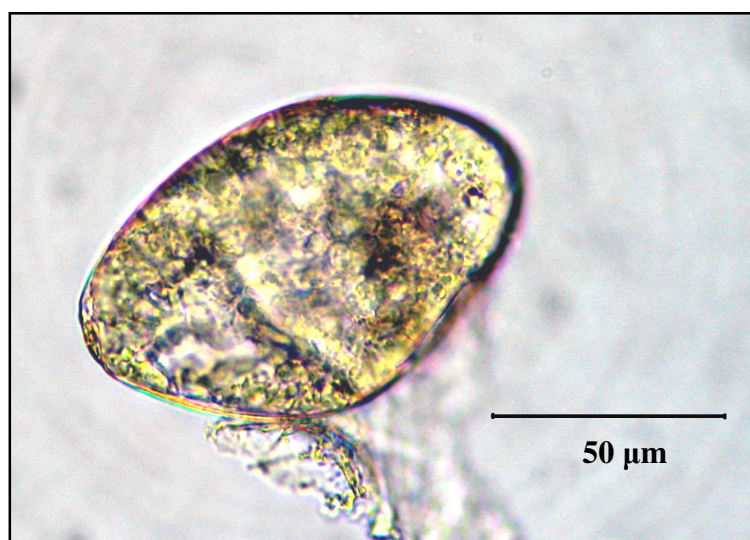
**Gráfico 4: Amplitude de medidas (µm) de largura de ovos das espécies de *Echinostoma* mais comumente encontradas na literatura, sem ocorrência no Brasil.**



\* Ocorrência humana.

\*\* Encontrado em corpo mumificado no Sítio Arqueológico da Lapa do Boquete, Vale do Peruaçu, Município de Januária, MG, Brasil.





**Figura 21: Ovo de *Echinostoma luisreyi* (400x).**

## 6. CONCLUSÃO

O encontro de ovos de *Echinostoma* sp. em coprólitos do período pré-colombiano é um resultado importante e mostra a necessidade de se aprofundar os estudos a respeito das infecções parasitárias presentes nos diferentes períodos históricos. O encontro de *Echinostoma* sp. em indígena pré-colombiano do Estado de Minas Gerais, pressupõe a presença desse parasito em grupos indígenas que habitavam a mesma região em virtude de hábitos alimentares que incluem hospedeiros intermediários como moluscos.

Embora o risco de infecção pelo consumo de moluscos tenha caído entre as populações tradicionais que não os consomem na atualidade, outros hábitos alimentares tradicionais, como a caça e o consumo de outros tipos de animais selvagens foram mantidos (Morán, 1990; Melatti, 1993). O risco de infecção por parasitos do gênero *Echinostoma* permanece, pelo menos em teoria, vinculado a cadeia alimentar silvestre. Essa suposição não foi até o momento confirmada pois os dados a respeito de parasitoses intestinais em índios da atualidade são escassos e pouco precisos (Vieira, 2003).

É interessante levantar a hipótese dessa parasitose ter sido introduzida em período pré-colombiano, porventura sendo *Echinostoma ilocanum*, e ter desaparecido sem ter sido diagnosticada até o encontro dos ovos nos coprólitos do corpo mumificado. Isto já ocorreu com outras doenças infecciosas como a causada por *Dracunculus medinensis* (Nematoda: Dracunculoidea). Este parasito foi encontrado em escravos de origem africana do período colonial brasileiro e estabeleceu-se como foco natural em Feira de Santana, Bahia. No entanto, desapareceu sem explicação e nenhum outro caso foi registrado (Brumpt, 1936; Pessoa & Martins, 1978). Na França, parasitos como *Diphyllobothrium* sp., *Diocotophyma* sp. e outros relacionados com o consumo de peixes, além de parasitos como *Taenia* sp. (Cestoda: Cyclophyllida: Tenuiidae) e *Fasciola* sp. eram encontrados parasitando populações no Neolítico. Apesar destes parasitos não serem comumente encontrados na população atual, sua incidência durante o Neolítico foi relacionada à crise alimentar ocorrida em função de alterações climáticas, que fez com que os habitantes desse período recorressem a outras fontes de alimento (Le Bailly & Bouchet, 2004a; 2004b).

Embora se trate de caso único, os resultados obtidos neste trabalho são interessantes por apontar possibilidades de estudo, abrindo perspectivas tanto de novas análises na pré-história e na atualidade. Assim, como discutido por Baer (1969) e

Ferreira *et al.* (1984) para os achados de *D. pacificum* em coprólitos, o encontro de ovos de *Echinostoma* sp. nesse corpo mumificado é um indicativo das infecções nos grupos pré-históricos e mesmo na atualidade, por espécie conhecida mas não assinalada na região, ou espécie de *Echinostoma* ainda não descrita capaz de parasitar humanos.

Além das populações tradicionais devemos pensar também na possibilidade da ocorrência dessa parasitose em habitantes das grandes cidades. O consumo de carne crua de peixe não é comum no Brasil. Nos últimos anos, no entanto, houve uma popularização de pratos asiáticos que são preparados sem o cozimento adequado dos alimentos. Este é o caso do *sushi e do sashimi*, pratos preparados com carne crua de peixe, que se popularizaram entre aqueles que querem seguir a moda do consumo de produtos asiáticos. Algumas pessoas acreditam que o consumo de carne crua, incluindo peixe, é mais “saudável” pois mantém o valor nutritivo do alimento, aumenta a virilidade e combate doenças como a tuberculose (Abdussalam *et al.*, 1995; Novak, 1996).

Os peixes são hospedeiros naturais de vários parasitos, incluindo diversas espécies de *Echinostoma*. Uma vez que a equinostomíase e outras helmintíases são vinculadas pelos hábitos alimentares locais, fica a dúvida se essas doenças podem se tornar freqüentes num futuro próximo em países como o Brasil. Essa preocupação existe também em outros países, que também experimentam a mudança dos hábitos alimentares tradicionais, pela incorporação de novos hábitos que incluem o consumo dos pratos tradicionais asiáticos preparados com peixe cru. No meio científico, vários artigos têm sido publicados, relatando preocupação pelo aumento do número de casos de pessoas infectadas com zoonoses transmitidas pelo consumo desses alimentos (Novak, 1996; Bush *et al.*, 2001). Em alguns países, como os Estados Unidos, os setores responsáveis pelo controle de alimentos, divulgam recomendações que devem ser seguidas no preparo e comercialização de iguarias como o *sushi e sashimi* (Butt *et al.*, 2004). Essas recomendações visam impedir que zoonoses como a equinostomíase, se tornem freqüentes em locais antes inexistentes ou com baixa incidência.

A emergência mundial de zoonoses, como as causadas por helmintos, tem origem não só pela mudança de hábitos alimentares, mas também por fatores sociais e movimentos populacionais, intensificados pelo mundo globalizado. Nos últimos anos a dispersão de diversas doenças parasitárias, incluindo as causadas por trematódeos, causaram profundos impactos econômicos e sociais ao redor do mundo (McCarthy & Moore, 2000; Slifko *et al.*, 2000; Petney, 2001).

Assim, do ponto de vista da saúde pública, os estudos culturais e sociais das populações do passado, e atuais, nos ajudam a entender a relação que existe entre as doenças parasitárias e o nosso modo de vida, assim como do risco embutido nas mudanças que esse sofre, seja em populações tradicionais ou habitantes das grandes cidades.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdussalam, M.; Kaferstein, F. K. & Mott, K. E., 1995. Food safety measures for the control of foodborne trematode infections. *Food Control*, 6 (2): 71-79.
- Allison, M. J.; 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. J. G., 1987. *Paleoepidemiologia da ancilostomose*. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.
- Araújo, A. J. G.; Confalonieri, U. E. C. & Ferreira, L. F., 1984. Encontro de ovos de trichostrongylideo e *Trichuris trichiura* em corpo mumificado do período colonial brasileiro. *Revista do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde*, 1: 11-16.
- Araújo, A. & Ferreira, L. F., 1995. Oxiuríase e migrações pré-históricas. *História, Ciência e Saúde – Manguinhos*, 1: 99-100.
- Araújo, A. & Ferreira, L. F., 1996. Paleoparasitology and the peopling of the Americas. *Fundamentos*, 1: 106-114.
- Araújo, A. & Ferreira, L. F., 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.; Jansen A. M.; Bouchet, F.; Reinhar, K. & Ferreira, L. F., 2003. Parasitism, the Diversity of Life, and Paleoparasitology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl. I): 5-11.
- Baer, J. G., 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.
- Bouchet, F.; Guidon, N.; Dittmar, K.; Harter, S.; Ferreira, L. F.; Chaves, S. M.; Reinhard, K. & Araújo, A., 2003. Parasite remains in archaeological sites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl1): 47-52.
- Brumpt, E., 1936. *Précis de Parasitologie*, 5th ed., Paris: Masson et Cie., 2139 pp.
- Bryant, V. M. & Williams-Dean, G., 1975. The coprolites of man. *Scientific American*, 232 (1): 100-109.
- Bush, A. O.; Fernandes, J. C.; Esch, G. W. & Seed, J. R., 2001. *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge: Cambridge University Press.



- Butt, A. A.; Aldridge, K. E. & Sanders, C. V., 2004. Infections related to the ingestion of seafood. Part II: parasitic infections and food safety. *The Lancet*, 4: 294-300.
- Cabaret, J.; Bayssode-Dufour C.; Tami, G. & Albaret, J. L., 1999. Identification of African Paragonimidae by multivariate analysis of the eggs. *Acta Tropica*, 72: 79-89.
- Callen, E. O. & Cameron, T. W. M., 1960. A pre-historic diet revealed in coprolites. *New scientist*, 7: 35-40.
- Cardoso, J. S. & Resende, E. M. T. P., 2000. "Silos" do Peruaçu: técnicas tradicionais e evidências arqueológicas. In: Souza, M. F. M. (Org.) Arqueologia e suas interfaces disciplinares. *Anais do IX Congresso da Sociedade de Arqueologia Brasileira*, Edição em hipertexto CD-Room da Sociedade de Arqueologia Brasileira, Rio de Janeiro.
- Chame, M., 2003. Terrestrial Mammal Feces: a Morphometric Summary and Description. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl. I): 71-94.
- Chame, M., Ferreira, L. F., Araújo, A. J. G. & Confalonieri, U., 1991. Experimental paleoparasitology: na approach to the diagnosis of animal coprolites. *Paleopathology newsletter*, 76: 7-9.
- Chai, J. Y. & Lee, S. H., 2002. Food-borne trematode infections in the Republic of Korea. *Parasitology International*, 51: 129-154.
- Cheng, T. C., 1973. *General Parasitology*. New York: Academic Press Inc.
- Confalonieri, U. E. C., 1983. *Paleoparasitologia do genero Trichuris Roederer, 1768 com um estudo paleoepidemiológico sobre a origem do Trichuris trichiura (Linn) na América (Nematoda: Trichuridae)*. Tese de Doutorado, Rio de Janeiro: Doutorado em Ciências (Parasitologia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Desowitz, R. S., 1997. *Who gave pinta to the Santa Maria? Tracking the devastating spread of lethal tropical diseases into America*. New York: Harcourt Brace & Company.
- Faulkner, C. T.; Patton, S. & Johnson, S. S., 1989. Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, Van Buren County, Tennessee. *Journal of Parasitology*, 175: 461-463.
- Faulkner, C. T. & Patton, S., 2001. Pre-Columbian hookworm evidence from Tennessee: a response to Fuller (1997). In: Various perspectives on the origins of pathogens: questions of evidence (Commentaries). *Medical Anthropology*, 20: 91-104.
- Ferreira, L. F., 1973. O fenômeno parasitismo. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 4: 261-277.

- Ferreira, L. F.; Araújo, A. & Confalonieri, U., 1980. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 798-800.
- Ferreira, L. F.; Araújo, A. J. & Confalonieri, U. E., 1983a. The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77 (1): 65-7.
- Ferreira, L. F.; Araújo, A. J. & Confalonieri, U. E., 1983b. Parasites in archaeological material from Brazil: a reply to M. M. Kliks. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 565-6.
- Ferreira, L. F.; Araújo, A.; Confalonieri, U. & Nuñez, L., 1984. The finding of *Diphyllobothrium pacificum* in human coprolites (4100-1950 BC) from northern Chile. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79: 175-180.
- Ferreira, L. F.; Araújo, A. & Confalonieri, U., 1988. *Paleoparasitologia no Brasil*. Rio De Janeiro: Pec/Ensp, Fundação Oswaldo Cruz.
- Fried, B. & Huffman J. E. 1996. The biology of the intestinal trematode *Echinostoma caproni*. *Advances in Parasitology*, 38: 311-368.
- Fried, B. & Graczyk, T. K., 2000. *Echinostomes as experimental models for biological research*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
- Fried, B.; Graczyk, T. K. & Tamang, L., 2004. Food-borne intestinal trematodiasis in humans. *Parasitology Research*, 93: 159-170.
- Fujino, T.; Nakano, T.; Washioka, H.; Tonosaki A.; Ichikawa, H. & Fried, B., 2000. Comparative ultrastructure of eggs in *Echinostoma paraensei*, *E. caproni* and *E. trivolvis* (Trematoda: Echinostomatidae). *Parasitology Research*, 86: 427-430.
- Fuller, K., 1997. Hookworm: not a pre-Columbian pathogen. *Medical Anthropology*, 17 (4): 297-308.
- Futuyma, D. J., 1986. *Evolutionary Biology*., Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, INC Publishers.
- Gonçalves, M. L. C.; Araújo, A. & Ferreira, L. F., 2002. Paleoparasitologia no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, 7 (1): 191-196.
- Gonçalves, M. L. C.; Araújo, A. & Ferreira, L. F., 2003. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl. I): 103-118.
- Graczyk, T. K. & Fried, B., 1998. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58 (4): 501-504.

- Haseeb, M. A. & Eveland, L. K., 2000. Human echinostomiasis: mechanisms of pathogenesis and host resistance. In: *Echinostomes as experimental models for biological research* (Graczyk, T. K. & Fried, B., eds.), pp. 83-98, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
- Hill, G., 1990. Recent finds of parasitic evidence in coprolites. *Paleopathology Newsletter*, 69: 9-10.
- Hoberg, E. P., 1997. Phylogeny and historical reconstruction: host-parasite systems as keystones in biogeography and ecology. In: *Biodiversity II, understanding and protecting our biological resources*. (Reaka-Kudla, M. L., Wilson, D. E. & Wilson, E. O., eds.), pp. 243-262, Washington, D. C.: Joseph Henry Press.
- Hsu, K. C.; Lie, J. K. & Basch, P. F., 1968. The life history of *Echinostoma rodriguesi* sp. N. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology*, 54 (2): 333-339.
- Huffman, J. E., 2000. Echinostomes in veterinary and wildlife parasitology. In: *Echinostomes as experimental models for biological research* (Graczyk, T. K. & Fried, B., eds.), pp. 59-82, Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers.
- Hugot, J. P.; Reinhard, K. J.; Gardner, S. L. & Morand, S., 1999. Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. *Parasite*, 6: 201-208.
- IBAMA, 2003. Área de Proteção Ambiental Cavernas do Peruaçu/MG. Disponível na Internet em 3 de outubro de 2003 <<http://www.ibama.gov.br>>.
- Kipnis, R., 2002. *Foraging strategies of eastern central Brazil: na evolutionary ecological study of subsistence strategies during the Terminal Pleistocene and Early/Middle Holocene*. Tese de Doutorado, Michigan: The University of Michigan.
- Kohn, A. & Fernandes, B. M. M., 1975. Sobre as espécies do gênero *Echinostoma* Rudolphi, 1809 descritas por Adolpho Lutz em 1924. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 73 (1/2): 77-99.
- Kumar, V., 1999. *Trematode Infections and diseases of man and animals*. Norwell : Kluwer Academic Publishers.
- Le Bailly, M. & Bouchet, F., 2004a. Contribution of the paleoparasitology to the knowledge of Neolithic Cultures (4<sup>th</sup>-3<sup>rd</sup> Millenniums B. C.): first steps. In: V World Congress on Mummy Studies, Abstracts, p. 134. Turin: Università di Torino.
- Le Bailly, M. & Bouchet, F., 2004b. Contribution of the paleoparasitology to the knowledge of Neolithic Cultures (4<sup>th</sup>-3<sup>rd</sup> Millenniums B. C.): first steps. *Journal of Parasitology* (no prelo).

- Lie, J. K., 1968. Further studies on the life story of *Echinostoma lindoense* Sandground and Bonne, 1940 (Trematoda: Echinostomatidae) with a report of its occurrence in Brazil. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 35 (1): 74-77.
- Lie, J. K. & Bash, P. F., 1967. The life history of *Echinostoma paraense* sp. N. (Trematoda: Echinostomatidae). *Journal of Parasitology*, 53 (6): 1192-1199.
- Lie, J. K. & Nasemary, S., 1973. Studies on Echinostomatidae (Trematoda) in Malaysia XVI. The life history of *Echinostoma ilocanum* (Garrison, 1908). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 40 (1): 59-65.
- Lo, C. T., 1995. *Echinostoma macrorchis*: life history, population dynamics of intramolluscan stages, and the first and second intermediate hosts. *Journal of Parasitology*, 81 (4): 569-576.
- Lutz, A., 1919. O *Schistosomun mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 19: 121-155.
- Lutz, A., 1924. Estudos sobre a evolução dos Endotrematodes brasileiros. Parte especial: 1. Echinostomidae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 17: 55-73.
- Maher, L. J., 1981. Statistics for microfossil concentration measurements employing samples spiked with marker grains. *Review of Paleobotany and Palynology*, 32: 153-191.
- Maldonado, Jr. A.; Vieira, G. O.; Garcia, J. S. & Rey, L., 2001a. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraense* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitology Research*, 87: 853-859.
- Maldonado, Jr. A.; Coura, R.; Garcia, J. S.; Lanfredi, R. M. & Rey, L., 2001b. Changes on *Schistosoma mansoni* (Digenea: Schistosomatidae) worm load in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) concurrently infected with *Echinostoma paraense* (Digenea: Echinostomatidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 96 (Suppl.): 193-198.
- Maldonado, Jr. A.; Vieira, G. O. & Lanfredi, R. M., 2003. *Echinostoma luisreyi* N. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology*, 89 (4): 800-808.
- Melatti, J. C., 1993. *Índios do Brasil*. 7ª. São Paulo e Brasília: Edunb – Hucitec.
- McCarthy, J. & Moore, T. A., 2000. Emerging helminth zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 30: 1351-1360.
- Morán, E. F., 1990. A ecologia humana das populações da Amazônia. Petrópolis: Vozes.

- Moreira, N. S.; Araújo, A.; Confalonieri, U.; Ferreira, L. & Prous, A., 1991. Os restos de invertebrados encontrados durante as escavações do abrigo de Santana do Riacho. *Arquivos do Museu de História Natural UFMG*, 12: 155-168.
- Náquira, C., 1990. Hookworm infection in Latin América and the Caribbean. In: *Hookworm disease: current status and new directions* (G. A. Schad & K. S. Warren, eds.), pp. 55-68, London: Taylor & Francis.
- Novak, S. M., 1996. Parasites associated with exotic food. *Clinical Microbiology Newsletter*, 18 (17): 129-136.
- Patrucco, R.; Tello, R. & Bonavia, D., 1983. Parasitological studies of coprolites of pre-hispanic peruvian populations. *Current Anthropology*, 24: 393-394.
- Pessôa, S. B. & Martins, A. V., 1978. *Parasitologia Médica*. 10<sup>a</sup>. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Petney, T. N., 2001. Environmental, cultural and social changes and their influence on parasite infections. *International Journal for Parasitology*, 31: 919-932.
- Prous, A., 1990. Os moluscos e a arqueologia brasileira. *Arquivos do Museu de História Natural UFMG*, 11: 241-298.
- Prous, A., 1996. Aequéologie du cours moyen du Rio São Francisco (Vallées des Rios Peruaçu et Cochá). *Arquivos do Museu de História Natural UFMG*, 17/18: 19-67.
- Prous, A. & Schlobach, M. C., 1997. Sepultamentos pré-históricos do Vale do Peruaçu – MG. *Revista do Museu de Arqueologia e Etnologia, São Paulo*, 7: 3-21.
- Reinhard, K. J., 1990. Archaeoparasitology in North America. *American Journal of Physical Anthropology*, 82: 145-163.
- Reinhard, K. J., Araújo, A. J. G., Ferreira, L. F., Hermann, B., 1986. Recovery of parasite remains from coprolites and latrine: aspects of paleoparasitological technique. *Homo*, 37: 217-239.
- Reinhard, K.J.; Confalonieri, U.; Ferreira, L.F.; Herrmann, B. & Araújo, A., 1988. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo*, 37: 217-239.
- Reinhard, K. J. & Barnum, S. V., 1991. Apud Reinhard, K. J. 1992. Parasitology as an interpretative tool in archaeology. *American Antiquity*, 57: 231-245.
- Reinhard, K.; Araújo, A.; Ferreira, L. F. & Coimbra, C. E., 2001. American hookworm antiquity. *Medical Anthropology*, 20 (1): 96-101.
- Reinhard, K. J., & Urban, O., 2003. Diagnosing ancient diphylobothriasis from Chinchorro mummies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl 1): 191 – 193.

- Resende, E. M. T. P. & Cardoso, J. S., 1995. Estruturas de armazenamento vegetal: os silos do rio Peruaçu (MG). *Coleção Arqueologia*, 1: 249-264.
- Rey, L., 2001. *Parasitologia*. 3ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Roberts, L. S. & Janovy, J. Jr., 2000. *Foundations of Parasitology*. 6ª. Boston: McGraw-Hill.
- Ruffer, M. A., 1910. Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in egyptian mummies of the twentieth dynasty. *British Medical Journal*, 1: 16.
- Ruffer, M. A., 1921. *Studies in Paleopathology of Egypt*. New York: R Moodie, Ed., University of Chicago Press.
- Scheel-Ybert, R., 2001. Man and vegetation in southeastern Brazil during the Late Holocene. *Journal of Archaeological Science*, 28: 471-480.
- Sianto, L.; Fernandes, A.; Lobo, R. L.; Ferreira, L. F.; Gonçalves, M. L. C. & Araújo, A., 2003. Paleoparasitologia: uma nova ciência para interpretar o passado. *Com Ciência Revista Eletrônica de Jornalismo Científico*, 47. 10 setembro 2003. <http://www.comciencia.br/reportagens/arqueologia/arq14.shtml>.
- Slifko, T. R.; Smith, H. V. & Rose, J. B., 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *International Journal for Parasitology*, 30: 1379-1393.
- Sloss, M. W.; Zajac, A. M. & Kemp, R. L., 1999. *Parasitologia Clínica Veterinária*. 6ª. São Paulo: Ed. Manole Ltda.
- Souza, C. P.; Caldeira, R. L.; Drummond, S. C.; Melo, A. L.; Guimarães, C. T.; Soares, D. M. & Carvalho, O. S., 2001. Geographical distribution of *Biomphalaria* snails in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 96 (3): 293-302.
- Travassos, L.; Freitas, J. F. & Kohn, A., 1969. Trematódeos do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 67.
- Toledo, R.; Munoz-Antoli, C. & Esteban, J. G., 2000. The life cycle of *Echinostoma friedi* n. sp. (Trematoda: Echinostomatidae) in Spain and a discussion on the relationships within the "revolutum" group based on cercarial chaetotaxy. *Systemic Parasitology*, 45: 199-217.
- Veloso, T. & Resende, E. M. T. P., 1992. Vestígios alimentares nos sítios arqueológicos sob abrigos de Minas Gerais. *Anais do III Congresso da Associação Brasileira de Estudos do Quaternário*, 389-414.

- Vieira, G. O., 2003. *Enteroparasitoses em populações indígenas no Brasil: um estudo meta-analítico qualitativo de produção científica*. Dissertação de Mestrado, Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.
- Warnock, P. & Reinhard, K. J., 1994. Methods of extracting pollen and parasite eggs from latrine soils. *Journal of Archaeological Science*, 19: 261-264.
- Wilke, P. J. & Hall, H. J., 1975. *Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography*. Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, University of California, Berkeley, California.

## 8. ANEXOS



Artigo enviado ao Journal of Parasitology. Aceito para publicação em setembro de  
2004.

Running Head: RESEARCH NOTE

**THE FINDING OF *ECHINOSTOMA* (TREMATODA: DIGENEA) AND HOOKWORM EGGS IN  
COPROLITES COLLECTED FROM A BRAZILIAN MUMMIFIED BODY DATED OF 600-  
1,200 YEARS BEFORE PRESENT**

**L. Sianto, K. J. Reinhard\*, M. Chame, S. Chaves, S. Mendonça, M. L. C. Gonçalves, A. Fernandes,  
L. F. Ferreira, A. Araújo**

Escola Nacional de Saude Publica - Fundacao Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; \*School of Natural  
Resources Sciences, University of Nebraska - Lincoln, Lincoln, 68588-0340; *e-mail*:

*adauto@ensp.fiocruz.br*

**ABSTRACT:** The study of parasites from ancient humans expands our list of parasites infective to extant humans. A partially mummified human body from the archaeological site of Lapa do Boquete, Minas Gerais State, Brazil, was recently discovered. It was interred between 600 and 1,200 yr ago. Coprolites from the body contained numerous helminth eggs. The eggs were identified as those of *Echinostoma* sp. and an ancylostomid species. Ancylostomid infection in pre-Columbian populations is already established, but this is the first evidence of *Echinostoma* spp. eggs found in human coprolites. The diagnosis of a true infection, as opposed to false parasitism, is discussed. The possibility of *Echinostoma ilocanum* infection is suggested, as this is a common species found in humans in the Asiatic region, which could have been introduced in South America in pre-Columbian period. Dietary analysis showed that the mummified body was from an advanced agriculture-based society.

One of the most significant contributions of archaeology to parasitology is the documentation of parasite species infective to ancient humans that are not known from the present clinical literature. In some cases, false parasitism is implicated, such as the find of *Cryptocotyle lingua* eggs in an Alaskan Yupik mummy (Zimmerman, 1980). False parasitism occurs when parasite eggs are passed in the feces of a subject who is not infected with the parasite. In other cases, real infection is implicated, such as the discovery of acanthocephalan eggs in archaeological sites of the Great Basin of North America (Fry, 1970). Diagnosing infection from the archaeological record is only possible when the physical remains analyzed can be determined to be of human origin and when the dietary practices of the human population represented by the physical remains are known (Reinhard et al., 1987; Reinhard, 1988). If these 2 criteria are met, then the possibility of confusing false parasitism with true infection can be reduced.

Archaeologists excavated the cave, Lapa do Boquete, in the Peruaçu River Valley, Minas Gerais State, Brazil. The site is situated in the Peruaçu River Valley, northern Minas Gerais State, Brazil. The region has a characteristic cerrado vegetation composed of stunted, twisted trees, but there are also gallery forests along the rivers. The archaeological site is located in the environmental protection area of Cavernas do Peruaçu (Peruaçu Caves), covering 1,440 km<sup>2</sup> (IBAMA, 2003). The Lapa do Boquete site is a multiple used rock shelter used by horticulturalists practicing a mixed subsistence of agriculture, gathering of wild plants, and hunting. The occupation dates between 600 and 1200 years ago. At this time, archaeologists are refining the date for the burials. The site was used as a food storage area. Burials were also deposited in the site, sometimes in abandoned food storage pits. The bodies were buried flexed in fetal positions (Prous and Schlobach, 1997). One of the burials was partially mummified. Coprolites (desiccated feces) were recovered from the inside of the pelvic girdle and submitted for dietary and parasitological analysis.

This analysis followed the coprolite dietary analysis methods and goals as summarized by Reinhard and Bryant (1992). The coprolites are rehydrated in 0.5% aqueous trisodium phosphate for 72 hr. The residues were then passed through a mesh screen which separates macroscopic from microscopic remains. Microscopic remains, smaller than 300 µm empty into a beaker. These remains are concentrated by centrifugation and analyzed for starch granules, pollen grains, phytoliths, plant fibers, fungal spores, and other dietary and environmental microfossils. The macrofossils, larger than 300 µm, are trapped on top of the screen and dried. After drying, the macrofossils, such as seeds, fruit, vascular plant tissue, bones, mollusk shells, exoskeleton, hair, and other items are identified.

Two methods of parasitological analysis were used. In the first, the samples were rehydrated in 0.5% trisodium phosphate aqueous solution for 72 hr (Callen and Cameron, 1960). After rehydration, the

samples were grounded in a mortar, screened in double gauze, and allowed to sediment in conical glass jars (Lutz, 1919). The sediment was microscopically examined (X40 and X100). Parasite eggs were measured and digitally photographed.

To quantify the numbers of eggs per g, a second method (Warnock and Reinhard, 1994) was used; this procedure adapted standard palynological quantification methods to parasitology. A *Lycopodium* sp. spore tablet, containing  $12,542 \pm 400$  spores was dissolved in 0.5 g of coprolite in rehydration solution. *Lycopodium* sp. is a high latitude organism, not endemic to Minas Gerais State. The rehydrated coprolite was disaggregated with a stirrer until the microfossils, macrofossils, and added spores were thoroughly mixed. The disaggregated coprolite solution was then poured through a triple gauze mesh into a beaker. The residue on top of the mesh was rinsed with a jet of distilled water until all liberated microfossils had passed through the mesh and into the beaker. The microfossils in the beaker were concentrated by centrifugation. Microscopic slides (n=30) were examined and all parasite eggs and *Lycopodium* sp. spores were counted. The number of parasite eggs per g of coprolite was then calculated using the pollen concentration formula of Maher (1981); i.e. parasite eggs/g dry sediment =  $([\text{eggs counted}/\text{Lycopodium counted}] \times 12,542)/\text{sediment weight}$ .

The dietary remains were diverse. Manioc (*Manihot* spp.) tubers were eaten, as indicated by characteristic fibers and starch granules. Domesticated beans (*Phaseolus* spp.) were present. Finally, dense porous plant epidermis, probably of the Myrtaceae, was identified as a fruit. Fish bone, charcoal fragments, fungus spores, and non-specific starch grains were also observed.

The eggs found were identified by morphometry and morphology as those of *Echinostoma* sp. and hookworms. Unembryonated, operculated, light amber, thin-shell eggs were identified as those of *Echinostoma* sp. (Fig. 2). Typical of *Echinostoma* species, the eggs have a slight shell thickening opposite the operculum. Thirty-six eggs were measured; their lengths ranged from 90 to 108 and the width from 55-73  $\mu\text{m}$  (mean size: 100 x 65  $\mu\text{m}$ , SD: 4.57). Only non-deformed eggs with the operculum had the measurements considered for diagnosis. There were 8,300 *Echinostoma* eggs per g of coprolite.

The diagnosis of *Echinostoma* sp. was achieved after consulting available morphology and measurement data of trematode and cestode eggs. Echinostomatidae species parasitize all vertebrate classes and have numerous mollusc species as intermediate hosts, as well as tadpoles, planarians, and fishes (Roberts and Janovy, 2000). Egg measurements among *Echinostoma* species range within 62-128  $\mu\text{m}$  (length) and 38-86  $\mu\text{m}$  (width), and correspond to the measurements of the eggs found. Echinostomatidae, Fasciolidae (Trematoda), *Dyphillobothrium* spp. (Cestoda), and *Paragonimus* spp. (Trematoda) eggs have similar morphological characteristics and may be misdiagnosed if morphological

details and size are not considered. The eggs found in the coprolites did not show the characteristic operculum shield of *Paragonimus* species.

The 5 hookworm eggs found were 57-65  $\mu\text{m}$  long and 35-40  $\mu\text{m}$  wide. Hookworm eggs may correspond to *Necator americanus* or *Ancylostoma duodenale*, but eggs of the 2 species are undistinguishable by morphological parameters, and have nearly the same size. The finding of hookworm eggs adds new data to the knowledge of pre-Columbian distribution of this infection and to the debate of its introduction in the American continent (Araújo et al., 1988; Ferreira and Araújo, 1996; Fuller, 1997; Reinhard et al., 2001).

*Diphyllobothrium* sp. eggs have been found in South American human coprolites and identified as *D. pacificum* (Patrucco et al., 1983; Ferreira et al., 1984). *Diphyllobothrium latum* eggs have been found in European organic remains (Bouchet et al., 2003). Reinhard and Urban (2003) discovered that *D. pacificum* eggs from mummies are smaller than eggs in coprolites, probably due to the decomposition of adult worms which liberated immature eggs in the corpse intestinal tract. However, both *D. pacificum* as *D. latum* egg sizes are less the measurements than those found in this study.

*Fasciola hepatica* (Fasciolidae) eggs are morphologically identical to the ones in the coprolites analyzed, but differ in size (length of 130  $\mu\text{m}$ ).

Echinostomiasis is an infectious disease known in some Asian countries; it may cause anemia, diarrhea, eosinophilia, and abdominal pain (Graczyk and Fried, 1998). Humans are infected by ingesting raw or undercooked molluscs, fishes, or frog meat containing the larvae (Roberts and Janovy, 2000). The species most commonly found in Philippines and Indonesia infecting humans is *E. ilocanum*. Infections in communities often follow a familial trend due to shared food preferences in food habits and preparation methods. The eggs of this species have the same size (83-116  $\mu\text{m}$  x 58-69  $\mu\text{m}$ ) and are morphologically identical to the eggs found in the mummy coprolite (Cheng, 1973).

There are 25 known *Echinostoma* species in Brazilian vertebrate hosts (Travassos et al., 1969; Maldonado Jr. et al., 2001). A record of human infection in Brazil caused by *E. echinatum* was made by Fried and Graczyk (2000), but it was considered as an isolated case, probably acquired outside the continent.

Recently, a new species was recorded in Brazil, i.e., *E. luisreyi* (Maldonado Jr. et al., 2003); its egg measurements range within 89-113  $\mu\text{m}$  (length) and 65-82  $\mu\text{m}$  (width), sharing similar measurements to those eggs found in the coprolites. The parasite was found in a mollusc, *Physa marmorata*. Other known American *Echinostoma* species have egg measurements outside the range of the eggs found in the mummy. The possibility of the parasite involved be *E. ilocanum* is remote, and an easier explanation

points to *E. luisreyi* infection. Considering egg size and morphology, this is probably the first human occurrence of *E. luisreyi*. However, we must reserve judgment until a statistical analysis of eggs from all Brazilian echinostomid species is completed.

It is important to consider the possibility that the eggs found in this mummy were the result of false infection. False infections have been recorded from the archaeological record from Utah to Alaska (Reinhard, 1990) and resulted when prehistoric humans ate vertebrate intestinal tracts. Usually, small animals such as rodents and mouth-sized fish were eaten whole (Reinhard, 1992). Reinhard and Bryant (1992) note that hair, animal bone, and certain fungal species were ingested when entire animals were eaten. Reinhard (1990) made a case that determination of actual infection must be based on a knowledge of prehistoric dietary practices and a measurement of the number of eggs per g. If bone, hair, or dietary residues of a non-human host animal are found in a human coprolite with eggs of a parasite infective to the animal, then false parasitism is implicated. The definitive host of *E. luisreyi* is not known. Hamsters have been infected experimentally (Maldonado Jr. et. al., 2003), suggesting that the natural host is a small mammal. There is no evidence that a small mammal was part of the mummified individual's last meals. Reinhard (1990) also argues that large numbers of eggs more likely result from true infection, while small numbers or isolated eggs more likely result from false infection. Analysis of the passage of pollen through modern human intestinal tracts (reviewed by Sobolik, 1988) provides insight into the pattern of passage of other microfossils, including parasite eggs. When large amounts of pollen are consumed at a single meal, there is a peak of pollen excretion a 2-3 days later. After this peak, pollen grain concentration rapidly depletes such that trace amounts are passed for up to 20 days after ingestion. This is analogous to the consumption of parasite eggs with animal prey. The parasite eggs would be passed fairly rapidly and only trace amounts of eggs would be found just a few days after the prey item was consumed. Therefore, unless the coprolite under study was formed in the few days after consuming an infected prey item, the probability of encountering large numbers of eggs is low. In this case, the numbers of eggs, 8,300 per g, is high and is consistent with a true infection. Therefore, the absence of prey items in the coprolite, combined with high eggs per g counts, also suggests a true infection.

It is interesting to hypothesize that the human infection was introduced in the New World in pre-Columbian times and disappeared without have been noticed until the finding in a mummified body. This is not surprising as it has happened with other infectious diseases. *Dracunculus medinensis*, for example, was recorded in Brazilian colonial times among African slaves, and actually established a natural focus in the northeast region. However, it disappeared for unknown reasons, and no more cases were recorded (Faust, 1949; Kiple, 1993).

The finding of *Echinostoma* sp. in a pre-Columbian inhabitant of Brazil takes for granted that this infection existed among pre-historic groups in the region due to food habits that should have included intermediate host consumption (Morán, 1990; Melatti, 1993; Vieira, 2003). This is the first recovery of *Echinostoma* spp. from a coprolite, and also the first diagnosed *Echinostoma* sp. human infection in South America. The finding of *Echinostoma* sp. eggs in this mummified body is indicative that pre-historic groups were infected by a known parasite species, not recorded for the region, or by an unknown species, capable of infecting humans.

We thank Dr. A. Prous from the Federal University of Minas Gerais and Dr. Arnaldo Maldonado from Oswaldo Cruz Institute/FIOCRUZ. Supported by CNPq, CAPES, PAPES-FIOCRUZ, Fulbright Commission.

#### LITERATURE CITED

- Araújo, A. J. G., L. F. Ferreira, U. Confalonieri, and M. Chame. 1988. Hookworm and the peopling of America. *Cadernos de Saúde Pública* **2**: 226-233.
- Bouchet, F., N. Guidon, K. Dittmar, S. Harter, L. F. Ferreira, S. M. Chaves, K. Reinhard, and A. Araujo. 2003. Parasite remains in archaeological sites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98** (Suppl. 1): 47-52.
- Callen, E. O., and T. W. M. Cameron. 1960. A pre-historic diet revealed in coprolites. *New Scientist* **7**: 35-40.
- Cheng, T. C. 1973. *General Parasitology*. Academic Press Inc, New York, New York, 965 p.
- Faust, E. C. 1949. *Human helminthology, a manual for physicians, sanitarians and medical zoologists*. Lea & Febiger, Philadelphia, Pennsylvania, 744 p.
- Ferreira, L. F., and A. J. G. Araujo. 1996. On hookworms and transpacific contact. *Parasitology Today* **12**: 454.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, U. Confalonieri, and L. Nuñez. 1984. The finding of *Diphyllobothrium pacificum* in human coprolites (4100-1950 BC) from northern Chile. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **79**: 175-180.
- Fuller, K. 1997. Hookworm: not a pre-Columbian pathogen. *Medical Anthropology* **17**: 297-308.
- Fried, B., and T. K. Graczyk. 2000. *Echinostomes as experimental models for biological research*. Kluwer Academic Publishers, London, U.K., 273 p.
- Fry, G. F. 1970. Preliminary analysis of Hogup Cave coprolites. *In Hogup Cave, Appendix III*. The University of Utah Anthropological Papers 93, C. M. Aikens (ed.). University of Utah Press, Salt Lake City, Utah p. 247-250.

- Graczyk, T. K., and B. Fried. 1998. Echinostomiasis: a common but forgotten food-borne disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **58**: 501-504.
- IBAMA, 2003. Área de Proteção Ambiental Cavernas do Peruaçu/MG. Available on-line on 3th october 2003 <<http://www.ibama.gov.br>>.
- Kiple, K. F. 1993. *The Cambridge world history of human disease*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1776 p.
- Lutz, A. 1919. O Schistosomun mansoni e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **19**: 121-155.
- Maher, L. J. 1981. Statistics for microfossil concentration measurements employing samples spiked with marker grains. *Review of Paleobotany and Palynology* **32**: 153-191.
- Maldonado, Jr. A., G. O. Vieira, J. S. Garcia, and L. Rey. 2001. Biological aspects of a new isolate of *Echinostoma paraensei* (Trematoda: Echinostomatidae): susceptibility of sympatric snails and the natural vertebrate host. *Parasitology Research* **87**: 853-859.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, and R. M. Lanfredi. 2003. *Echinostoma luisreyi* N. sp. (Platyhelminthes: Digenea) by light and scanning electron microscopy. *Journal of Parasitology* **89**: 800-808.
- Melatti, J. C. 1993. *Índios do Brasil*, 7th ed . Edunb - Hucitec, São Paulo e Brasília, Brazil, 220 p.
- Morán, E. F. 1990. *A ecologia humana das populações da Amazônia*. Vozes, Petrópolis, Brazil, 367 p.
- Patrucco, R., R. Tello, and D. Bonavia. 1983. Parasitological studies of coprolites of pre-hispanic peruvian populations. *Current Anthropology* **24**: 393-394.
- Prous, A., and M. C. Schlobach. 1997. Sepultamentos pré-históricos do Vale do Peruaçu – MG. *Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia, São Paulo* **7**: 3-21.
- Reinhard, K. J. 1988. Cultural ecology of prehistoric parasitism on the Colorado Plateau as evidenced by coprology. *American Journal of Physical Anthropology* **77**: 355-366.
- \_\_\_\_\_. 1990. Archaeoparasitology in North America. *American Journal of Physical Anthropology* **82**: 145-162.
- \_\_\_\_\_. 1992. Patterns of diet, parasitism, and anemia in prehistoric west North America. *In Diet, demography, and disease: Changing perspectives on anemia*, P. Stuart-Macadam and S. Kent (eds.). Aldine de Gruyter, New York, New York, p. 219-258.
- \_\_\_\_\_, G. A. Anderson, and R. H. Hevly. 1987 Helminth remains from prehistoric coprolites on the Colorado Plateau. *Journal of Parasitology* **73**: 630-639.

- \_\_\_\_\_, A. Araujo, L. F. Ferreira, and C. E. Coimbra. 2001. American hookworm antiquity. *Medical Anthropology* **20**: 96-101.
- \_\_\_\_\_, and V. M. Bryant Jr. 1992. Coprolite analysis: a biological perspective on archaeology. *In Advances in Archaeological Method and Theory* 4, M. B. Schiffer (ed.). University of Arizona Press, Tucson, Arizona, p. 245-288.
- \_\_\_\_\_, and O. Urban. 2003. Diagnosing ancient diphilobothriasis from Chinchorro mummies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **98** (Suppl. 1): 191–193.
- Roberts, L. S., and J. Janovy Jr. 2000. *Foundations of parasitology*, 6th ed. McGraw-Hill, Boston, Massachusetts  
670 p.
- Sobilik, K. D. 1988. The importance of pollen concentration values from coprolites: an analysis of southwest Texas samples. *Palynology* **12**: 201-221.
- Travassos, L., J. F. Freitas, and A. Kohn. 1969. Trematódeos do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **67**.
- Vieira, G. O. 2003. Enteroparasitoses em populações indígenas no Brasil: um estudo meta-analítico qualitativo de produção científica. M.S. Thesis. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, 115 p.
- Warnock, P., and K.J. Reinhard. 1992 Methods of extracting pollen and parasite eggs from latrine soils. *Journal of Archaeological Science* **19**: 261-264.
- Zimmerman, M. R. 1980. Disease in ancient Egypt. *In Mummies, disease & ancient cultures*, 2nd ed., A. Cockburn, E. Cockburn, and T. A. Reyman (eds.). Cambridge University, Cambridge, U.K., p. 138-153.



Figure 1: Pelvis with coprolite. Mummy found in Lapa do Boquete site.



Figure 2: *Echinostoma* sp. from coprolite; X40.

