

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Morgana Camacho Rodrigues de Almeida

Patoecologia da enterobíase em populações ancestrais de *Pueblo* dos Estados Unidos da América.

Rio de Janeiro

2018

Morgana Camacho Rodrigues de Almeida

Patoecologia da enterobíase em populações ancestrais de *Pueblo* dos Estados Unidos da América.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alena Mayo Iñiguez
Coorientador: Prof. Dr. Karl Jan Reinhard

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

A447p Almeida, Morgana Camacho Rodrigues de.
Patoecologia da enterobíase em populações ancestrais de
Pueblo dos Estados Unidos da América / Morgana Camacho
Rodrigues de Almeida. -- 2018.
163 f. : il. color. ; graf. ; mapas. ; tab.

Orientadora: Alena Mayo Iñiguez.
Coorientador: Karl Jan Reinhard.
Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional
de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2018.

1. Enterobius. 2. Epidemiologia. 3. Arqueologia.
4. Patoecologia. 5. Tafonomia. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.9654

Morgana Camacho Rodrigues de Almeida

Patoecologia da enterobíase em populações ancestrais de *Pueblo* dos Estados Unidos da América.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia em Saúde Pública, da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 15 de Dezembro de 2017.

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Claudia Maria Antunes Uchôa Souto Maior
Universidade Federal Fluminense - Instituto Biomédico

Prof^a. Dra. Veronica Wesolowski de Aguiar e Santos
Universidade de São Paulo - Museu de Arqueologia e Etnologia da USP

Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Cassius Schnel Palhano Silva
Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Prof^a. Dra. Alena Mayo Iñiguez (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

Para minha mãe, meu pai e meu marido, com todo o meu carinho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Dr. Adauto Araújo, pelo privilégio de tê-lo como orientador tanto no mestrado como no doutorado. Sou grata por ele ter feito parte da minha formação enquanto pesquisadora e pessoa. Pela paciência de sempre, pela calma e tranquilidade durante os ensinamentos. Por ter possibilitado a melhor experiência que já tive em minha vida, que foi a realização do doutorado com um projeto incrível.

Ao Dr. Karl Jan Reinhard por me ensinar tudo que sei. Por ampliar meus horizontes, e me ensinar a amar o que faço. Pelos ensinamentos da vida e por compartilhar todo seu conhecimento. Pelas visitas aos lugares mais lindos que já vi em minha vida. Pelas conversas nos momentos difíceis. Por não me deixar desistir. Por seu meu orientador, amigo e pai. À família do Dr. Karl Reinhard: Dra. Debra Meier, Maricel Reinhard, Andrew Reinhard, Lena e Zorro por terem me acolhido como se fosse um membro da família. Por toda a amizade e suporte psicológico. Todos vocês são minha família. Amo vocês!

Aos arqueólogos e guias do *National Park Service* de *Aztec Ruins*, *Chaco Canyon* e *Mesa Verde* e ao *San Juan County Archaeological Research Center and Library – Salmon Ruins Museum*, em especial Nancy Espinosa por possibilitar a coleta de amostras, pela colaboração, gentileza e interesse imenso no progresso desse trabalho.

Aos arqueólogos Carrie Heitman e Phil Heitman pelas discussões e complementações sobre a arqueologia e escavação dos sítios estudados nessa tese. Pela contribuição acerca do modo de vida das populações da cultura *Pueblo*, sem a qual não seria possível estabelecer as complexas associações relacionadas à infecção por *Enterobius vermicularis*.

Ao Dr. Scott Gardner, pelos ensinamentos, paciência, discussões em parasitologia e filogenética. Nunca esquecerei o carinho e atenção de todos do *H. W. Manter Laboratory*. Pelos seminários incríveis, obrigada!

Aos amigos Dan e Kathy Rotherham pelo carinho. Pelos eventos maravilhosos e os *cookies* mais deliciosos do mundo, que me acalmaram nas horas mais difíceis. Pelas boas conversas e conselhos. Obrigada!

À minha mãe por todos os ensinamentos. Meus princípios e valores são seus. Obrigada por tudo. Sou o que sou hoje por sua causa. Ao meu pai pelas conversas e apoio. Pela paciência e ensinamentos. Amo vocês.

Ao meu marido, Vitor Barbosa, por aguentar todos os meus maus momentos e compartilhar os bons. Pela paciência e conselhos. Pelos alertas certos e pelo colo. Te amo muito e para sempre!

Muito obrigada a todos!

RESUMO

A patoecologia estuda os fatores ambientais e culturais que influenciam na manifestação de infecções ou doenças. O conceito é aplicado para estudo em populações antigas, visto que dados quantitativos provenientes desse tipo de material são escassos. Para avaliar cenários epidemiológicos no passado e correlaciona-los com dados atuais, é necessário unir a patoecologia à quantificação de vestígios de parasitos, no entanto, são necessárias condições ideais de preservação. Sítios arqueológicos da cultura *Pueblo* são uns dos poucos que fornecem essas condições. Estudos anteriores constataram que essas populações eram infectadas principalmente com *Enterobius vermicularis* e que a frequência de infecção por esse parasito estava associada ao estilo de moradia adotado ao longo do tempo. Contudo, alguns sítios de moradia mais simples possuíam frequências maiores do que sítios de estilo de habitação mais complexo, como por exemplo, *Turkey Pen Cave* e *Salmon Ruins*, respectivamente. Recentemente foi demonstrado que a metodologia quantitativa utilizada nesses estudos não é a ideal para estimar a frequência de infecção de modo preciso. Além disso, em alguns sítios, é sugerido que fatores tafonômicos também sejam responsáveis pela estimativa errônea. O trabalho teve por objetivo investigar a patoecologia da infecção por *E. vermicularis* em *Turkey Pen Cave*, *Salmon Ruins* e em duas latrinas de *Aztec Ruins*, com o auxílio de metodologia quantitativa recomendada. Além de aspectos patoecológicos foram avaliados parâmetros estatísticos descritivos e comparativos a fim de conhecer o impacto epidemiológico da infecção por *E. vermicularis*. Ácaros e larvas de nematódeos, fatores tafonômicos ecológicos não investigados anteriormente, foram correlacionados estatisticamente à degradação dos ovos por meio de regressão. Elevadas frequências de infecção por *E. vermicularis* foram observadas em todos os sítios, exceto em *Aztec Ruins* 219, onde observou-se a correlação estatisticamente significativa entre a degradação dos ovos e a presença de ácaros. *Salmon Ruins* apresentou a maior média de intensidade. A distribuição de *E. vermicularis* foi agregada em todas as populações de estudo. Os dados indicam que provavelmente todos os períodos de ocupação estavam altamente infectados, independentemente do estilo de moradia adotado. A distribuição agregada de *E. vermicularis* nas populações estudadas sugere que esses dados poderiam ser correlacionados à dados parasitológicos e epidemiológicos atuais. O estudo revela um novo panorama paleoparasitológico da infecção por *E. vermicularis* em populações ancestrais da cultura *Pueblo*.

Palavras-chave: *Enterobius*. Epidemiologia. Arqueologia. Patoecologia. Tafonomia.

ABSTRACT

Pathoecology studies the environmental and cultural factors that influence in the manifestation of infections or diseases. This concept is applied in ancient population's studies, since quantitative data from this type of material are scarce. To evaluate epidemiological scenarios in the past and correlate them with current data, it is necessary to join pathoecology to the quantification of parasite remains, however, ideal preservation conditions are necessary. Ancestral Puebloan sites are some of the few that provide these conditions. Previous studies have found that these populations were infected mainly with *Enterobius vermicularis* and that the prevalence of infection was directly associated with the habitation style adopted over time. However, some simpler habitation sites had higher frequencies than more complex habitation style sites, such as Turkey Pen Cave and Salmon Ruins, respectively. It has recently been demonstrated that the quantitative methodology used in these studies is not ideal for estimating the frequency of infection accurately. In addition, in some sites, it is suggested that taphonomic factors are also responsible for erroneous estimation. The objective of this work was to investigate the pathoecology of *E. vermicularis* infection in Turkey Pen Cave, Salmon Ruins and two latrines of Aztec Ruins, with the aid of a quantitative methodology. In addition to the pathoecological aspects, descriptive and comparative statistical parameters were evaluated in order to know the epidemiological impact of *E. vermicularis* infection. Mites and nematode larvae, ecological taphonomic factors not previously investigated, were statistically correlated to egg degradation by regression. High frequencies of infection by *E. vermicularis* were observed in all sites except Aztec Ruins 219, where the statistically significant correlation between egg degradation and the presence of mites was observed. Salmon Ruins had the highest mean intensity. The distribution of *E. vermicularis* was aggregated in all studied populations. The data indicate that all periods of occupation were probably highly infected, regardless of the type of habitation adopted. The aggregate distribution of *E. vermicularis* in the populations studied suggests that these data could be correlated with current parasitological and epidemiological data. The study reveals a new paleoparasitological scenario of *E. vermicularis* infection in Ancestral Pueblo populations.

Keywords: Enterobius. Epidemiology. Archaeology. Pathoecology. Taphonomy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Mapa da localização da região de <i>San Juan Basin</i> habitada pelas populações antigas da cultura <i>Pueblo</i> . Fonte: Karl Reinhard (08/2016).....	29
Figura 2 A e B –	(A) Sítio <i>Atlatl Cave</i> , localizado em <i>Chaco Canyon</i> , Novo México, EUA, caracterizado por ser um abrigo-sob-rocha utilizado por grupo do período <i>Archaic</i> (7000 AC – 200 AD). Fonte: VIVIAN (1990). (B) Representação gráfica de abrigo temporário construído por grupo do período <i>Archaic</i> durante a época de caça e coleta. Fonte: http://www.crowcanyon.org/educationproducts/pueblo_history_kid/s/archaic_houses.asp	31
Figura 3 A e B -	(A) Representação de uma <i>Pithouse</i> , adaptado de VIVIAN e HILPERT (2012b). (B) Representação da estrutura de ventilação de uma <i>pithouse</i> . Fonte: <i>Mesa Verde National Park</i> , Colorado, EUA.....	33
Figura 4 A e B –	(A) Representação de uma <i>pithouse</i> do período de ocupação <i>Basketmaker III</i> (400 AD – 700 AD). Fonte: http://www.crowcanyon.org/educationproducts/peoples_mesa_verde/basketmaker_III_housing.asp . (B) Fotografia de uma <i>pithouse</i> construída no período <i>Basketmaker III</i> e localizada no <i>Mesa Verde National Park</i> , Colorado, USA.....	34
Figura 5 A e B –	(A) <i>Ramada</i> contemporânea similar à estrutura construída no período de ocupação <i>Pueblo I</i> . Fonte: VIVIAN e HILPERT (2012b). (B) Representações do estilo de moradia construído pelas populações do período <i>Pueblo I</i> . À esquerda: vista externa da construção; à direita: vista interna demonstrando os recintos e <i>kiva</i> interligados. Fonte: PLOG (2008a).....	35
Figura 6 –	Sequência de estilos de construção demonstrando o padrão de crescimento ao longo do tempo até as construções de <i>Great Houses</i> , sendo “a” construção <i>Pueblo I</i> e “f” construção <i>Pueblo III</i> . Fonte: VIVIAN e HILPERT (2012b).....	36
Figura 7 -	<i>Pueblo Bonito</i> , principal <i>Great House</i> de <i>Chaco Canyon</i> . Fonte: PLOG (2008a).....	38
Figura 8 –	Mapa das “estradas” e <i>Great Houses</i> da cultura <i>Chaco</i> . A seta indica a <i>Great North Road</i> que conecta <i>Chaco Canyon</i> a <i>Salmon Ruins</i> , indicados pelas figuras quadrada e oval, respectivamente. Outras “estradas” demonstradas no mapa conectam as demais <i>Great Houses</i> da cultura <i>Chaco</i> , indicadas pelos diversos pontos escuros, ao centro ritualístico e religioso da cultura. Fonte: DOYEL (1992a).....	40
Figura 9 -	Mapa da localização de Mesa Verde, <i>Salmon Ruins</i> , <i>Aztec Ruins</i> e <i>Chaco Canyon</i> indicadas pelos círculos. Fonte: VIVIAN (1990f).....	41

Figura 10 A e B –	(A) - Planta esquemática de <i>Salmon Ruins</i> demonstrando os inúmeros recintos que eram destinados a diferentes funções de acordo com as necessidades diárias da população da segunda ocupação. A seta indica o local da única latrina preservada (recinto 62W) e a seta pontilhada indica a localização do <i>kiva</i> elevado, o que sugere uma utilização associada dos dois recintos; fonte: <i>San Juan County Archaeological Research Center and Library Salmon Ruins Museum</i> . (B) – Fotografia da única latrina remanescente, recinto 62W. A seta indica a localização do “banco” construído com pedras de arenito e adobe, provavelmente utilizado para a deposição das fezes.....	43
Figura 11 –	Vista aérea de <i>Aztec West Ruin, Aztec Ruins, Aztec</i> , Novo México, EUA. A seta indica o <i>Great Kiva</i> reconstruído durante as escavações de Earl H. Morris (1916-1934) (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Fonte: NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR (2016).....	46
Figura 12 –	Fotografia da cobertura original de um dos recintos de <i>Aztec West Ruin</i> . Foto: Karl Reinhard.....	47
Figura 13 –	Planta esquemática de <i>Aztec West Ruin</i> . As setas indicam as latrinas preservadas nesse sítio. A seta inteira indica o recinto 219 e a seta pontilhada indica o recinto 225. Fonte: NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR (2016a).....	47
Figura 14 –	Mapa da região de <i>Grand Gulch</i> , Utah. O ponto no centro do mapa indica a localização de <i>Turkey Pen Cave</i> . Fonte: MATSON e CHISHOLM (1991).....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Antes de Cristo
AD	<i>Anno Domini</i>
AP	Antes do Presente
cm	Centímetro
CMC	<i>La Cueva de los Muertos Chiquitos</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EPI	Equipamento de Proteção Individual
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
HCL	Ácido clorídrico
km	Quilômetro
m	Metro
ml	Mililitro
Na ₃ PO ₄	Fosfato Trissódico
OPG	Ovos por grama
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
UNL	<i>University of Nebraska - Lincoln</i>
VMR	Razão entre Variância e Média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	INTENSIDADE DE INFECÇÃO E A DISTRIBUIÇÃO BINOMIAL NEGATIVA	27
3	A CULTURA CHACO	29
3.1	OS SÍTIOS <i>TURKEY PEN CAVE</i>, <i>SALMON RUINS</i> E <i>AZTEC RUINS</i>	38
3.1.1	<i>Salmon Ruins, Bloomfield, Novo México, EUA</i>	38
3.1.2	<i>Aztec Ruins, Aztec, Novo México, EUA</i>	44
3.1.3	<i>Turkey Pen Cave, Grand Gulch, Utah, EUA</i>	48
4	METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA APLICADA EM ESTUDOS ANTERIORES	50
5	TAFONOMIA	52
6	JUSTIFICATIVA	58
7	METODOLOGIA	60
7.1	AMOSTRAS	60
7.1.1	Processamento	60
7.1.2	Metodologia quantitativa	61
8	ARTIGO 1 - <i>RECOVERING PARASITES FROM MUMMIES AND COPROLITES: AN EPIDEMIOLOGICAL APPROACH</i>. ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA <i>PARASITES AND VECTORS</i>	63
9	ARTIGO 2 - <i>CONSIDERATIONS ON PINWORM PATHOECOLOGY IN THREE ANCESTRAL PUEBLO SITES AND POSSIBLE CORRELATION WITH MODERN EPIDEMIOLOGICAL STUDIES</i>. SUBMETIDO ÀS MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ	100
10	ARTIGO 3 - <i>TAPHONOMIC CONSIDERATIONS ON PINWORM PREVALENCE IN THREE ANCESTRAL PUEBLOAN LATRINES</i>. SUBMETIDO AO <i>JOURNAL OF ARCHAEOLOGICAL SCIENCE REPORTS</i> ..	127

11	CONCLUSÃO	154
	REFERÊNCIAS	156

1 INTRODUÇÃO

A Patoecologia estuda fatores ambientais (bióticos e abióticos) e culturais (comportamentais) que determinam a manifestação e manutenção de doenças em populações (MARTINSON et al., 2003; REINHARD; BRYANT, 2008). O termo foi idealizado por Karl R Reinhard, em 1974 (REINHARD, 1974a, 1974b) quando se propôs a estudar a história das doenças infecciosas e sua correlação com mudanças climáticas. Desprovido de dados históricos epidemiológicos e estatísticos acurados, aplicou o conceito de patoecologia na tentativa de reconstruir o cenário ecológico das infecções ao longo do tempo (REINHARD, 1974a, 1974b; REINHARD; ARAÚJO, 2012).

O conceito de patoecologia se baseia na teoria da *nidalidade* desenvolvida por Pavlovsky em 1966 (PAVLOVSKY, 1966). De acordo com essa teoria, toda infecção possui um *nidus* ou uma área na qual ocorre a interação de fatores que possibilitam sua manifestação (REINHARD; ARAÚJO, 2012). O *nidus* é interpretado como o habitat natural de determinada infecção e pode ser sazonal ou permanente. É definido pelo clima, vegetação, solo e demais condições nas quais hospedeiros, patógenos, vetores e reservatórios estão inseridos e interagem entre si (REINHARD; ARAÚJO, 2012). O *nidus* também pode ser chamado de foco natural (VIEITES, 2014). Nesse estudo, no entanto, adotamos o termo e a definição utilizados por Pavlovsky.

A patoecologia auxilia na reconstrução teórica do *nidus* de determinada condição, de modo a auxiliar no entendimento do cenário epidemiológico (REINHARD; BRYANT, 2008). Esse conceito é utilizado principalmente no estudo de condições de saúde e doença em populações antigas, visto que não é possível obter dados epidemiológicos legítimos de populações que não existem na atualidade, sem algum tipo de registro (MILNER; BOLDSSEN, 2017). Diante desse cenário, o patoecologista parte da observação de determinada condição ou vestígio de patógeno para buscar entender e determinar os fatores ambientais e comportamentais que levaram à ocorrência do desfecho (REINHARD; BRYANT, 2008).

De maneira a compreender melhor as diferenças entre o conceito de patoecologia e a utilização da teoria da *nidalidade* foi realizada uma revisão bibliográfica da literatura. Nesta revisão buscou-se evidenciar a descrição do *nidus* ou dos *nidi* e os fatores patoecológicos que determinaram a manifestação, manutenção ou modificação nos padrões de infecção em sítios arqueológicos estudados. Os trabalhos se concentram no estudo de infecções parasitárias realizados em sítios arqueológicos localizados no continente Americano, principalmente no

Chile, Peru, México e EUA, devido à excelente preservação do material estudado e à possibilidade de correlacionar os cenários epidemiológicos evidenciados a populações específicas, o oposto do que ocorre na maioria dos sítios da Europa, por exemplo, cujos estudos são baseados na análise de latrinas que concentram a deposição de material fecal proveniente de diversas áreas e períodos cronológicos.

Um dos primeiros estudos publicados dentro dessa temática foi o estudo de Callen e Cameron (1960), no qual, pela primeira vez se realizou inquérito nutricional e parasitológico em coprólitos. O estudo foi realizado com amostras do sítio arqueológico *Huaca Prieta* localizado na costa do *Valle Chicama*, Peru. A datação pela técnica do radiocarbono indicou uma ocupação de não mais de 3000 anos AC, considerada a mais antiga da região do *Valle Chicama*. Trata-se de cultura pré-cerâmica, cujos artefatos de lasca bruta de pedra eram os mais representativos (CALLEN; CAMERON, 1960a).

Apesar de não utilizar o termo patoecologia, os autores discutem, dentro dos conhecimentos científicos do período, fatores pertinentes ao modo de vida dessa população. Para tanto, Callen e Cameron analisaram coprólitos provenientes de um *mound*, definido por (MENDONÇA DE SOUZA, 1997) como “uma elevação natural do solo, de pouca altura, em zona inundável, podendo ou não ter servido para assentamento de populações pré-históricas”. As amostras foram analisadas para dieta e parasitos intestinais. A maioria das amostras estava distribuída nos estratos dos perfis arqueológicos e algumas eram provenientes do único sepultamento encontrado no local. Os autores também descrevem pela primeira vez, o uso da técnica de reidratação com solução aquosa de fosfato trissódico (Na_3PO_4) a 0,5%, amplamente utilizada no processamento de coprólitos dessecados. Apesar de se tratar de uma região litorânea, o clima seco da região provavelmente possibilitou a preservação das amostras fecais (CALLEN; CAMERON, 1960a).

De acordo com as análises, esse grupo consumia vegetais e frutos do mar como era sugerido pela localização do sítio. Foram observadas sementes de pimenta (*Capsicum* sp.); tecidos do fruto e sementes de abóbora (Curcubitaceae); pelos vegetais recurvados (tricomos) identificados como pertencentes à família Leguminosae (*Canavalia* sp. e *Phaseolus* sp.), tecidos de raízes, resquícios de mexilhão, outros bivalves, gastrópodes, crustáceos, ouriço-do-mar e peixes. Em uma das amostras foram recuperadas estruturas consideradas pelo autor como “em grande quantidade” semelhantes a ovos de *Diphyllobothrium* sp. Os autores os

identificam como pertencentes à espécie *D. trinitatis*, devido ao tamanho e presença de estrutura semelhante a opérculo.

Diphyllobothrium spp. são platelmintos, cestódeos, pertencentes à família Diphylobothriidae cujos adultos podem chegar a 10 m de comprimento. São parasitos generalistas cujo hospedeiro definitivo, um carnívoro (canídeo, felino, mustelídeo, pinípede, ursídeo), se infecta ao ingerir a larva plerocercóide alojada na musculatura de peixes, que são o segundo hospedeiro intermediário de *Diphyllobothrium* spp. (REY, 2008a; ROBERTS; JANOBY JR; NADLER, 2013a). Humanos se infectam ao se alimentarem de peixe cru ou malcozido. A infecção por esse parasito é geralmente assintomática, no entanto, em alguns casos são desenvolvidos sintomas como náuseas, desconforto abdominal, diarreia e fraqueza. Menos comum é a manifestação de anemia megaloblástica causada pela deficiência crônica de vitamina B₁₂ ocasionada pela absorção desse nutriente pelo parasito (ROBERTS; JANOBY JR; NADLER, 2013a). Outra via de infecção pode ocorrer pela ingestão acidental de copépodos (primeiro hospedeiro intermediário) infectados com a larva procercóide, por meio da água. Essa infecção ocasiona esparganose que se caracteriza pelo desenvolvimento da larva procercóide em plerocercóide e migração para o globo ocular, os músculos ou o cérebro. A esparganose pode resultar em patologia severa, dependendo do local de alojamento da larva (ROBERTS; JANOBY JR; NADLER, 2013a).

Com base nos dados descritos pelos autores discute-se aspectos da patoecologia da infecção por *Diphyllobothrium* spp. nesse sítio. A média da medida dos ovos encontrados pelos autores é de 60µm x 30µm, o que os leva a optar pelo diagnóstico de *D. trinitatis*. Entretanto, considerando estudos publicados na literatura recente, o provável diagnóstico é de que os ovos pertencem ao parasito *Adenocephalus pacificus* (Syn. *Diphyllobothrium pacificum*). O tamanho dos ovos (média de 41-62µm x 35-48µm) desse parasito e a epidemiologia da infecção corroboram com esse diagnóstico (KUCHTA; SERRANO-MARTÍNEZ; SCHOLZ, 2015; LEŠTINOVÁ et al., 2016). *Diphyllobothrium trinitatis* é considerada uma espécie *inquirenda*, ou seja, de status taxonômico duvidoso devido a dados de descrição insuficientes (KUCHTA; SERRANO-MARTÍNEZ; SCHOLZ, 2015). *Diphyllobothrium latum* ocorre somente no hemisfério Norte, a média do tamanho dos ovos desse parasito é maior do que a dos ovos encontrados e os peixes que atuam como segundo hospedeiro intermediário são de água doce. Esses fatos descartam essas espécies como possível diagnóstico dos ovos encontrados.

Partículas escuras encontradas nos microresíduos dos coprólitos sugerem que os alimentos eram assados externamente, porém crus ou pouco cozidos no interior, o que provavelmente contribuiu para que a infecção ocorresse (CALLEN; CAMERON, 1960a). Entretanto, a preservação dos ovos ditos “em grande quantidade”, em um dos coprólitos analisados, sugere essa era a única amostra positiva para ovos desse parasito, visto que as amostras foram descritas como igualmente bem preservadas, descartando a degradação dos ovos como um provável fator que tivesse interferido na interpretação do achado (CALLEN; CAMERON, 1960a).

A baixa frequência de infecção se deve provavelmente à influência de constituintes da dieta dessa população. Entre os alimentos mais frequentemente encontrados nas amostras analisadas estão a abóbora (Curcubitaceae) e a pimenta (*Capsicum* sp.). Ambos os alimentos possuem propriedades que podem ter auxiliado no tratamento de infecções por helmintos. As sementes de abóbora são utilizadas por populações atuais no tratamento de infecções por helmintos (IQBAL et al., 2001; PAKSOY; AYDIN, 2004; UKWUBILE, 2012) e as sementes de pimenta possuem propriedade laxativa, que pode ter auxiliado na eliminação do parasito (CALLEN; CAMERON, 1960a). O consumo de peixe cru ou malcozido, mesmo que menos representativo quando comparado a outros elementos deve ser levado em conta no que diz respeito à exposição da população à infecção por *A. pacificus*, no entanto, outros elementos da dieta desse grupo provavelmente contribuíram para que a infecção não fosse frequente nessa população.

Existe uma particularidade mencionada a respeito do único sepultamento encontrado no *mound*. Na região abdominal desse sepultamento, cuja amostra foi negativa para ovos de parasito, foi evidenciada a presença de grande quantidade de areia (12 “pacotes”). Callen e Cameron sugerem que esses “pacotes” de areia resultam do consumo intencional ocasionado pela infecção por ancilostomídeos (CALLEN; CAMERON, 1960a; REY, 2008b). Ovos e larvas de ancilostomídeos já foram relatados em sítios arqueológicos, sob ótimas condições de preservação, visto a fragilidade dessas estruturas (REINHARD; PUCU, 2014). No entanto, a infecção por ancilostomídeos possivelmente não ocorreu nesse grupo, pois há evidências que contrapõe à existência do *nidus* dessa infecção no sítio estudado. No ciclo de vida dos ancilostomídeos, as larvas eclodem no solo e infectam o hospedeiro por meio da penetração ativa na pele. Considerando a preservação do material arqueológico, caso a infecção por ancilostomídeos estivesse presente, larvas se preservariam, evidenciando a infecção. Ancilostomídeos são geohelmintos e seus ovos necessitam permanecer pelo menos entre 24 e

48 horas no solo, sob condições ótimas de temperatura e umidade, para que ocorra o desenvolvimento embrionário do parasito (REY, 2008c; ROBERTS; JANOBY JR; NADLER, 2013b). A concentração de coprólitos no *mound* estudado, sem a identificação de nenhum outro local de deposição do material fecal sugere que este seria era o único utilizado para esse fim. Considerando esse fato, as fontes de infecção ficariam isoladas da população, de modo que, mesmo que houvesse ovos ou larvas do parasito, não teria sido possível que a infecção ocorresse. A preservação dos ovos de *Diphyllobothrium* sp. sugere que, caso existissem no material, os ovos ou as larvas de ancilostomídeos também se preservariam nesse material, pois são considerados igualmente frágeis e quaisquer fatores tafonômicos que contribuíssem para a degradação de um, provavelmente contribuiriam para a degradação do outro (MITCHELL, 2017).

Arriaza e colaboradores (2010) se basearam em estudos ecológicos para determinarem o *nidus* e discutirem aspectos da patoecologia da difilobotríase comparada à de *Anisakis* sp., outro parasito zoonótico presente em populações contemporâneas e provavelmente em populações antigas do norte do Chile (ARRIAZA et al., 2010).

Anisakidae é um nematódeo parasito de mamíferos aquáticos, principalmente golfinhos (Delphinidae), leões-marinhos (Otariidae) e baleias (Balaenopteridae), além de aves que se alimentam de peixes, o hospedeiro intermediário. Humanos se infectam acidentalmente pelo consumo de peixe cru ou malcozido, salgado, marinado ou em conserva. A infecção pode ser assintomática ou resultar no desenvolvimento de sintomas brandos ou severos, que se manifestam em decorrência da penetração das larvas nos tecidos estomacal e intestinal do hospedeiro. Dentre os sintomas são citados: dores de estômago, náusea, vômito e diarreia (ROBERTS; JANOBY JR; NADLER, 2013c). Reações de hipersensibilidade também podem ocorrer, mesmo diante do cozimento da carne do peixe, pois mesmo após a morte do parasito, moléculas alergênicas resistem ao calor. O parasito não se amadurece sexualmente no organismo humano, portanto, não há liberação de ovos nas fezes. Dessa forma, o diagnóstico é baseado em exame de endoscopia (ROBERTS; JANOBY JR; NADLER, 2013c).

Infecções por parasitos da ordem Diphyllbothriidea e do gênero *Anisakis* sp. são comuns nas costas do Peru e Chile e resultam dos hábitos alimentares das populações dessas regiões que incluem peixe cru ou malcozido como ingrediente de pratos típicos. O principal é o *ceviche* feito com pescado cru e condimentos, servido e consumido diariamente (ARRIAZA et al., 2010; IMILAN, 2015; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2017). A epidemiologia das

infecções por esses parasitos está atualmente correlacionada à temperatura da água do mar que se altera de acordo com a ocorrência dos fenômenos *El - Niño* (quente) e *La - Niña* (frio) (ARRIAZA et al., 2010). A distribuição da infecção por *Adenocephalus pacificus* está associada à temperatura quente da água do mar, enquanto que a de *Anisakis* sp. ocorre associado à temperatura fria. O deslocamento das correntes oceânicas associado aos fenômenos *El-Niño* e *La-Niña* e a mudança na temperatura da água do mar ocasiona a inversão dos *nidi* das infecções. Considerando esse cenário ecológico, os autores investigaram se a influência desses fenômenos ocorreu em períodos antigos, de modo a estabelecer a antiguidade da mudança epidemiológica sofrida pelas populações dessa região ao longo do tempo. O estudo foi realizado por meio de revisão bibliográfica para estabelecer a frequência de infecção por *A. pacificus* baseado na análise de coprólitos em populações antigas da região, e também no registro zoológico do consumo de peixes hospedeiros intermediários de *Anisakis* sp, para estabelecer a possível infecção por esse parasito.

De acordo com os autores os fenômenos acima descritos influenciaram na dinâmica da infecção por esses parasitos e modificaram os *nidi* de modo que *A. pacificus* foi mais frequente nas populações Andinas antigas. Portanto, nos períodos em que esse parasito foi diagnosticado a temperatura da água do mar estava quente, o que beneficiou o ciclo biológico do parasito. O fator cultural relacionado ao consumo de peixe faz com que essa infecção ocorra há pelo menos 6000 anos nas populações Andinas e a influência dos fenômenos climáticos realiza a inversão dos *nidi* desses parasitos por igual período (ARRIAZA et al., 2010).

Martinson e colaboradores (2003) estudaram a patoecologia de infecções em quatro sítios da cultura *Chiribaya* (700 AD – 1350 AD), localizados no Peru. Aspectos culturais e ambientais observados durante as escavações desses sítios foram relacionados a agentes parasitológicos causadores de infecção humana. Existem diferenças na localização, elevação relacionada ao nível do mar e disponibilidade de recursos hídricos que provavelmente influenciaram na frequência e nos tipos de infecções que acometiam as populações humanas e animais que habitavam esses sítios. As populações eram sedentárias, realizavam agricultura, caça e coleta de recursos disponíveis no ambiente, pastoreio de camelídeos e a criação de *cuyes* (porquinhos da índia – *Cavia porcellus*) para consumo, sendo expostas a agentes infecciosos devido a esses hábitos culturais (MARTINSON et al., 2003).

Os sítios estudados foram *San Gerónimo*, *Chiribaya Alta*, *Chiribaya Baja* e *El Yaral*. A arquitetura de todos os sítios, com construções de recintos fechados para habitação, possibilitaria a criação de um *nidus* favorável à transmissão de infecções veiculadas pelo ar, como por exemplo, enterobíase e tuberculose, no entanto não houve achado se ovos de *Enterobius vermicularis* em coprólitos desses sítios, e não foram realizadas análises paleogenéticas para o diagnóstico de *Mycobacterium tuberculosis* em tecidos mumificados. *Adenocephalus pacificus* foi o parasito mais frequente nos sítios estudados. Em todos os sítios há evidência de consumo de peixes, o que possibilitaria a infecção do parasito. Os autores mencionam que por volta do ano 1350 AD ocorreu o fenômeno do *El-Niño*, que de acordo com Arriaza e colaboradores (2010) favoreceria o aumento da frequência de infecção por esse parasito, e explica os dados parasitológicos observados nos sítios estudados. *Trichuris trichiura* foi encontrado em duas de oito amostras analisadas em *San Gerónimo*. Esse parasito é um geo-helminto cujos ovos necessitam permanecer durante 21 dias no solo, sob condições ideais de temperatura e umidade, para que ocorra o desenvolvimento embrionário (ROBERTS; JANOVY JR; NADLER, 2013d). A infecção por esse parasito também pode ter sido favorecida pela ocorrência do fenômeno do *El-Niño*, pois sendo caracterizado por períodos de seca, provavelmente diminuiu a precipitação nessa área ocasionando a concentração das áreas hídricas que podem ter se tornado poluídas pelo material fecal humano depositado. O ambiente úmido proporcionado pela fonte hídrica possibilitaria o desenvolvimento embrionário dos ovos do parasito e a utilização da água no cultivo de subsistência e consequente má higienização dos alimentos poderia ocasionar a infecção (ARRIAZA et al., 2010).

Santoro e colaboradores (2003) analisaram o impacto do império Inca sobre a região de *Lluta Valley*, localizada no Chile. Antes da expansão Inca, *Lluta Valley* era caracterizada por uma aldeia pequena, com baixa densidade populacional, poucas habitações e subsistência baseada em alimentos cultivados localmente. Análises de coprólitos desse período de ocupação revelaram a presença de *T. trichiura* e *Hymenolepis nana*. A possibilidade de utilização de material fecal como adubo para o cultivo de alimentos pode ter favorecido a infecção por *T. trichiura*. A infecção por *Hymenolepis nana* pode ocorrer por meio da ingestão de artrópodes infectados com a forma cisticercóide do parasito, pela transmissão direta de humano para humano ou por meio da autoinfecção (ROBERTS; JANOVY JR; NADLER, 2013a). As análises de coprólitos não evidenciaram consumo de artrópodes, portanto as duas últimas formas de infecção são as mais prováveis nesse cenário

epidemiológico. Essa hipótese é corroborada pela higiene precária demonstrada pela presença de *T. trichiura* nas amostras estudadas. Após o domínio do império Inca, a cultura da população de *Lluta Valley* sofreu modificações. A densidade populacional aumentou e alimentos provenientes de outras regiões foram introduzidos na subsistência da população, o que ocasionou a infecção por parasitos que não estavam presentes na população no período anterior à influência Inca. A análise de coprólitos datados desse período evidenciou a presença de ovos de *E. vermicularis* e *A. pacificus*. Esses parasitos, não observados no período anterior, são correlacionados à hábitos culturais e ambientais que foram modificados após o contato com a cultura Inca. A transmissão de *E. vermicularis* pode ocorrer por meio do contato entre indivíduos, por inalação dos ovos, pela contaminação de alimentos ou água, por retro-infecção decorrente da eclosão dos ovos depositados pela fêmea na região perianal ou auto-infecção pela ingestão de ovos presentes sob as unhas (após prurir a região anal) (ROBERTS; JANOVY JR; NADLER, 2013g). A introdução desse parasito na população de *Lluta Valley* após o contato com os Incas se deveu provavelmente aos fatores mencionados anteriormente como facilitadores da infecção, como o aumento populacional e consequente aglomeração de pessoas. Já *A. pacificus* foi introduzido como agente infeccioso devido à mudança na dieta da população local (SANTORO; VINTON; REINHARD, 2003).

Na América do Norte os estudos estão focados na região do Sudoeste dos Estados Unidos, no *Colorado Plateau* localizado no *Four Corners* que compreende os atuais estados do Colorado, Novo México, Arizona e Utah. Essa região era habitada pelas populações da cultura *Pueblo*, uma das mais importantes sociedades pré-históricas das américas e apresenta condições ambientais ideais para a preservação de remanescentes humanos. Esta cultura era caracterizada pela arquitetura única representada pelas *Great Houses*, construções com até 650 recintos que eram utilizadas como habitação, centro ritualístico e religioso, local de enterramento e armazenamento de mantimentos e latrinas (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Três sítios arqueológicos dessa cultura são objeto de estudo da presente tese e as interpretações de publicações a respeito da patoecologia de infecções nessas populações auxiliarão no melhor entendimento da patoecologia de infecções que por ventura sejam evidenciadas nos sítios estudados.

Um dos sítios mais estudados foi *Antelope Cave*, um abrigo-sob-rocha que possui vestígios de ocupação dessas populações desde o período mais antigo, conhecido como *Basketmaker II* (100 AD – 400 AD) até o período *Pueblo III* (1020 AD – 1350 AD) (FUGASSA et al., 2011; JOHNSON et al., 2008). Trata-se de um abrigo-sob-rocha, utilizado

por essas populações durante o período de caça. Grupos *Pueblo* utilizavam *Antelope Cave* como abrigo e também realizavam o plantio de milho e feijão e a coleta de plantas que cresciam naturalmente no ambiente (JOHNSON et al., 2008).

Com base na análise de amostras de coprólitos coletadas em *Antelope Cave* foi possível verificar se esses grupos consumiam artrópodes de maneira intencional, uma hipótese sugerida em 1977 por Gary Fry (FRY, 1977). Para tanto, Johnson e colaboradores (2008) analisaram coprólitos humanos desse sítio e recuperaram um fragmento praticamente inteiro de um carrapato que foi identificado como da espécie *Dermacentor andersoni*. Análises de macro e microresíduos da dieta demonstraram que a base da alimentação consistia principalmente de milho e semente de girassol, que eram moídos para o consumo (JOHNSON et al., 2008). O fragmento praticamente inteiro do carrapato e a consistência moída dos elementos da dieta indicam que o carrapato não pode ter sido consumido como um contaminante dos alimentos, ou teria sido moído juntamente com o milho e a semente de girassol. De acordo com Roberts e colaboradores (2013) carrapatos da espécie *D. andersoni* são hematófagos e parasitam sciurídeos, leporídeos, erinaceídeos, cervídeos, bovídeos, canídeos e homínídeos que se infectam em regiões cuja fitofisionomia seja arbustiva (ROBERTS; JANOVY JR; NADLER, 2013e). Esse tipo de vegetação não está disponível na região de *Antelope Cave* (JOHNSON et al., 2008), entretanto, está em regiões próximas, o que poderia ter possibilitado o contato humano com o carrapato e ocasionado a infecção. Também é possível que carrapatos dessa espécie tenham infestado coelhos e outros animais que eram caçados para a subsistência dessas populações. Tendo em vista a preservação da morfologia do carrapato, este provavelmente foi removido de um hospedeiro humano ou de um animal de caça, e consumido para realizar o controle da infestação. Em todo o caso, mesmo que o consumo intencional não fosse comprovado, o simples achado de fragmentos de *D. andersoni* nas fezes preservadas dos sítios da cultura *Pueblo* indica que essas populações estavam expostas ao contato com patógenos transmitidos por esses hospedeiros invertebrados. O parasitismo ou o consumo desse carrapato podem ocasionar o desenvolvimento de doenças virais, como a doença de *Powassan*, que pode resultar em sequelas no sistema nervoso; a febre do carrapato do Colorado, que pode causar febre hemorrágica; e a febre maculosa, que pode causar distúrbios motores (ROBERTS; JANOVY JR; NADLER, 2013e). Mais branda é a possibilidade do desenvolvimento de processo alérgico ocasionado pelas toxinas secretadas pelo carrapato durante o repasto sanguíneo (JOHNSON et al., 2008). Análises paleogenéticas em tecidos mumificados poderiam evidenciar infecção por esses vírus, o que permitiria

ampliar o conhecimento sobre os processos de saúde e doença vivenciados por essas populações ao longo do tempo.

O achado de outro carrapato da mesma espécie por Fugassa e colaboradores (2011) corroborou com o resultado publicado por Johnson e colaboradores (2008). Além dessa evidência, Fugassa e colaboradores (2011) também encontraram ovos de parasitos intestinais. Foram observados ovos de *Macracanthorhynchus ingens* pertencente ao filo Acanthocephala e do nematódeo *E. vermicularis* (FUGASSA et al., 2011). A infecção humana por parasitos do filo Acanthocephala ocorre por meio da ingestão de artrópodes das classes Insecta, Myriapoda e Crustacea (ROBERTS; JANOBY JR; NADLER, 2013f). No caso de *M. ingens* a infecção ocorre pelo consumo de grilos ou baratas, que já foram evidenciados, em estudos anteriores, em coprólitos humanos da cultura *Pueblo* (FRY, 1977). A infecção por esses parasitos pode ocasionar microhemorragias causadas pela inserção do rostelo com ganchos na parede intestinal dos hospedeiros. Além da perda de nutrientes pode haver infecções bacterianas no local de fixação do rostelo, causando danos à parede intestinal. O segundo parasito encontrado, *Enterobius vermicularis*, foi o mais frequente, observado em cinco das 22 amostras analisadas, o que representa uma frequência de 18%. Comparada com estudos anteriores, em outros sítios da cultura *Pueblo*, a frequência de *E. vermicularis* em *Antelope Cave* é uma das maiores. Outros sítios de diferentes períodos de ocupação apresentaram frequências de: 29% (7 positivas/24 analisadas) em *Turkey Pen Cave* (2050 AP – 1775 AP), 21% (4/15) em *Pueblo Bonito* (920 AP – 870 AP/1080 AP – 980 AP), 25% (44/180) em *Antelope House* (1400 AP; 925 AP; 860 AP), 19% (3/17) em *Inscription House* (750 AP – 700 AP), 10% (2/20) em *Bighorn Sheep Ruin* (950 AP – 850 AP), 8% (9/112) em *Salmon Ruins* (900 AP – 750 AP) e 7% (5/76) em *Mesa Verde* (1000 AP – 800 AP). Amostras de coprólitos coletados em *Kin Kletso* (1000 AP – 1100 AP) e em *Glen Canyon* (900 AP – 1100 AP) foram negativas para o parasito (REINHARD; ARAÚJO; MORROW, 2016).

Apesar de pertencerem à mesma cultura, os sítios apresentaram frequências distintas. Essa diferença é justificada por algumas hipóteses, entre elas a preservação dos ovos, isso porque as maiores frequências foram observadas em sítios com melhor preservação, enquanto que as menores foram observadas em sítios cujos ovos do parasito se encontravam mal preservados (REINHARD; ARAÚJO; MORROW, 2016). Outra justificativa foi sugerida por Hugot e colaboradores (1999), que correlacionaram as elevadas frequências, observadas principalmente em sítios de ocupação recente, ao estilo de habitação que possibilitava a aglomeração de indivíduos e a elevada densidade populacional. Esses sítios eram

caracterizados pela presença de *Great Houses* que continham grande quantidade de recintos e poderiam abrigar maior densidade populacional. A hipótese dos autores é a de que as frequências de infecção por *E. vermicularis* seriam elevadas em *Great Houses* associadas ou não a abrigos-sob-rocha e seriam menores em sítios caracterizados por abrigos sob-rocha que não apresentam construções de recintos (HUGOT et al., 1999). Nos sítios *Antelope House* (25%) e *Inscription House* (19%) que são caracterizados por *Great Houses* construídas em associação com abrigos-sob-rocha e *Pueblo Bonito* (21%), uma *Great House*, as frequências eram elevadas, enquanto que em *Glen Canyon*, um abrigo-sob-rocha, a frequência foi de 0. No entanto, há sítios que são caracterizados por *Great Houses* associadas ou não à abrigos-sob-rocha que possuem baixa frequência de infecção e sítios caracterizados por abrigos-sob-rocha sem construções, onde elevadas frequências foram observadas. *Salmon Ruins* uma *Great House* com frequência de 8% e *Turkey Pen Cave* um abrigo-sob-rocha com frequência de 29% são exemplos desses casos. Isso significa que a hipótese de Hugot e colaboradores (1999) sobre a epidemiologia e patoecologia da transmissão de *E. vermicularis* nessas populações necessita ser revista.

Outro exemplo de estudo patoecológico foi o realizado no sítio *La Cueva de Los Muertos Chiquitos* (CMC) (1400 – 1200 anos atrás), localizado em *Durango*, região de *El Zape*, México. Esse foi um dos sítios que mais contribuiu para os estudos sobre a relação parasito-hospedeiro em populações humanas antigas devido à diversidade de achados de parasitos humanos e zoonóticos (JIMÉNEZ et al., 2012). CMC é caracterizado por um abrigo-sob-rocha que serviu de local de habitação para a população da cultura *Loma San Gabriel*, de hábito sedentário e subsistência baseada no cultivo, caça e coleta (JIMÉNEZ et al., 2012). A análise de coprólitos humanos coletados nesse sítio evidenciou a presença de ovos dos parasitos *Echinostoma* sp., *Hymenolepis* sp., *Trichuris* sp., *Dipylidium caninum*, *E. vermicularis* e *Ancylostoma duodenale*. A frequência de infecção por *E. vermicularis* (44%) representa a maior entre todos os sítios estudados até o momento e, assim como nas populações ancestrais da cultura *Pueblo*, evidencia a elevada densidade populacional e a aglomeração vivenciada por essa população. O fato de que essa frequência foi a mais elevada entre todos os sítios estudados pode indicar duas possibilidades: a primeira é que essa população estava intensamente infectada o que retrata os hábitos culturais da população e estabelece o *nidus* da infecção; e a segunda, é que a preservação excelente desse material, contribuiu para a interpretação de que a frequência observada é a maior entre todos os sítios estudados, quando poderia ser que outros sítios apresentassem maiores frequências reais de

infecção caso os ovos do parasito apresentassem boa preservação. Em geral, sítios arqueológicos da cultura *Pueblo* possuem elevadas frequências de infecção por esse parasito, porém, em alguns sítios, os ovos nem sempre estavam bem preservados e isso pode ter influenciado nas baixas frequências observadas que não corresponderiam à realidade epidemiológica. Para esclarecer esse ponto há a necessidade da realização de estudos tafonômicos investigativos e experimentais.

O achado de *A. duodenale* (8%) e *T. trichiura* (6%) em CMC indica que essas populações viviam em condições precárias de saneamento e higiene. A região onde esse sítio arqueológico se encontra é caracterizada por clima árido, com pouca disponibilidade de recursos hídricos. Possivelmente essa população utilizou os poucos corpos d'água disponíveis como local de deposição de fezes, visto que ambos os parasitos necessitam de condições de temperatura e umidade ideais para o embrionamento dos ovos, o que não ocorre em ambiente árido (ROBERTS; JANOVY JR; NADLER, 2013d). A água contaminada provavelmente foi utilizada para consumo e irrigação da plantação de subsistência, o que pode ter causado a infecção por esses parasitos (JIMÉNEZ et al., 2012). Cães conviviam intimamente com humanos nessa cultura, o que explica a presença de cápsulas ovíferas de *D. caninum* nos coprólitos humanos. A infecção por esse parasito ocorre geralmente pela ingestão acidental ou intencional de pulgas, que são o hospedeiro intermediário (JIMÉNEZ et al., 2012). Infecção com *Echinostoma* sp. ocorre pela ingestão de anfíbios e moluscos, que são os hospedeiros intermediários desse parasito (JIMÉNEZ et al., 2012). Provavelmente o himenolepídeo observado corresponde à *H. nana*, cuja infecção é ocasionada de duas maneiras: autoinfecção ou pela ingestão de artrópodes (ROBERTS; JANOVY JR; NADLER, 2013a).

Os estudos detalhados anteriormente esclarecem o uso da patoecologia como ferramenta que adiciona questões culturais ao conceito de *nidalidade*, o que permite conhecer a epidemiologia das infecções em populações antigas, mesmo sem a disponibilidade de dados estatísticos. A patoecologia identifica variáveis que contribuem para a manifestação e manutenção de infecções em populações, o que permite realizar comparações entre cenários ecológicos antigos e atuais e auxilia na prevenção de situações de emergência de infecções ou doenças. Apesar de sua aplicação essencial para a interpretação do impacto das infecções em populações antigas, a patoecologia é uma novidade ainda pouco aplicada em estudos parasitológicos em material arqueológico.

Durante os primeiros trinta anos de sua existência, a paleoparasitologia, ciência que estuda parasitos em material antigo, buscou responder a questões que visavam compreender a dinâmica de infecção entre parasitos e hospedeiros e sua distribuição ao longo do tempo. Questões sobre a migração de populações pré-históricas e de infecções adquiridas ou herdadas ao longo do tempo, foram respondidas, o que auxiliou no entendimento da história da espécie humana desde os primórdios (ARAÚJO et al., 2008a). Com o passar dos anos se fez necessário verificar o real impacto dessas infecções na vida dessas populações, o que demandou a introdução do pensamento patoecológico como ferramenta de interpretativa (REINHARD; BRYANT, 2008). Camacho e colaboradores (2017) revisaram estudos de frequência de infecção por parasitos intestinais em coprólitos e múmias e sugerem que o conceito de patoecologia seja aplicado essencialmente em todos os estudos de cunho populacional em sítios arqueológicos (ARAÚJO; REINHARD; FERREIRA, 2015).

Geralmente se busca associar o achado parasitológico à sintomatologia que, na parasitologia, é evidenciada pela intensidade de infecção fornecida por dados quantitativos (REINHARD; BUIKSTRA, 2003). Também se busca correlacionar esses dados à emergência e reemergência de infecções atuais, de modo a auxiliar no estudo epidemiológico das infecções no presente (CAMACHO et al., 2017; REINHARD; BUIKSTRA, 2003). Entretanto, na grande maioria das vezes, não é possível obter dados quantitativos em sítios arqueológicos, principalmente devido à preservação precária das evidências parasitárias (REINHARD; BUIKSTRA, 2003).

Somente em alguns sítios arqueológicos, onde a preservação de remanescentes humanos antigos é adequada, há a possibilidade de aplicar o conceito de patoecologia juntamente com metodologias quantitativas, que esclarecem o real impacto das infecções na vida das populações (REINHARD, 1992a; REINHARD; BUIKSTRA, 2003). Reinhard e Buikstra (2003) e mais recentemente de Morrow e Reinhard (2017) são alguns dos poucos exemplos de estudos onde essa associação foi possível. Quando aplicáveis, os métodos quantitativos são utilizados para se estabelecer além da frequência, a intensidade de infecção e a distribuição dos parasitos em seus hospedeiros, o que permite correlacionar com dados epidemiológicos contemporâneos e dá aporte à interpretação patoecológica (MORROW; REINHARD, 2017; REINHARD; BUIKSTRA, 2003).

A complexidade cultural dos *Pueblo* e principalmente a excelente preservação do material arqueológico fornecem a situação ideal para o estudo dos determinantes das

infecções e de seu impacto na vida dessas populações, tanto com relação à cultura quanto à cronologia.

2 INTENSIDADE DE INFECÇÃO E A DISTRIBUIÇÃO BINOMIAL NEGATIVA

Atualmente, pesquisas parasitológicas em material arqueológico estão se voltando para questões de cunho epidemiológico. Para tanto, além na interpretação patoecológica é necessário aplicar metodologias quantitativas que permitem determinar a quantidade de opg, estimar a intensidade de infecção, avaliar a distribuição dos parasitos nessas populações e finalmente, a possível relação entre infecção parasitária e patologias ósseas (CAMACHO et al., 2017; MORROW; REINHARD, 2017; RÁCZ et al., 2015; REINHARD; BUIKSTRA, 2003).

A distribuição dos parasitos nos hospedeiros pode ser observada estatisticamente pelo cálculo da razão entre a variância e a média. Crofton (1971) demonstrou que a distribuição da população de parasitos em seus hospedeiros é geralmente agregada. Desde então, esse padrão de distribuição foi considerado uma premissa tanto em hospedeiros vertebrados quanto em invertebrados (ANDERSON; MAY, 1985; CROMPTON; KEYMER; ARNOLD, 1984; SHAW; GRENFELL; DOBSON, 1998). Croll e Ghadirian (1981) também demonstraram esse mesmo padrão de dispersão em quatro geo-helminthos parasitos de humanos (CROLL; GHADIRIAN, 1981). Na distribuição agregada, cerca de 70% dos parasitos está concentrada em 10% dos hospedeiros, a variância é maior do que a média e a razão entre essas medidas resulta em um valor maior que 1 (CROFTON, 1971; REINHARD; BUIKSTRA, 2003).

Do ponto de vista paleopatológico a demonstração da distribuição agregada de parasitos em populações antigas permite interpretações de diferentes perspectivas. Elevada intensidade de infecção pode interferir na condição física de hospedeiros. Esse fato pode ser demonstrado pela diminuição da capacidade reprodutiva do hospedeiro, diminuição da taxa de crescimento, pela expressão de sintomas ou aumento nas taxas de mortalidade. Considerando essas variáveis é possível correlacionar a observação de patologias ósseas e outros sinais bioarqueológicos com a influência da agregação dos parasitos na saúde dos hospedeiros (RÁCZ et al., 2015; REINHARD; BUIKSTRA, 2003).

Indivíduos com elevada intensidade de infecção atuam como focos e contribuem para a transmissão de parasitos na população (REINHARD, 1992b). Estratégias de controle de infecção em populações atuais visam o tratamento desses indivíduos para diminuir a transmissão. Em populações antigas esse fato é evidenciado pelo achado de vestígios de plantas com propriedades medicinais em amostras de indivíduos com elevada quantidade de opg (FUGASSA et al., 2011; TEIXEIRA-SANTOS et al., 2015). Desse modo, o estudo da

distribuição das populações de parasitos complementa as evidências patoecológicas e auxilia na correlação dos dados arqueológicos com dados epidemiológicos.

3 A CULTURA CHACO

A cultura *Pueblo* é caracterizada por um estilo de vida sedentário, cuja subsistência é baseada principalmente no cultivo de milho (*Zea mays*), abóbora (*Curcubitacea*) e feijão (*Fabaceae*) e pela arquitetura complexa que tem como principal marco as *Great Houses*, que são construções com diversos recintos e até 5 níveis, além de *kivas*, que são construções subterrâneas, em sua maioria, utilizadas para rituais e cerimônias religiosas. Populações dessa cultura habitaram principalmente a região de *San Juan Basin* (Figura 1) localizada no Sudoeste dos EUA há pelo menos 2000 anos e seus descendentes ainda utilizam algumas das construções pré-históricas como moradia (PLOG, 2008b; VIVIAN; HILPERT, 2012b).

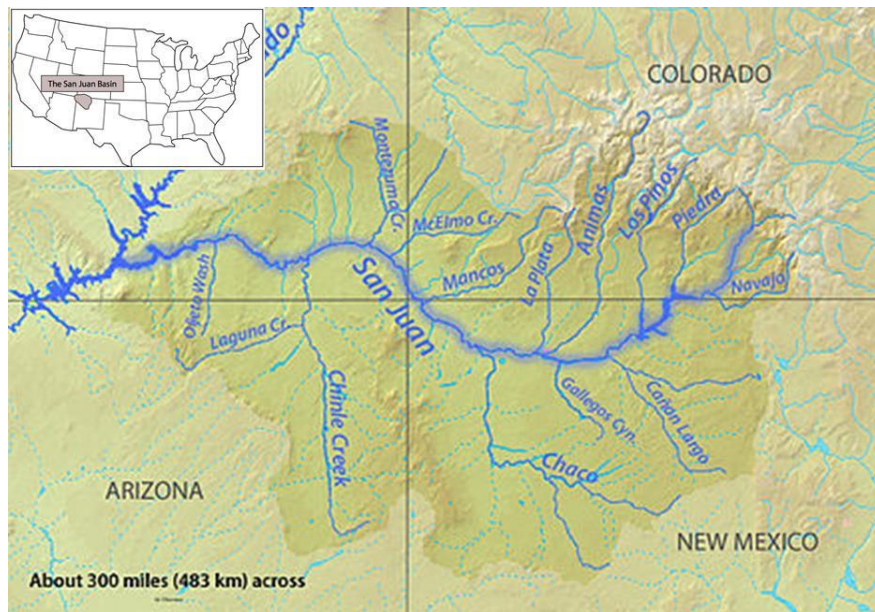


Figura 1 – Mapa da localização da região de *San Juan Basin* habitada pelas populações antigas da cultura *Pueblo*. Fonte: Karl Reinhard (08/2016).

Datações e períodos de ocupação da cultura *Pueblo* são classificados de acordo com pelo menos sete escalas de tempo. A mais utilizada é a denominada *Pecos Classification* idealizada na década de 1920 por Alfred Kidder que sugeriu que os períodos de ocupação fossem divididos em uma sequência cultural. Essa classificação divide os períodos de ocupação em seis fases: *Basketmaker I* ou *Late Archaic* (7000 AC - 200 AD) *Basketmaker II* (100 – 400 AD), *Basketmaker III* (400 – 700 AD), *Pueblo I* (70 – 920 AD), *Pueblo II* (920 – 1020 AD) e *Pueblo III* (1020 – 1350 AD) (VIVIAN, 1990c).

O primeiro período de ocupação reconhecido como início da cultura *Chaco* é o período *Basketmaker II*, no entanto é necessário descrever aspectos da vida de grupo *Archaic*

de ocupação anterior, para que se possa entender as transições que ocorreram ao longo do tempo e o que desencadeou a complexidade da cultura *Pueblo*, representada principalmente pela área de *San Juan Basin*, onde *Chaco Canyon*, centro cultural e religioso da cultura, está localizado. O grupo *Archaic* é descendente de grupos de caçadores-coletores denominados *Paleo-Indians* (9500 BC – 7000 BC). Existem aproximadamente 1887 sítios classificados nesse período de ocupação, datado entre 7000 AC e 200 AD e dividido em *Early Archaic*, *Middle Archaic* e *Late Archaic* (VIVIAN, 1990a). *Early* e *Middle Archaic* são períodos nos quais a população era caracterizada por pequenos grupos que tinham na caça e na coleta de recursos disponíveis no ambiente o seu principal meio de subsistência. O período *Late Archaic* é considerado o início da cultura *Pueblo* e era caracterizado por grupos de maior densidade populacional ainda dependentes da caça e coleta de recursos, mas que também praticavam a agricultura (PLOG, 2008c; VIVIAN, 1990a).

Em todos os períodos de ocupação *Archaic*, a população era nômade e utilizava abrigos-sob-rocha que serviam de abrigo e proporcionavam proteção de intempéries climáticas (Figura 2 A). Durante ocasiões em que havia a necessidade de migrar para obter recursos, especula-se que os grupos construía abrigos rústicos, semelhantes a acampamentos (Figura 2 B). A caça e a coleta eram planejadas de acordo com a disponibilidade dos recursos em cada estação do ano. Durante a primavera e o verão havia maior disponibilidade de vegetais e animais de pequeno porte que eram caçados com a utilização de armadilhas confeccionadas com “cordas” feitas de fibras de *Yucca*. No outono e inverno, com a diminuição de plantas e pequenos animais disponíveis, caçavam animais de grande porte (PLOG, 2008c).

Dentre os animais caçados podem ser citados os cervos (Cervidae), os carneiros selvagens (*Ovis* sp.), os antílopes (Bovidae), os bisões (*Bison* sp.), os coiotes (*Canis* sp.), os texugos (Mustelidae), os lincas (*Lynx* sp.), os coelhos (Leporidae) e os roedores das famílias Geomyidae e Sciuridae. Dentre os vegetais coletados são citados: sementes de gramíneas, pinhão, frutos e aréolas de cactos dos gêneros *Cylindropuntia*, *Carnegiea* e *Opuntia*, frutos das árvores dos gêneros *Prosopis* e *Juniperus*, além de sementes e folhas de plantas dos gêneros *Chenopodium* e *Descurainia*. Esses recursos eram armazenados em pequenos abrigos anexos ao abrigo-sob-rocha utilizado pelo grupo (VIVIAN; HILPERT, 2012a).

A população do período *Archaic* parece ter desenvolvido “grupos sociais” demarcados por “redes regionais” diferenciadas pelo estilo das pontas de lança utilizadas. Dentro das

“redes regionais” havia as denominadas “zonas de estilo” que eram áreas identificadas pela similaridade no padrão das pontas de lança. No período *Middle Archaic* essas zonas começaram a se concentrar em áreas menores evidenciando uma menor distribuição geográfica dos grupos. A densidade populacional aumentou, a mobilidade para caça e coleta foi diminuindo gradativamente e os grupos ficaram mais associados a áreas específicas e aos recursos oferecidos por elas. No período *Late Archaic*, se iniciou o cultivo de milho, abóbora e posteriormente de feijão, o que desencadeou modificações no estilo de vida, relacionadas principalmente à habitação que passou a ser baseada na construção de vilas. O tamanho e a complexidade das construções foram um dos fatores utilizados para identificar os períodos de ocupação cronologicamente.

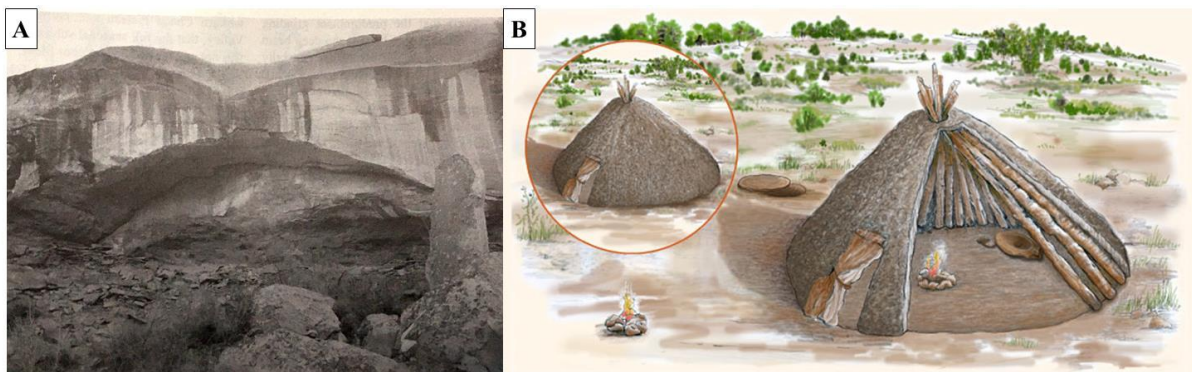


Figura 2 A e B – (A) Sítio *Atlatl Cave*, localizado em *Chaco Canyon*, Novo México, EUA, caracterizado por ser um abrigo-sob-rocha utilizado por grupo do período *Archaic* (7000 AC – 200 AD). Fonte: VIVIAN (1990). (B) Representação gráfica de abrigo temporário construído por grupo do período *Archaic* durante a época de caça e coleta. Fonte: http://www.crowcanyon.org/educationproducts/pueblo_history_kids/archaic_houses.as p.

O período de ocupação seguinte é denominado *Basketmaker II* (100 BC – 400 AD) e é caracterizado por uma população de hábito mais sedentário do que a do período *Archaic*. Os grupos identificados nesse período ainda praticavam a caça e a coleta de recursos, porém tinham maior dependência do cultivo, principalmente de milho e abóbora. Construam habitações resistentes e permanentes denominadas *pithouses*, armazenavam o que produziam para consumo durante o inverno em “antecâmaras” anexas às habitações, produziam cestarias e sandálias de *Yucca* e vestimentas de pele de coelhos. No período tardio dessa ocupação, os grupos iniciaram a produção de objetos de cerâmica utilizados principalmente para o

armazenamento de recursos. Existem aproximadamente 150 sítios datados desse período, um número bem menor do que os identificados como pertencentes ao período *Archaic*. Essa diferença provavelmente se deve à identificação errônea dos sítios *Basketmaker II* como *Archaic*.

Ao contrário das habitações rústicas construídas pelos grupos do período *Archaic*, as *pithouses*, construídas no período *Basketmaker II*, eram mais resistentes (PLOG, 2008d). *Pithouses* eram habitações utilizadas por pequenos grupos durante a maior parte do ano, especialmente no inverno. Eram construídas em formato quadrado ou retangular com 5m a 8 m de comprimento e escavadas cerca de 1m a 2 m abaixo do nível do solo (PLOG, 2008d; VIVIAN; HILPERT, 2012b). As paredes eram formadas por bastões de madeira fincados no solo, dispostos próximos uns aos outros, intercalados por pequenos fragmentos de madeira cobertos com adobe (mistura de terra, água, fragmentos de madeira e fibras) e reforçadas com “lajes” feitas de arenito (VIVIAN; HILPERT, 2012b). O recinto era protegido por uma cobertura plana também feita de adobe e sustentada por quatro vigas de madeira verticais dispostas em um formato quadrado (Figura 3 A). Nessa cobertura havia uma abertura em formato quadrado que permitia a entrada e saída de pessoas, por meio de uma escada de madeira (Figura 3 B). Essa abertura também fazia parte do mecanismo que possibilitava a circulação de ar que era realizada da seguinte forma: o ar entrava por uma abertura localizada no nível do solo, direcionado por um defletor de arenito posicionado próximo a abertura do solo e eliminado por meio da abertura localizada na cobertura da *pithouse* (Figura 3 C) (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Apesar de possibilitar a entrada de ar, esse mecanismo provavelmente não era eficiente quanto à circulação. As *pithouses* também possuíam “antecâmaras” anexas que eram utilizadas para armazenar recursos (Figura 3 A) (VIVIAN; HILPERT, 2012b).

A transição para *Basketmaker III* (400 AD – 700 AD) ocorreu devido à mudanças climáticas que favoreceram o aumento da precipitação (VIVIAN, 1990d). Como consequência da maior disponibilidade de chuvas houve maior investimento e dependência da agricultura, baseada principalmente no cultivo de milho, abóbora e feijão; os grupos se tornaram mais sedentários e aumentaram demograficamente. Um número maior de *Pithouses* foi construído. A estrutura dessas habitações se tornou mais complexa e espaçosa quando comparada com as construções do período *Basketmaker II*. Havia mais divisões, uma fogueira central, reforço estrutural nas paredes feito com “lajes” de arenito e maior quantidade de aberturas que possibilitavam a circulação do ar (Figura 4 A e B) (VIVIAN; HILPERT,

2012b). A produção de cerâmicas se tornou mais complexa e estilos de confecção regionais foram desenvolvidos. Também nesse período ocorreu a invenção do arco e flecha, que possibilitou o aprimoramento da caça realizada por esses grupos (VIVIAN; HILPERT, 2012b).

No período *Basketmaker III*, *kivas* foram construídos pela primeira vez. Essas construções possuem importância ritual para os *Pueblo* e são observadas em todos os períodos de ocupação, a partir de *Basketmaker III*. Ao longo do tempo, o estilo de construção se manteve, porém foram utilizados materiais mais resistentes e as dimensões desses recintos se tornaram maiores (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Tratam-se de recintos construídos geralmente no subsolo, utilizados principalmente para cerimônias religiosas e rituais (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Nos *kivas* há estruturas semelhantes a “bancos” em formato circular de onde partem as bases utilizadas para a construção de coberturas que eram feitas com troncos de madeira. Assim como nas *pithouses* havia um local destinado à fogueira, uma abertura ao sul da construção, que juntamente com um defletor, permitia a circulação de ar pela construção e uma abertura na cobertura do *kiva* que possibilitava a entrada e saída de pessoas (Figura 3 C). Em alguns *kivas* também era confeccionada uma pequena abertura ao nível do solo denominada *sipapu*, representando a comunicação da construção ritual com o “submundo” (VIVIAN; HILPERT, 2012b).

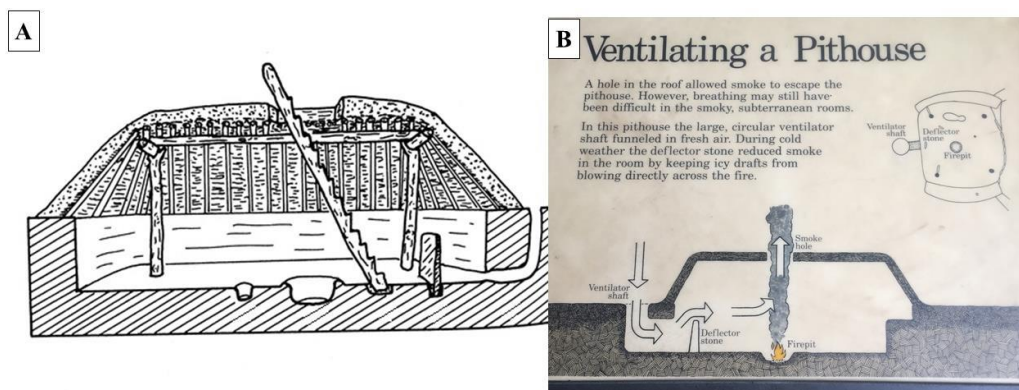


Figura 3 A e B – (A) Representação de uma *Pithouse*, adaptado de VIVIAN e HILPERT (2012b). (B) Representação da estrutura de ventilação de uma *pithouse*. Fonte: *Mesa Verde National Park*, Colorado, EUA.

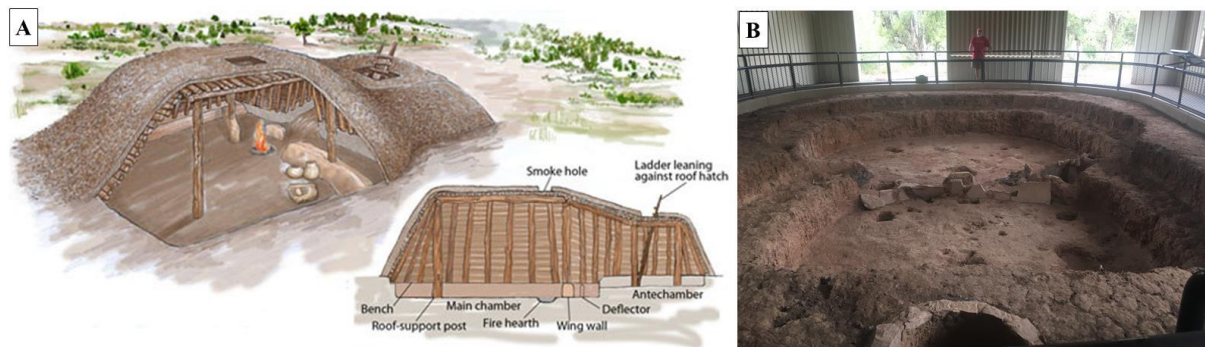


Figura 4 A e B – (A) Representação de uma *pithouse* do período de ocupação *Basketmaker III* (400 AD – 700 AD). Fonte: http://www.crowcanyon.org/educationproducts/peoples_mesa_verde/basketmaker_III_housing.asp. (B) Fotografia de uma *pithouse* construída no período *Basketmaker III* e localizada no *Mesa Verde National Park*, Colorado, USA.

Por volta de 700 AD o clima começou a se modificar novamente, gerando adaptações e mudanças culturais que aconteceram gradativamente e marcaram o fim do período de ocupação *Pueblo I* (700 AD - 920 AD) (VIVIAN, 1990e). Migrações ocorriam constantemente e o número de grupos populacionais aumentou na região do *Colorado Plateau* (PLOG, 2008a). Nesse período de ocupação houve oscilações no nível de precipitação e anos secos e chuvosos se intercalaram, o que permitiu a manutenção do cultivo de vegetais para subsistência (VIVIAN, 1990e). No entanto, entre os anos 850 AD e 900 AD as precipitações se tornaram mais escassas e os anos chuvosos se tornaram cada vez menos frequentes. A temperatura aumentou e as fontes de água subterrâneas diminuíram resultando na erosão dos locais onde eram realizados os cultivos (VIVIAN, 1990e).

Pithouses eram construídas em “cadeias” de 4 a 5 recintos interligados que eram utilizados como habitação e também para armazenamento de recursos (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Na construção eram utilizados blocos de pedra de arenito, adobe e troncos de madeira para a confecção da cobertura. Também eram construídas estruturas denominadas *ramadas* (Figura 5 A) que eram uma espécie de tenda localizada a frente dos recintos designados ao armazenamento de recursos (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Um ou mais *kivas* anexos eram construídos e interligados a essas construções por meio de uma passagem subterrânea (Figura 5 B) (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Essa estrutura é reconhecida como o modelo base para a construção de *Great Houses* (PLOG, 2008a).

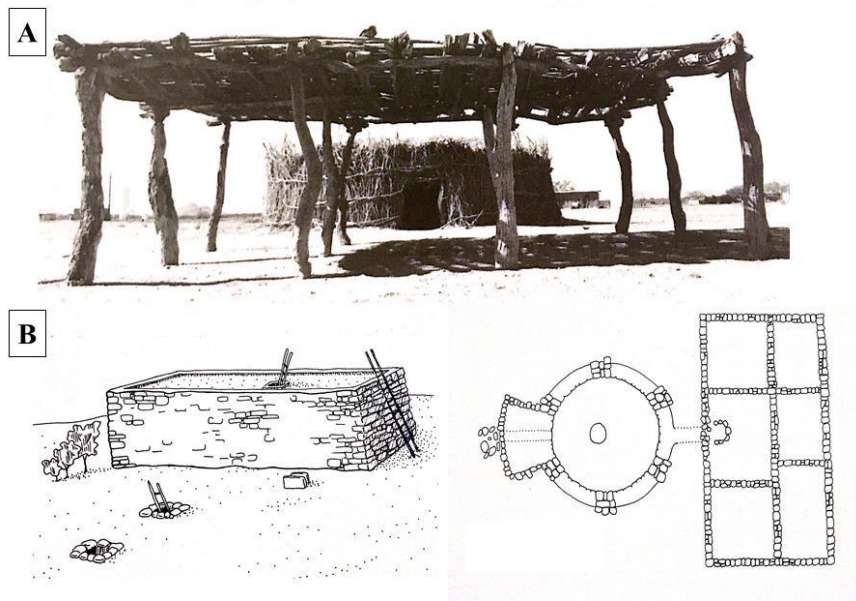


Figura 5 A e B – (A) *Ramada* contemporânea similar à estrutura construída no período de ocupação *Pueblo I*. Fonte: VIVIAN e HILPERT (2012b). (B) Representações do estilo de moradia construído pelas populações do período *Pueblo I*. À esquerda: vista externa da construção; à direita: vista interna demonstrando os recintos e *kiva* interligados. Fonte: PLOG (2008a).

Great Houses eram construções que possuíam até cinco níveis e diversos recintos que eram utilizados como local de habitação, armazenamento de alimentos, local ritualístico, de enterramento de indivíduos ou latrinas (VIVIAN; HILPERT, 2012b). A construção das *Great Houses* teve início na região de *Chaco Canyon* entre os anos 850 e 1080 AD, durante os períodos *Pueblo II* e *Pueblo III*. *Plazas* (locais abertos) e *Great Kivas* utilizados para rituais e cerimônias religiosas eram construídos dentro dos limites das *Great Houses* (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Geralmente, a construção se iniciava com um núcleo de recintos na parte norte e se estendia para as partes leste e oeste, que eram interligadas por uma fileira única de recintos (Figura 6) (VIVIAN; HILPERT, 2012b). As *Great Houses* eram direcionadas para o sul, o que possibilitava a entrada de raios solares e o aquecimento durante o inverno. A partir do final dos anos 1000 AD e início dos anos 1100 AD (*Pueblo III*), *Great Houses* começaram a ser construídas em locais fora de *Chaco Canyon* se estendendo para as periferias de *San Juan Basin*. Essas *Great Houses* seguiam o mesmo padrão de construção adotado na região de *Chaco Canyon* e por isso ficaram conhecidas como *Chaco Outliers* (VIVIAN; HILPERT, 2012b).

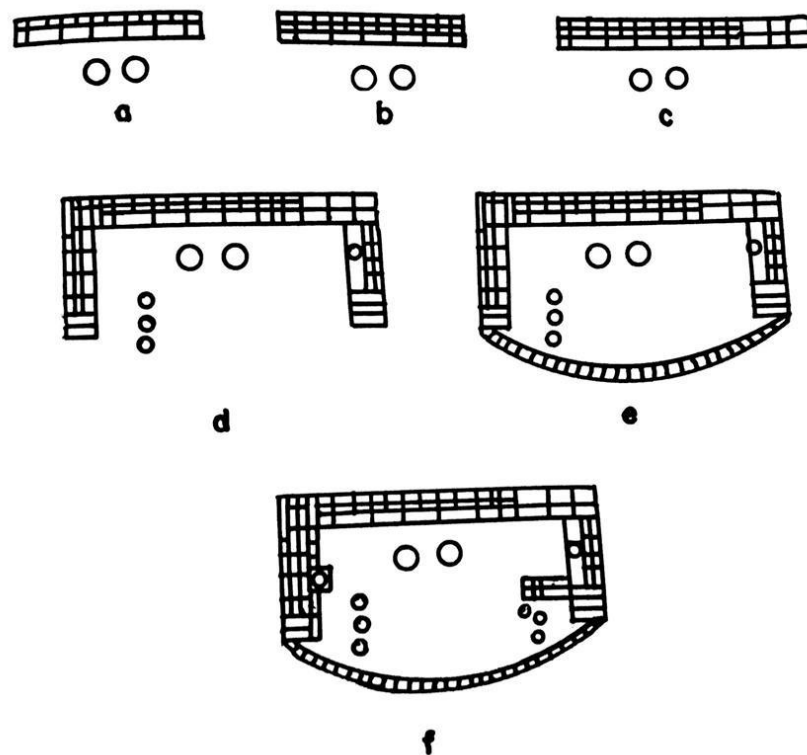


Figura 6 – Sequência de estilos de construção demonstrando o padrão de crescimento ao longo do tempo até as construções de *Great Houses*, sendo “a” construção *Pueblo I* e “f” construção *Pueblo III*. Fonte: VIVIAN e HILPERT (2012b).

Por volta de 920 AD o clima mudou novamente para uma condição mais úmida, com temperaturas quentes, aumento da precipitação e dos níveis de reservas de água subterrâneas (VIVIAN, 1990f). Essa modificação favoreceu novamente a prática da agricultura, aumentando a quantidade de áreas, especialmente de planícies de inundação, onde o cultivo era realizado (VIVIAN, 1990f). Em consequência houve aumento e dispersão populacional que desencadeou adaptações culturais, especialmente relacionadas à arquitetura e estilo das construções. Assim teve início o período de ocupação *Pueblo II* (920 – 1020 AD) (VIVIAN, 1990f).

Nesse período as populações se tornaram mais sedentárias e mais dependentes da agricultura (PLOG, 2008a). As modificações em si não diferem significativamente das realizadas em outros períodos, também desencadeadas por mudanças climáticas favoráveis ou desfavoráveis à prática da agricultura (VIVIAN, 1990f). No entanto, o que difere esse período dos outros é a magnitude e a rapidez com que ocorreram as mudanças culturais, especialmente relacionadas à arquitetura. Foi durante *Pueblo II* que houve o início do período de construção

de *Great Houses*, especialmente na região de *Chaco Canyon*, o centro da cultura *Pueblo* (VIVIAN, 1990f).

O período de ocupação *Pueblo III* (1020 AD – 1350 AD) é caracterizado principalmente pela complexidade das construções de *Great Houses* (Figura 7). Entre 1020 AD e 1120 AD o clima ainda era favorável à prática da agricultura, o que influenciou no crescimento demográfico. Nesse período também se iniciaram construções de *Great Houses* em outros locais da *San Juan Basin* e de “estradas” que realizavam a comunicação entre *Chaco Canyon* e os *outliers*, como eram conhecidas as *Great Houses* que não eram construídas no centro de *Chaco Canyon*.

Após esses anos iniciais, os períodos de seca se tornaram mais frequentes e intensos e a agricultura foi afetada. Tecnologias de redirecionamento de cursos d’água para a região foram realizadas, no entanto a situação não pôde ser resolvida por muito tempo e a região de *San Juan Basin* entrou em colapso, culminando com a migração e abandono na região, por volta de 1350 AD.



Figura 7 – *Pueblo Bonito*, principal *Great House* de *Chaco Canyon*. Fonte: PLOG (2008a).

3.1 OS SÍTIOS *TURKEY PEN CAVE*, *SALMON RUINS* E *AZTEC RUINS*

3.1.1 *Salmon Ruins*, *Bloomfield*, Novo México, EUA

Salmon Ruins é uma *Great House outlier* construída pela cultura *Chaco* e está localizada há aproximadamente 5 km da cidade de *Bloomfield*, Novo México e há 72 km de *Chaco Canyon*. Esse sítio foi escavado por Cynthia Irwin-Williams e sua equipe na década de 1970 (VIVIAN; HILPERT, 2012b). *Salmon Ruins* e *Chaco Canyon* eram conectadas pela *Great North Road*, uma das principais “estradas” construídas para ligar o centro ritualístico e religioso em *Chaco Canyon* aos vários *outliers* da cultura *Pueblo* (Figura 8) (DOYEL, 1992). A *Great House* de *Salmon Ruins* representa a principal construção de um complexo onde também há pequenas unidades de *Pueblo* (*Pueblo Units* – construções com padrão semelhante à *Great House*, porém menores e construídas com a função de habitação para um grupo de pessoas) (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Possuía cerca de 250 recintos, sendo 150 construídos no primeiro nível e 100 construídos no segundo nível da *Great House*, dentre estes, dois *kivas* (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Os outros recintos eram utilizados como habitação, local de enterramento, armazenamento de recursos para subsistência, latrinas, ou locais ritualísticos. O sítio foi construído às margens do rio *San Juan*, sobre um depósito aluvial voltado para a

planície de inundação que era utilizada para o cultivo de milho, abóbora e feijão (VIVIAN; HILPERT, 2012b).

Datações realizadas pela técnica de dendrocronologia evidenciaram que *Salmon Ruins* foi construída entre 1088 AD e 1100 AD, um período de tempo considerado curto quando comparado com o tempo de construção de outras *Great Houses*. *Pueblo Bonito*, a maior *Great House* de *Chaco Canyon* foi construída em um período de três séculos (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Adições e remodelações estruturais foram realizadas antes do ano 1130 AD. Após esse período, a população *Chaco* abandonou o sítio. Hipóteses sobre o motivo do abandono sugerem questões climáticas, como a seca, sociais, religiosas ou políticas. Uma segunda ocupação ocorreu por volta do ano 1180 AD por populações que emigraram da região de Mesa Verde, localizada no estado do Colorado, EUA (Figura 9).

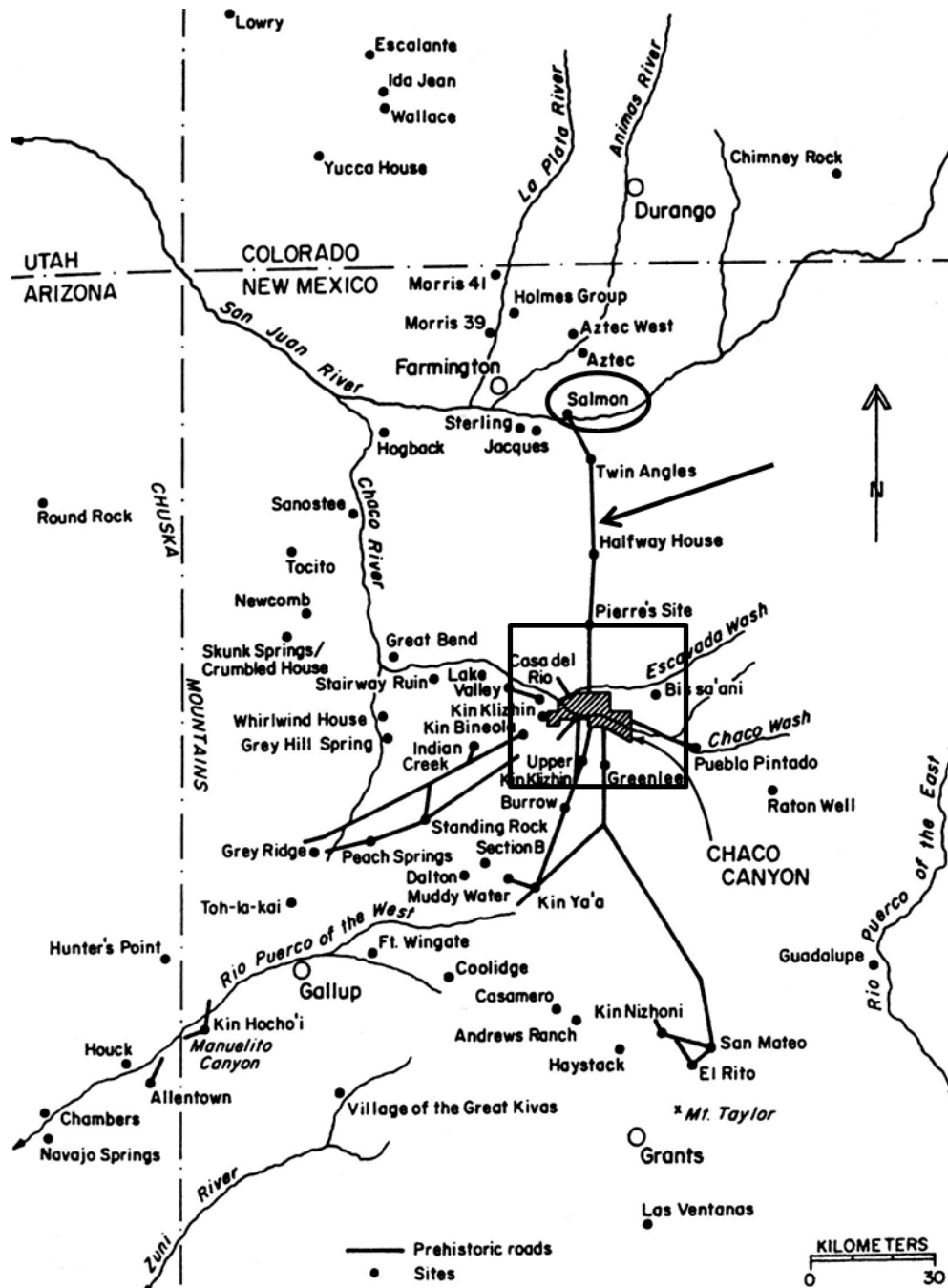


Figura 8 – Mapa das “estradas” e *Great Houses* da cultura *Chaco*. A seta indica a *Great North Road* que conecta *Chaco Canyon* a *Salmon Ruins*, indicados pelas figuras quadrada e oval, respectivamente. Outras “estradas” demonstradas no mapa conectam as demais *Great Houses* da cultura *Chaco*, indicadas pelos diversos pontos escuros, ao centro ritualístico e religioso da cultura. Fonte: DOYEL (1992a).

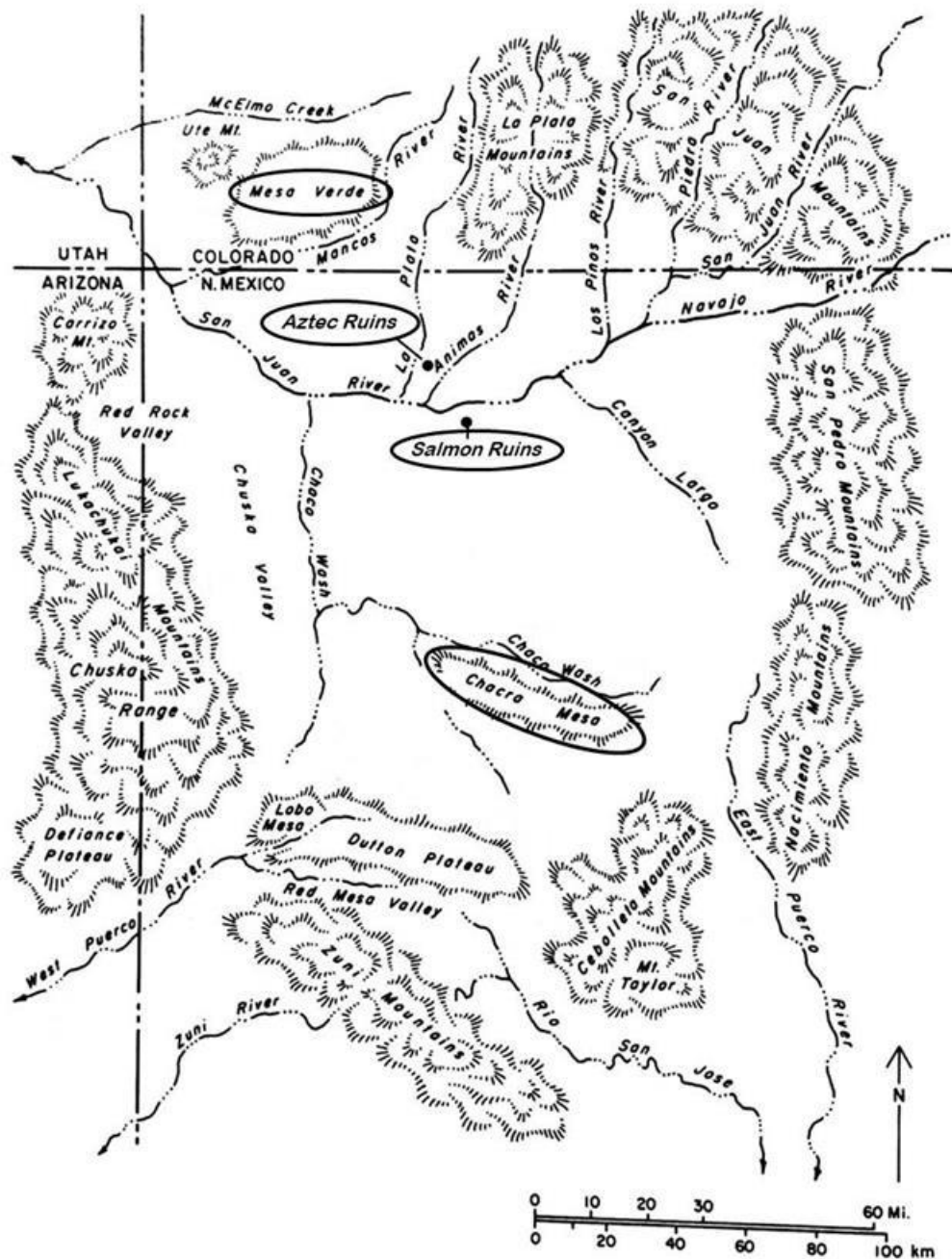


Figura 9 – Mapa da localização de Mesa Verde, *Salmon Ruins*, *Aztec Ruins* e *Chaco Canyon* indicadas pelos círculos. Fonte: VIVIAN (1990f).

O termo Mesa Verde define tanto a cultura *Pueblo* quanto o local habitado por essas populações. É caracterizada por uma região de *canyon* com vegetação densa composta por *Pinus spp.* e *Juniperus spp.*, espécies de pinheiros específicas de regiões montanhosas da região. A madeira desses pinheiros era utilizada como material de construção e para a confecção de fogueiras, não só pela população de Mesa Verde mas também pelos grupos *Pueblo* de toda a região de *San Juan Basin* (NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR, 2016b).

As populações *Pueblo* de Mesa Verde e de *Chaco Canyon* possuíam a mesma origem cultural, porém durante os períodos de ocupação *Pueblo I, II e III*, desenvolveram diferentes estilos de arquitetura e cerâmica, o que identifica e diferencia ambas as ocupações observadas em *Salmon Ruins* e em outras *Great Houses outliers*. Por volta de 1200 AD, grupos populacionais abandonaram essa região e migraram para algumas das ruínas construídas pela cultura *Chaco* (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Os sítios ocupados foram remodelados e utilizados principalmente como local ritualístico, de armazenamento de alimentos, enterramento e latrina. Construções adjacentes às *Great Houses* provavelmente foram utilizadas como habitação. A segunda ocupação de *Salmon Ruins* permaneceu por pouco tempo, abandonando o sítio por volta do ano 1250 AD (VIVIAN; HILPERT, 2012b).

Originalmente existiam três latrinas em *Salmon Ruins*, no entanto, um incêndio destruiu duas latrinas (REINHARD, 2008). Atualmente, apenas uma delas está preservada (recinto 62W). Essa latrina está datada no período da segunda ocupação (Figura 10 A e B) e se encontra próxima a um *kiva* elevado (recinto 64), construído acima do nível do solo (Figura 10 A). Acredita-se que essa latrina era utilizada por indivíduos que permaneciam dentro do *kiva* durante cerimônias religiosas. A grande quantidade de coprólitos depositada na coleção do *Salmon Ruins Museum – San Juan County Archaeological Research Center and Library*, de mais de 10000 coprólitos, sendo aproximadamente 1000 coprólitos encontrados somente em um nível estratigráfico de 1 cm (Karl Reinhard – comunicação pessoal) sugere que *Salmon Ruins* possa ter sido utilizado como um centro ritualístico, após o abandono da região de *Chaco Canyon*. O recinto 62W possui uma estrutura semelhante a um “banco” construído com pedras de arenito e adobe (Figura 10 B). Aparentemente, o depósito de fezes era realizado por indivíduos que se sentavam na estrutura de alvenaria. O padrão de deposição adotado pela população de *Salmon Ruins* indica que os habitantes desse sítio concentravam e isolavam as fezes, de maneira que não tivessem contato com o material fecal após a deposição.

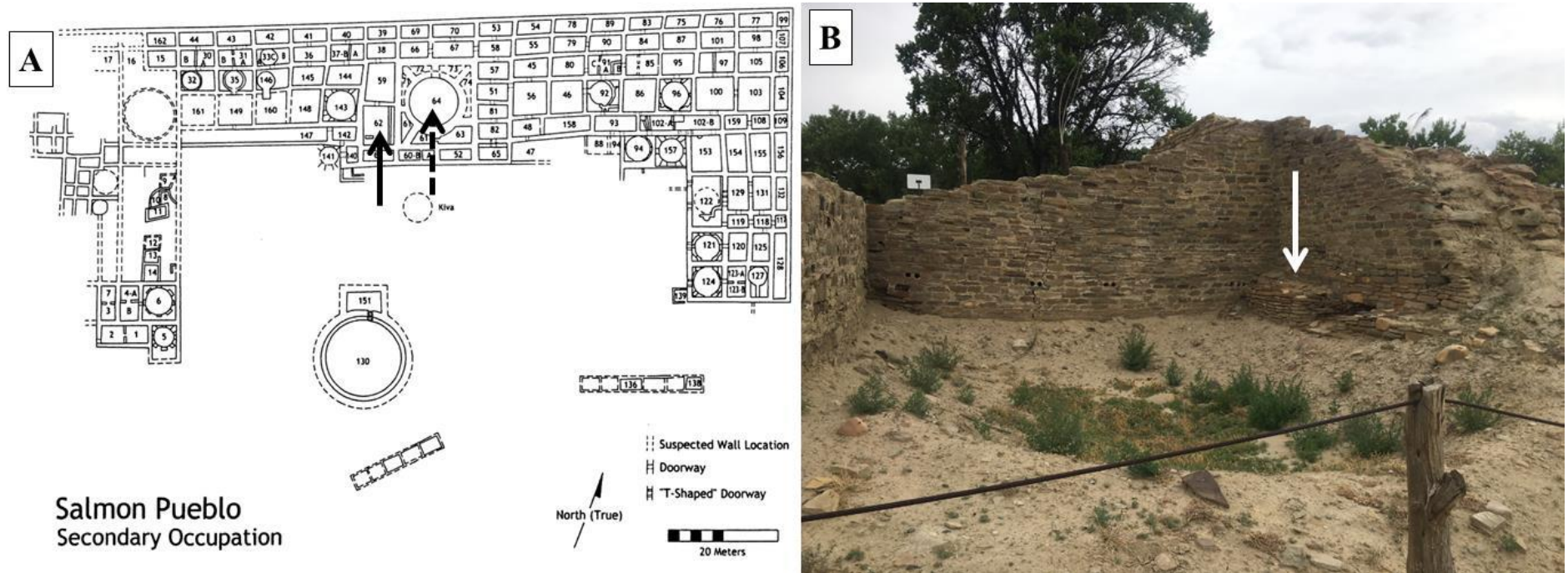


Figura 10 A e B – (A) - Planta esquemática de *Salmon Ruins* demonstrando os inúmeros recintos que eram destinados a diferentes funções de acordo com as necessidades diárias da população da segunda ocupação. A seta indica o local da única latrina preservada (recinto 62W) e a seta pontilhada indica a localização do *kiva* elevado, o que sugere uma utilização associada dos dois recintos; fonte: *San Juan County Archaeological Research Center and Library Salmon Ruins Museum*. (B) – Fotografia da única latrina remanescente, recinto 62W. A seta indica a localização do “banco” construído com pedras de arenito e adobe, provavelmente utilizado para a deposição das fezes.

Reinhard (2008) realizou análise parasitológica e da dieta de 112 coprólitos provenientes dessa latrina. Grãos de pólen recuperados nas análises dos coprólitos evidenciaram uma dieta constituída por plantas de ambiente seco, baseada no consumo de milho, além de feijão, pinhão, abóbora, erva-de-santa-maria, amaranto, cebola selvagem, *Yucca*, juniper e beldroega (REINHARD, 2008).

Foram encontrados somente ovos de *E. vermicularis*, em 9 das 112 amostras analisadas, o que representa uma frequência de infecção de 8% (REINHARD, 2008), uma das mais baixas para populações ancestrais de *Pueblo* (REINHARD, 2008). Hugot e colaboradores (1999) sugeriram que a frequência de infecção por *E. vermicularis* estava associada ao estilo de habitação adotado pelas populações de *Pueblo*, sendo as *Great Houses* os locais de maior frequência de infecção nessa cultura (HUGOT et al., 1999).

Fatores tafonômicos que influenciaram na degradação dos ovos de *E. vermicularis*, bem como os bons hábitos de higiene adotados por essa população são sugeridos como prováveis causas da baixa frequência de infecção observada nesse sítio (REINHARD, 2008). Bohrer e Doebly (1980) sugerem que essa população provavelmente fazia uso de “sabão” produzido com raiz pulverizada de *Yucca*, contribuindo para os bons hábitos de higiene que teriam dificultado a transmissão do parasito (BOHRER; DOEBLY, 2006). Reinhard (2008) também sugere que a construção do sítio a céu aberto facilitaria a circulação do ar por entre os recintos, o que contribuiria para a diminuição da quantidade de ovos de *E. vermicularis* no ambiente e, conseqüentemente, refletiria na baixa frequência de infecção, relacionada por Hugot e colaboradores (1999) principalmente à inalação dos ovos em ambientes fechados.

3.1.2 *Aztec Ruins*, *Aztec*, Novo México, EUA

Aztec Ruins outlier representa o maior complexo desse tipo, onde a *Great House Aztec West Ruin* é a principal construção (Figura 11) (NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR, 2016a). Esse sítio está localizado próximo ao rio *Animas*, na cidade de *Aztec*, no Novo México, EUA, dista aproximadamente 88 km de *Chaco Canyon* e se conecta ao centro religioso por um segmento da *Great North Road* (Figura 9) (NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR, 2016a). Assim como *Salmon Ruins*, *Aztec Ruins* foi construído por populações *Pueblo* da cultura *Chaco*, entre os anos 1110 AD e 1120 AD (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Durante a ocupação *Chaco*, *Aztec Ruins* provavelmente foi utilizada como um local para atividades ritualísticas para as populações vindas de *Chaco Canyon*. Alguns arqueólogos acreditam que *Aztec Ruins* pode ter

se tornado o centro dessa cultura, após o abandono de *Chaco Canyon* (VIVIAN; HILPERT, 2012b). O sítio foi escavado pelo arqueólogo Earl H. Morris (1916-1934) que desempenhou importante papel na recuperação e manutenção do sítio, principalmente com a reconstrução do *Great Kiva* de *Aztec West Ruins* que representa um dos maiores construídos pela cultura *Chaco* nessa região (Figura 11) (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Durante essas escavações foi constatada a preservação da “cobertura” de alguns dos recintos, que ainda permanecem intactas mesmo após mais de 800 anos (Figura 12) (VIVIAN; HILPERT, 2012b).

A construção de *Aztec West Ruin* foi finalizada por volta do ano 1115 AD. A *Great House* possuía maiores dimensões do que as de *Salmon Ruins*, com três níveis de construção, 500 recintos e 12 *kivas*. Era utilizada como centro administrativo e religioso da região (NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR, 2016a). A população utilizava a planície de inundação próxima ao rio *Animas* para cultivar milho, abóbora e feijão (NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR, 2016a). Assim como *Salmon Ruins*, *Aztec Ruins* foi abandonada pela população *Chaco*, por volta do ano 1190 AD e reocupada pouco tempo depois por uma população proveniente da região de Mesa Verde. A segunda ocupação é evidenciada pela grande quantidade de enterramentos e cerâmicas encontradas nos recintos (SCHILLACI; STOJANOWSKI, 2002). Ao ocupar *Aztec West Ruin*, a população de *Mesa Verde* não a utilizou como local de habitação, mas sim para o armazenamento de recursos, cerimonial, local de enterramento e latrina (SCHILLACI; STOJANOWSKI, 2002). A segunda ocupação abandonou o sítio por volta do ano 1275 AD provavelmente devido à ocorrência de um período de seca prolongado. No entanto, o real motivo do abandono, tanto pela primeira quanto pela segunda ocupação é desconhecido. Existem, até o momento, duas latrinas identificadas em *Aztec West Ruin* (recintos 219 e 225) (Figura 13) cujos coprólitos, até o presente estudo, não haviam sido analisados.



Figura 11 – Vista aérea de *Aztec West Ruin*, *Aztec Ruins*, *Aztec*, Novo México, EUA. A seta indica o *Great Kiva* reconstruído durante as escavações de Earl H. Morris (1916-1934) (VIVIAN; HILPERT, 2012b). Fonte: NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR (2016).



Figura 12 – Fotografia da cobertura original de um dos recintos de *Aztec West Ruin*. Foto: Karl Reinhard.

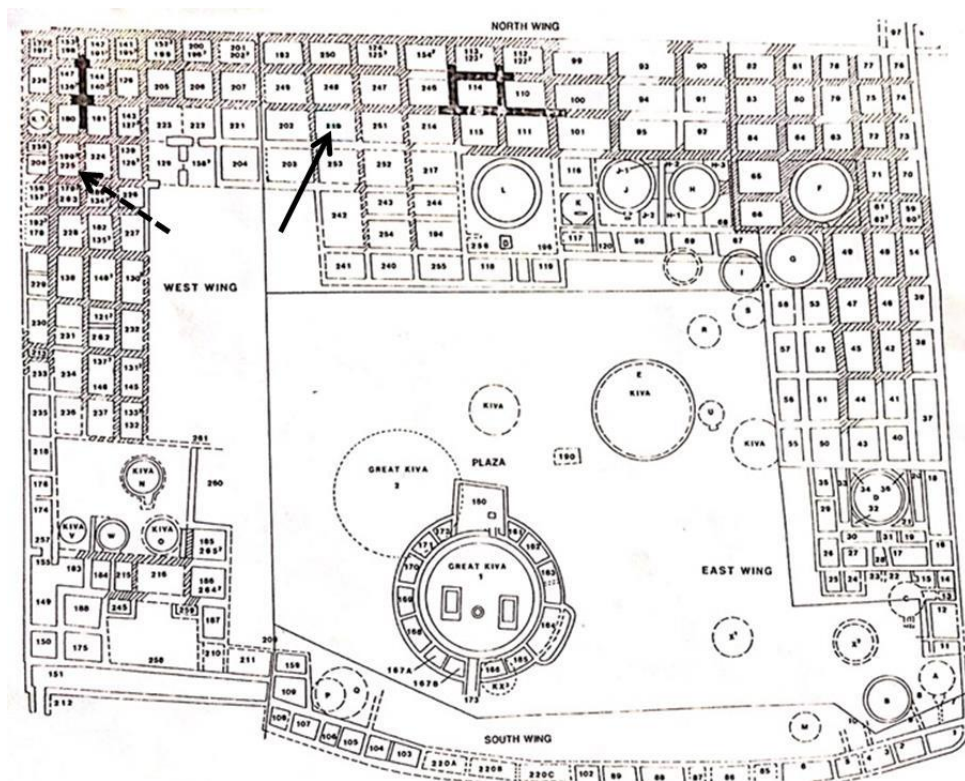


Figura 13 – Planta esquemática de *Aztec West Ruin*. As setas indicam as latrinas preservadas nesse sítio. A seta inteira indica o recinto 219 e a seta pontilhada indica o recinto 225. Fonte: NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR (2016a).

3.1.3 *Turkey Pen Cave, Grand Gulch, Utah, EUA*

Turkey Pen Cave é um sítio *Pueblo* datado do período *Basketmaker II* (100 AD – 400 AD), o mais antigo dessa cultura. Está localizado na região de *Cedar Mesa, Grand Gulch, Utah* (Figura 14) e é caracterizado por um abrigo sob-rocha (MATSON; CHISHOLM, 2007). Nesse período de ocupação, um grupo de poucos indivíduos provavelmente ocupou esse sítio e utilizou *pithouse* como habitação, principalmente no inverno. Não há estudos que caracterizem a cultura dos *Pueblo* que habitavam esse sítio, sendo consideradas informações gerais a respeito do período de ocupação *Basketmaker II*, descritos no item “*Pueblo*” desta tese.

Coprólitos humanos foram coletados e analisados para parasitos e macroresíduos da dieta, principalmente com o intuito de identificar uma possível prática de cultivo de milho e dependência de consumo por parte desse grupo (AASEN, 1984; MATSON; CHISHOLM, 1991; REINHARD, 1985; REINHARD; ARAÚJO; MORROW, 2016). Somente ovos de *E. vermicularis* foram recuperados em sete de 24 amostras analisadas, representando 29% de frequência de infecção, uma das mais elevadas na cultura *Pueblo*, o que contradiz a hipótese de Hugot e colaboradores (1999) que aponta esse tipo de ocupação como uma das menores frequências da cultura *Pueblo* (REINHARD; ARAÚJO; MORROW, 2016). Reinhard e colaboradores (2016) atribuem a elevada frequência observada ao estilo de habitação caracterizado por *pithouses*, que favorece a transmissão veiculada pelo ar. Aasen (1984) analisou 28 coprólitos e constatou a presença de vestígios de milho em 25 dessas amostras, além de pinhão, erva-de-santa-maria, amaranto, gramíneas, sementes de abóbora e cactáceas. Esse diagnóstico foi corroborado pelos achados de Reinhard (1985) e representa um padrão de dieta semelhante ao observado em ocupações do período *Pueblo III*, como em *Salmon Ruins*.

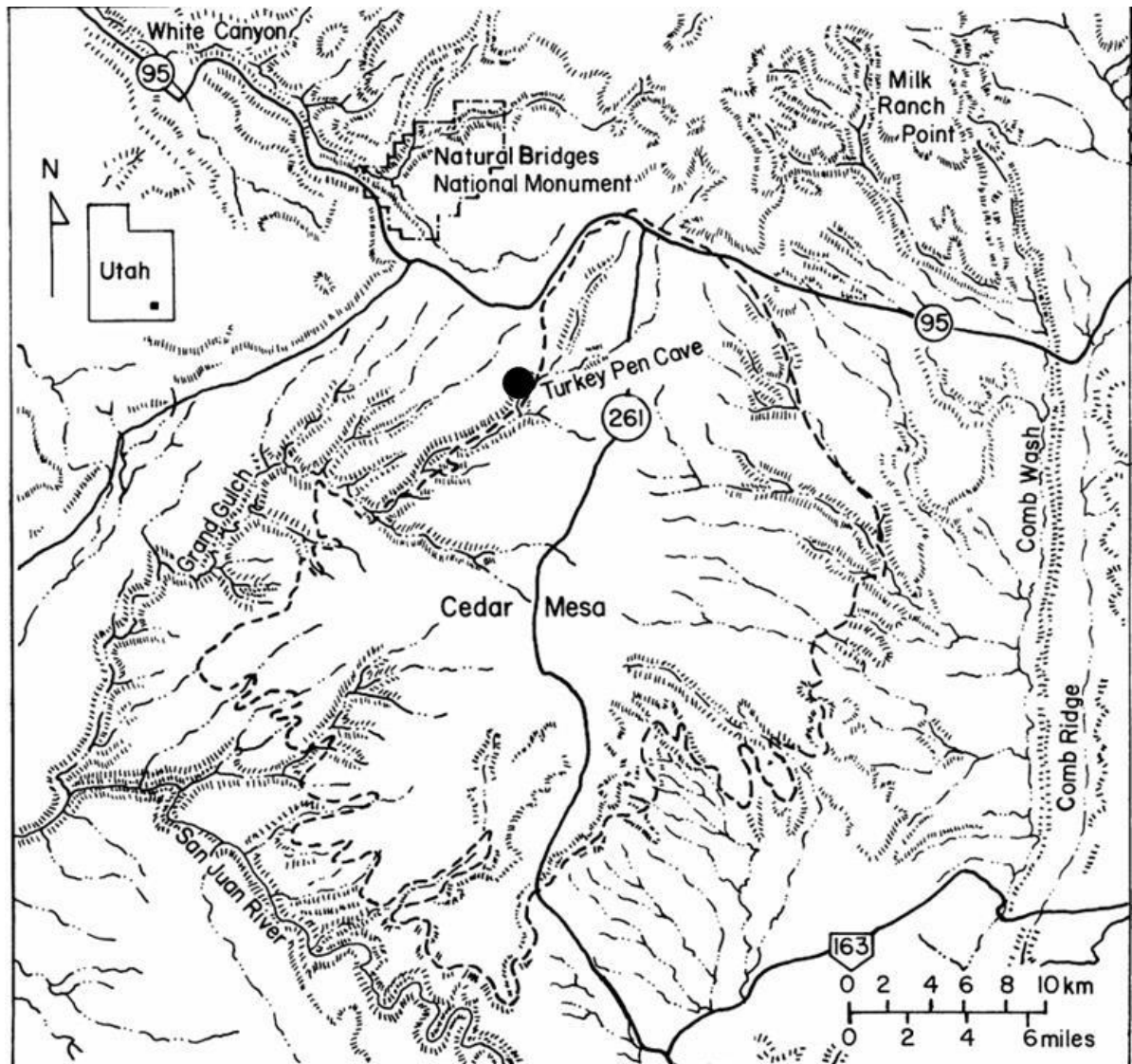


Figura 14 – Mapa da região de *Grand Gulch*, Utah. O ponto no centro do mapa indica a localização de *Turkey Pen Cave*. Fonte: MATSON e CHISHOLM (1991).

4 METODOLOGIA DE ANÁLISE QUANTITATIVA APLICADA EM ESTUDOS ANTERIORES

Em todas as análises quantitativas realizadas em coprólitos dos sítios *Pueblo* foi aplicada técnica de quantificação baseada na introdução de tabletes de *Lycopodium*, o que possibilitou verificar a representatividade dos resíduos da dieta e também a quantidade de opg (REINHARD, 1985, 1992a, 2008; REINHARD; ARAÚJO; MORROW, 2016; REINHARD et al., 2012). Essa metodologia é amplamente utilizada para determinar a frequência de grãos de pólen em amostras ambientais antigas e recentes, além de coprólitos (PEARSALL, 2016) e, foi adaptada por Reinhard e colaboradores (1986) para análise quantitativa de parasitos em coprólitos e latrinas (REINHARD et al., 1986).

Nesse método, a determinação de opg se baseia no volume ou peso do coprólito analisado e na introdução de quantidade conhecida de esporos de plantas exóticas, cujo diagnóstico seja improvável na amostra analisada (PEARSALL, 2016). Na maioria dos estudos são utilizados esporos de *Lycopodium*, no entanto a depender de onde as amostras são provenientes, podem ser utilizados esporos de *Nyssa*, *Ailanthus* e *Eucalyptus* (PEARSALL, 2016). A quantidade total de esporos introduzidos não necessita ser quantificada, pois a concentração de ovos é calculada em relação à quantidade de esporos quantificados (PEARSALL, 2016). Após a quantificação, aplica-se a fórmula $OPG = ((L_a/O_a) \times L_t)/G$ (PEARSALL, 2016), onde:

L_a = Número de esporos de *Lycopodium* quantificados

O_a = Número de ovos de cada parasito encontrado

L_t = Número total de esporos de *Lycopodium* introduzidos na amostra

G = Quantidade total de amostra processada

Durante a análise microscópica das amostras são quantificados os elementos de interesse e uma quantidade mínima pré-determinada de esporos de *Lycopodium* (REINHARD, 1985; REINHARD et al., 1986, 2008). Nos estudos realizados em coprólitos da cultura *Pueblo*, foi estabelecida a quantificação mínima de 25 esporos de *Lycopodium*. Após atingir esse valor, a contagem de ovos de parasito era interrompida, e amostras onde ovos não foram observados eram consideradas negativas. Ao final estabeleceu-se a frequência de infecção

para cada sítio e a quantidade de opg para cada amostra (REINHARD, 1985, 1992a, 2008; REINHARD; ARAÚJO; MORROW, 2016; REINHARD et al., 2012).

Morrow (2016) utilizou metodologia semelhante para analisar quantitativamente amostras de coprólitos do sítio *La Cueva de Los Muertos Chiquitos* (CMC), localizado em *El Zape, Durango*, México. Durante essas análises, Morrow (2016) testou diferentes valores mínimos de 25, 50, 100, 200 e 500 esporos de *Lycopodium*, a fim de saber qual ou quais valores seriam ideais para determinar (em) a real frequência de infecção dos sítios arqueológicos estudados. Após as análises verificou que os valores mínimos de 25, 50 e 100 esporos determinavam frequências de infecção diferentes entre si e abaixo das observadas ao quantificar o mínimo de 200 e 500 esporos de *Lycopodium*. Nas quantificações de 25, 50 e 100 esporos, amostras que eram positivas resultavam negativas, devido à interrupção das análises antes que o diagnóstico positivo pudesse ser realizado. Nas quantificações de 200 e 500 esporos Morrow (2016) observou que o número de amostras positivas era igual e que provavelmente a frequência observada nessas análises deveria representar a realidade da infecção estudada. Diante desses resultados, Morrow (2016) selecionou a quantidade mínima de 200 esporos de *Lycopodium* como sendo o padrão para a aplicação da técnica de quantificação, estimativa de opg e cálculo de frequência de infecção (MORROW, 2016).

Considerando o estudo de Morrow (2016) é possível que as frequências de infecção observadas nos sítios da cultura *Pueblo*, *Turkey Pen Cave* (29%), *Salmon Ruins* (8%), *Antelope Cave* (18%), *Antelope House* (25%), *Pueblo Bonito* (21%), *Mesa Verde* (7%) e *Inscription House* (19%) estejam subestimadas. A hipótese relacionada ao cenário epidemiológico da infecção por *E. vermicularis*, sugerida por Hugot e colaboradores (1999) seria refutada. A hipótese universal do presente estudo é de que existe um método ótimo para detectar ovos de *E. vermicularis* em amostras antigas. Sendo assim, objetivamos aplicar a metodologia quantitativa recomendada por Morrow (2016) em coprólitos dos sítios *Turkey Pen Cave*, *Salmon Ruins* e *Aztec Ruins*, a fim de comparar com dados de frequências estimados em estudos anteriores.

5 TAFONOMIA

Tafonomia foi definida por Efremov (1940) como o conjunto de transformações e processos que atuam na transição de restos orgânicos, da biosfera para a litosfera (EFREMOV, 1940). O significado de tafonomia vem das palavras gregas *taphos* e *nomos* que significam “enterramento” e “leis”, respectivamente (LYMAN, 2010). Consideram-se os processos que ocorrem desde o momento da morte até o encontro dos restos orgânicos, anos ou até séculos mais tarde (LYMAN, 2010).

No estudo da tafonomia são considerados fatores macro e microambientais que influenciam, dentro de um contexto geral e específico, nas diferentes fases de decomposição sofridas por um corpo (SORG; HAGLUND, 2002). Fazem parte dos fatores macroambientais, elementos pertencentes à atmosfera, litosfera e biosfera. Os fatores da atmosfera são relacionados ao clima, temperatura, precipitação e oxigenação; os da litosfera envolvem processos geológicos, como por exemplo, movimentações que também podem contribuir para a elevação do nível do mar; e a biosfera envolve fatores inerentes à fauna e à flora, que contribuem para a conformação da paisagem e introduzem o fator orgânico ao macroambiente. Esses fatores interagem continuamente e interferem nos processos tafonômicos de maneira cíclica, antes da deposição do corpo, durante sua permanência e após sua localização e retirada do local (SORG; HAGLUND, 2002). Tanto da perspectiva ecológica quanto da tafonômica, o corpo é considerado um microambiente que fornece alimento a organismos presentes naquele contexto ambiental. Modificações na estrutura química e na temperatura do microambiente, causadas pela atuação desses organismos acabam por facilitar ou iniciar processos de degradação (HAGLUND; SORG, 2002; SORG; HAGLUND, 2002).

Na arqueologia, o conceito e a denominação de tafonomia são aplicados para melhor compreender as modificações sofridas pelo corpo após a deposição no ambiente (LYMAN, 2010). A tafonomia é aplicada dentro do conceito paleobiológico no que diz respeito à comparação das situações de vida e morte do organismo, e à reconstrução desses momentos. Possibilita a identificação das modificações visualizadas durante a recuperação do resto orgânico, mesmo após séculos, e a elaboração de respostas a questões que dizem respeito à causa das modificações observadas (LYMAN, 2010).

Na Paleoparasitologia, o conceito e denominação de tafonomia são aplicados na tentativa de compreender o porquê de algumas estruturas parasitárias se preservarem ou não, a

dependem do ambiente (RÁCZ et al., 2015). Reinhard e colaboradores (1986) foram os primeiros a discutir sobre condições de preservação ideais e também sobre alguns fatores que poderiam atuar na degradação de vestígios de parasito. De acordo com esses autores, ambientes úmidos sem a disponibilidade de oxigênio e ambientes áridos são locais que proporcionam melhores condições de preservação de ovos de parasitos (REINHARD et al., 1986). No entanto, grande parte dos estudos paleoparasitológicos ocorre em materiais preservados em ambientes que não proporcionaram esse tipo de preservação, o que provavelmente tem interferido no diagnóstico e na representatividade dos achados parasitológicos publicados até o momento (FERREIRA, 2011).

Alguns fatores foram relacionados como prováveis interferentes na preservação de vestígios parasitológicos, no entanto, estudos experimentais em paleoparasitologia são pouco frequentes e a discussão permanece na suposição da relação entre determinado fator e a negatividade de amostras antigas em análises parasitológicas. Reinhard e colaboradores (1986) investigaram importante questão relacionada à possível interferência da modificação na consistência dos coprólitos após a aplicação de métodos de processamento e análise de amostras antigas, na morfometria dos ovos, o que poderia tornar o diagnóstico impreciso (REINHARD et al., 1986). Para realizar análises parasitológicas em material antigo é necessário reidratar as amostras, ou seja, fazê-las retornar à consistência semelhante à original, de modo a possibilitar a aplicação de técnicas parasitológicas (CALLEN; CAMERON, 1960a). Como mencionado, o método amplamente utilizado para a reidratação consiste na imersão da amostra em solução aquosa de fosfato trissódico a 0,5% (Na_3PO_4) (CALLEN; CAMERON, 1960a). No estudo, Reinhard e colaboradores (1986) constataram que pequenas modificações como a diminuição do tamanho dos ovos e “rugas” nas cascas dos ovos podem ocorrer, porém essas características não impedem o diagnóstico parasitológico preciso (REINHARD et al., 1986).

Também foi avaliada a interferência de pH alcalino e ácido na preservação dos ovos de parasitos. Reinhard e colaboradores (1986) sugerem que o pH possui pouco efeito na preservação desses vestígios, no entanto, estudos publicados por Shin e colaboradores (2009) e Searcey e colaboradores (2013) sugerem que o pH alcalino seria considerado o ideal para a preservação do embrião/larva de ovos de parasitos (SEARCEY et al., 2013; SHIN et al., 2009). A não preservação do embrião/larva impediria a aplicação de técnicas de biologia molecular que, nesse caso, seriam ineficazes na recuperação de vestígios de DNA do parasito, visto a ausência de material genético.

Com relação a fatores bióticos, a maioria dos estudos cita a interferência de fungos coprofágicos na preservação dos vestígios parasitários. Reinhard e colaboradores (1986) observaram o crescimento de micélio (filamentos apresentados pela maioria das espécies de fungos e compostos de hifas agrupadas ou emaranhadas) sobre a superfície da casca de ovos de *Trichuris* sp. e sugeriram que os fungos coprofágicos poderiam atuar na decomposição dos ovos de parasitos e interferir na recuperação de ovos em material antigo. Estudos experimentais realizados nas últimas décadas indicaram que algumas espécies de fungos podem comprometer a preservação de ovos de parasitos por meio do crescimento e da penetração do micélio no interior dos ovos, ocasionando alterações nos embriões e na casca (ARAÚJO et al., 2008b; HOFSTÄTTER et al., 2017; SILVA et al., 2010).

Outros estudos em material antigo discutem a interferência de fungos coprofágicos na preservação de vestígios parasitológicos possivelmente resultando em interpretações errôneas a respeito da representatividade e da distribuição de parasitos no passado. Leles e colaboradores (2010) discutem a raridade de achados de ovos de *Ascaris lumbricoides* na América pré-colombiana, considerando a distribuição geográfica e epidemiologia da infecção por esse parasito em populações atuais. *Ascaris lumbricoides* possui distribuição cosmopolita e é o parasito mais frequente na população atual (REY, 2008d). No entanto, na América pré-histórica é raramente diagnosticado, o que leva a questões sobre a diferença entre esses cenários epidemiológicos (LELES et al., 2010). Uma das principais suposições de Leles e colaboradores (2010) é a possível degradação dos vestígios parasitológicos por fungos coprofágicos, visto que o encontro de esporos de fungos em amostras das Américas é frequente.

Camacho e colaboradores (2013) também sugeriram que fungos coprofágicos provavelmente seriam responsáveis pela degradação e conseqüente raridade de achados de ovos de parasitos em sambaquis. Poucos vestígios de parasitos foram encontrados e quase todos os ovos recuperados estavam mal preservados, a ponto de interferir no diagnóstico parasitológico (CAMACHO et al., 2013). Esporos semelhantes aos de fungos coprofágicos foram observados durante análises de sedimentos provenientes de sambaquis, o que sugeriu esses agentes como prováveis interferentes na preservação dos vestígios parasitológicos nesses sítios.

Apesar dos avanços nas discussões acerca dos fatores tafonômicos que poderiam interferir ou proporcionar a preservação de vestígios de parasitos, ainda há muito a se fazer,

especialmente relacionado à questão experimental. Quais os fatores e o quanto interferem na preservação de parasitos em material arqueológico? A questão climática provavelmente está envolvida na presença desses fatores em cada ambiente e, por isso, cada caso deve ser avaliado isoladamente em estudos futuros. Pensando nisso, Morrow e colaboradores (2016) idealizaram uma classificação tafonômica para auxiliar na categorização desses fatores. Essa classificação pode ser aplicada de acordo com o sítio arqueológico/ambiente no qual as amostras foram recuperadas e serve de guia para direcionar pesquisadores da área para fatores individuais que podem ter interferido ou possibilitado a preservação dos vestígios parasitológicos (MORROW et al., 2016). Os autores propuseram cinco principais categorias que podem ser divididas em subcategorias, de acordo com o cenário tafonômico observado pelo paleoparasitologista. As categorias são: abiótica, contextual, antropogênica, orgânica e ecológica (MORROW et al., 2016).

A categoria abiótica envolve fatores não-orgânicos, como temperatura ambiente, condições do solo e químicas; a contextual é relacionada ao contexto no qual a evidência parasitológica foi recuperada (coprólitos, região intestinal de múmias, sedimentos de latrinas, entre outros); a antropogênica se refere à interferência humana e à manipulação das fontes de análise paleoparasitológicas desde o momento da deposição até a coleta, transporte ao laboratório e curadoria do material em coleções; a orgânica envolve fatores inerentes à biologia do parasito, como o ciclo de vida, características de deposição dos ovos, resistência dos ovos, entre outros; e a ecológica se baseia na interação da evidencia parasitológica com a comunidade biológica do ambiente. Consideraremos essas categorias na discussão desenvolvida neste trabalho.

O presente estudo lida com sítios da cultura *Pueblo* que exibem, em geral, uma preservação excelente de coprólitos e conseqüentemente de ovos de parasitos (REINHARD, 2008). Nesse caso, algumas categorias idealizadas por Morrow e colaboradores (2016) não se aplicam, quando se consideram fatores que poderiam atuar na degradação dos vestígios de parasitos nesses sítios. As categorias abiótica e contextual não se aplicam nesse sentido, pois o clima árido oferece condição ideal para a preservação do material fecal (BRYANT; REINHARD, 2012). Além dessas, a categoria antropogênica também não se aplica, pois na grande maioria dos sítios, o material fecal era depositado em latrinas que permaneciam isoladas do contato com as populações que estavam presentes nos sítios, eliminando a interferência desses indivíduos na preservação dos coprólitos. Na coleta de amostras para análise paleoparasitológica sempre se utiliza equipamento de proteção individual (jalecos,

luvas, sapatilhas, toucas) trocados a cada coleta amostral. As amostras são acondicionadas e transportadas ao laboratório em sacos com fecho hermético ou tubos plásticos com tampas de rosca cobertos com papel alumínio, restringindo o contato das amostras com o pesquisador, pelo menos até o momento do processamento (ARAÚJO; REINHARD; FERREIRA, 2015). Por esses motivos, a categoria antropogênica também não pode ser considerada para avaliar fatores que interferem na degradação de ovos de parasitos.

Dentro do contexto dos sítios *Pueblo* as categorias orgânica e ecológica se aplicam à discussão de fatores que possivelmente atuaram na degradação de ovos de parasitos. A categoria orgânica sempre deve ser considerada nesse sentido, principalmente no que se refere à resistência do ovo, pois cada tipo de ovo exibe particularidades que permitem ou não uma sobrevivência maior no ambiente (MORROW et al., 2016). A categoria ecológica envolve o fator que será avaliado nessa tese: a interferência de ácaros na preservação de ovos de parasitos em sítios da cultura *Pueblo*. Ao contrário do observado em estudos discutidos acima, esporos de fungos não são comuns nestas amostras, provavelmente devido ao clima árido da região, portanto a interferência desses agentes não pode ser avaliada nesse contexto. Durante análises parasitológicas e da dieta de coprólitos provenientes do sítio *Antelope Cave* pertencente à da cultura *Pueblo*, Reinhard e colaboradores (2012) constataram a presença de alguns ácaros (REINHARD et al., 2012). Além disso, também foi constatada a presença corriqueira de ácaros em quantidades variáveis em amostras de coprólitos de outros sítios *Pueblo* (Karl Reinhard – Comunicação Pessoal).

Geralmente, a preservação de ovos de parasitos em sítios dessa cultura é excelente, porém em alguns casos, como em *Salmon Ruins*, foi constatada a má preservação de ovos de *E. vermicularis* encontrados em coprólitos desse sítio. Alguns ovos estavam rompidos ou fragmentados (Karl Reinhard – Comunicação Pessoal). Poderiam os ácaros terem predado os ovos de *E. vermicularis* em coprólitos desse sítio? A baixa frequência de infecção por esse parasito observada em *Salmon Ruins* talvez seja decorrente da interferência desse fator.

Na literatura, ácaros já foram correlacionados à predação de larvas de nematódeos, mas não à de ovos de parasitos. Muraoka e Ishibashi (1976), Rockett (1980), Santos e colaboradores (1981), Godoy e colaboradores (1983), Walter e Freckman (1986) e Epsky e colaboradores (1988) realizaram estudos experimentais para constatar a predação de nematódeos de vida-livre por espécies de ácaros que estão presente, em sua maioria, no solo. Os autores verificaram que a predação ocorre em todas as espécies, porém em diferentes

níveis de dependência (EPSKY; WALTER; CAPINERA, 1988; GODOY et al., 1983; MURAOKA; ISHIBASHI, 1976; ROCKETT, 1980; SANTOS; PHILLIPS; WHITFORD, 1981; WALTER; HUDGENS; FRECKMAN, 1986).

A constatação da predação de nematódeos de vida-livre por ácaros pode sugerir que também haja a predação de ovos de nematódeos, no entanto essa correlação ainda não foi comprovada. Talvez difira do que foi observado nesses estudos, visto que ovos de parasitos são resistentes. Nematódeos são os organismos mais comumente encontrados em todos os tipos de habitat, exceto o aéreo e o pelágico (REY, 2008e). Tendo a ampla disponibilidade desses organismos no ambiente, não se sabe se ovos de parasitos seriam atrativos para a predação por esses artrópodes. Dentro dessa perspectiva, trabalhamos com a hipótese de que ácaros estão correlacionados à degradação de ovos de *E. vermicularis* em sítios da cultura *Pueblo*.

6 JUSTIFICATIVA

A partir da década de 1980 ocorreu o início da modificação do pensamento paleoparasitológico. A paleoparasitologia foi idealizada para responder a questões sobre que parasitos acometiam as populações humanas desde o início da evolução da espécie, quais eram herdados ou adquiridos e sobre a origem da relação parasito-hospedeiro. A Paleoparasitologia sugeriu teorias sobre rotas migratórias, contatos entre populações e também entre populações humanas e de outros animais. No entanto, surgiram outras questões, principalmente no que se refere ao impacto das infecções por parasitos nas vidas das populações antigas e como o modo de vida proporcionava a ocorrência e manutenção das infecções nessas populações. Com o intuito de responder a essas questões, a Paleoparasitologia lançou mão do uso da patoecologia para estudar e identificar que fatores ambientais e culturais favoreciam o surgimento de determinadas infecções em populações e áreas distintas. A aplicação do conceito patoecológico independe da representatividade quantitativa de determinado vestígio de parasito, sendo necessária para a aplicação apenas a constatação da presença do parasito em amostras antigas. No entanto, a paleoparasitologia se encaminha para responder também a questões epidemiológicas, principalmente no que se refere à possível manifestação de sintomas e demais desdobramentos decorrentes de infecções parasitárias distintas. Nesse sentido, sítios que apresentam condições ideais de preservação auxiliam nessa interpretação, pois possibilitam a aplicação de técnicas quantitativas que indiquem a frequência e intensidade de infecção em determinadas populações. Esses dados permitem conhecer uma estimativa do real impacto das infecções nas vidas das populações e auxiliam no melhor entendimento dos cenários epidemiológicos de emergência e reemergência de infecções. São poucos os sítios que apresentam essa condição favorável de preservação que, quando é evidenciada, deve ser considerada como uma oportunidade de ampliar as discussões acerca das infecções parasitárias populações em populações antigas. Os sítios da cultura *Pueblo* estão entre os que possibilitam a aplicação dessa abordagem.

Enterobius vermicularis é o parasito mais frequente em sítios *Pueblo*. A interpretação das frequências encontradas é baseada na complexidade das habitações utilizadas por essas populações ao longo do tempo. Como mencionado, de acordo com essa hipótese, populações que habitavam abrigos-sob-rocha teriam as menores frequências, enquanto que as que habitavam *Great Houses* associadas a abrigos-sob-rocha teriam as maiores frequências. Entretanto, ao observar as frequências de infecção por esse parasito em sítios como *Turkey Pen Cave* (29%), de habitação mais simples, e *Salmon Ruins* (8%) caracterizada por uma

Great House, essa hipótese não se sustenta. Isto sugere que há a necessidade de investigar a patoecologia da infecção por *E. vermicularis* de modo a esclarecer aspectos da dinâmica de infecção nessas populações. O estudo em *Aztec Ruins* complementarará o dado parasitológico relacionado à cultura *Pueblo* e também proporcionará oportunidade de verificar o padrão de infecção em duas latrinas do mesmo sítio.

Análises parasitológicas realizadas em estudos anteriores em sítios arqueológicos dessa cultura evidenciaram, em sua maioria, excelente preservação de ovos de *E. vermicularis*. No entanto, em alguns sítios como *Salmon Ruins*, a preservação dos ovos estava comprometida, provavelmente ocasionando a baixa frequência de infecção quando comparada a outros sítios de mesmo padrão habitacional. A constatação da degradação desses ovos em diferentes sítios justifica a aplicação de método de diagnóstico otimizado. Além disso, a presença de ácaros constatada em quantidades variáveis nos sítios *Pueblo* também oferece a oportunidade de investigar, pela primeira vez, a possível correlação com a degradação de ovos de *E. vermicularis*. A constatação dessa correlação poderá significar a provável atuação do ácaro como fator tafonômico, hipótese ainda não comprovada em estudos científicos.

A tese está apresentada em formato de coletânea, contendo 3 artigos científicos: Artigo 1 - *Recovering Parasites from Mummies and Coprolites: An Epidemiological Approach* - Aceito para publicação na revista *Parasites and Vectors*; Artigo 2 - *Considerations on pinworm pathoecology in three Ancestral Pueblo sites and possible correlation with modern epidemiological studies* - submetido às Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; e Artigo 3 - *Taphonomic considerations on pinworm prevalence in three Ancestral Puebloan latrines* - submetido ao *Journal of Archaeological Science Reports*.

7 METODOLOGIA

7.1 AMOSTRAS

No total foram analisadas amostras dos sítios *Turkey Pen Cave* (n=13), *Salmon Ruins* (n=67) e *Aztec Ruins*, latrinas 219 (n=21) e 225 (n=22), totalizando 123 amostras. Os coprólitos do sítio *Turkey Pen Cave* estavam processados e armazenados na coleção de amostras arqueológicas do *Palynology Laboratory, School of Natural Resources, University of Nebraska, Lincoln* - UNL. Os coprólitos provenientes dos sítios *Salmon Ruins* e *Aztec Ruins* estavam armazenados em caixas identificadas de acordo com a profundidade/estrato do perfil arqueológico escavado e curados na coleção de materiais e artefatos dos serviços de administração e conservação dos sítios arqueológicos.

A coleta foi realizada com a utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs), como, jalecos, luvas, máscaras, bem como materiais descartáveis, para evitar a contaminação das amostras. Os coprólitos foram selecionados para o estudo de acordo com três critérios: localização no estrato arqueológico, morfologia (fezes bem formadas/diarreicas) e coloração. O critério de localização no estrato arqueológico auxilia no estudo populacional. Amostras coletadas de diferentes estratos representam indivíduos e tempos de deposição diferentes aumentando as chances de retratar a população do sítio. O formato dos coprólitos, fezes bem formadas ou diarreicas, auxilia na determinação de eventos provavelmente ligados a infecções nas populações antigas. A coloração das fezes auxilia na diferenciação entre os coprólitos humanos e os de outros animais (HORNE, 1985). Ao serem coletadas, as amostras foram armazenadas em sacos plásticos com fecho hermético e transportadas ao laboratório em temperatura ambiente, de acordo com o armazenamento fornecido às amostras na coleção.

7.1.1 Processamento

A metodologia de processamento e análise consistiu na pesagem da amostra seca e seleção de 1 g a 5 g de amostra para processamento, de acordo com a quantidade de coprólito coletado. A quantidade em gramas foi registrada e as amostras foram transferidas para tubos plásticos de 50 ml com tampas de rosca. As amostras foram reidratadas durante 24 horas em solução aquosa de fosfato trissódico a 0,5% (Na_3PO_4), com ou sem adição de algumas gotas de ácido clorídrico a 40% (HCL), de acordo com a consistência da amostra (CALLEN; CAMERON, 1960b; REINHARD et al., 2008). Em amostras desidratadas foi utilizada apenas a solução de fosfato trissódico a 0,5%, enquanto que em amostras parcialmente mineralizadas

foram utilizadas as soluções de Na_3PO_4 a 0,5% e HCL a 40%, a fim de possibilitar a reidratação.

Durante a reidratação, tabletes contendo aproximadamente 12500 esporos de *Lycopodium* foram introduzidos nas amostras, de acordo com a quantidade de coprólitos reidratados (1 tablete para cada grama de coprólito) (MORROW, 2016; REINHARD, 1992a; REINHARD et al., 2008). Os tabletes se dissolvem facilmente em solução de HCL a 40% e por esse motivo foram adicionados às amostras juntamente com 200 μl dessa solução. Após esse processo, os tubos contendo as amostras foram submetidos à agitação a fim de auxiliar na dissolução e homogeneização (REINHARD et al., 2008).

Para a aplicação da técnica de sedimentação espontânea, os tubos foram novamente submetidos à agitação e as amostras vertidas através de malhas metálicas com aberturas de 250 μm em beakers de 50 ml de maneira a separar os micro dos macroresíduos. Nesse processo, as amostras foram desagregadas sobre a malha metálica com a utilização de espátulas de metal. Adicionou-se água destilada para facilitar o desagregamento e a passagem dos microresíduos através da malha, e álcool a 95% para minimizar a proliferação de microrganismos, como fungos e bactérias, que poderiam atuar na degradação dos ovos de parasitos.

Os macroresíduos, retidos na malha metálica, foram depositados em filtros de papel, secos à temperatura ambiente e armazenados em sacos plásticos. Esse material não foi analisado nesse estudo, porém serão realizadas análises em pesquisas posteriores. Os microresíduos foram pipetados e devolvidos aos tubos plásticos com tampas de rosca para análise parasitológica.

7.1.2 Metodologia quantitativa

A quantificação de esporos de *Lycopodium* e ovos de parasitos foi realizada de acordo com protocolo testado por Morrow (2016) que consiste na quantificação de no mínimo 200 esporos de *Lycopodium* em cada amostra. Também foram quantificados ácaros e larvas de nematódeos para pesquisa da correlação entre esses agentes tafonômicos e a possível degradação dos ovos de parasitos encontrados. A determinação da quantidade de ovos, ácaros e larvas de parasitos por grama de coprólito foi dada por (MAHER, 1981):

$$\text{OPG} = ((L_a/O_a) \times L_t)/G.$$

Onde:

L_a = Número de esporos de *Lycopodium* quantificados

O_a = Número de ovos de cada parasito/ácaros/larvas encontrado

L_t = Número total de esporos de *Lycopodium* introduzidos na amostra

G= Quantidade total de amostra processada

A média da intensidade de infecção foi calculada por sítio, por meio da razão entre o somatório de opg e o número de amostras positivas em cada sítio (BUSH et al., 1997). O cálculo da distribuição dos ovos de parasito recuperados nas populações de hospedeiros de cada sítio foi baseado na Razão entre a Variância total e a Média de abundância (VMR) (BUSH et al., 1997; REICZIGEL; RÓZSA, 2005; RÓZSA; REICZIGEL; MAJOROS, 2000; SHIELDS, 1993). A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte maneira (SHIELDS, 1993):

- a) $VMR < 1$ – Distribuição não agregada
- b) $VMR = 0$ – Distribuição uniforme
- c) $VMR = 1$ – Distribuição randômica
- d) $VMR > 1$ – Distribuição agregada

A comparação entre as prevalências observadas nos sítios estudados foi realizada no software *Quantitative Parasitology* 3.0 por meio dos testes de Qui-Quadrado e exato de Fisher ($P < 0,05$) (REICZIGEL; RÓZSA, 2005; RÓZSA; REICZIGEL; MAJOROS, 2000).

8 ARTIGO 1 - RECOVERING PARASITES FROM MUMMIES AND COPROLITES: AN EPIDEMIOLOGICAL APPROACH. ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA PARASITES AND VECTORS

Recovering parasites from mummies and coprolites: an epidemiological approach

Morgana Camacho¹, Adauto Araújo¹, Johnica Morrow², Jane Buikstra³ and Karl Reinhard^{2*}

¹Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca/Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ), Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 21041-210.

²Pathoecology Laboratory, School of Natural Resources, University of Nebraska - Lincoln, Lincoln, NE 68583-0987, United States.

³School of Evolution and Social Change, Arizona State University, Tempe, AZ, United States.

*Correspondence: kreinhard1@mac.com

E-mail addresses:

MC: morganacamacho88@gmail.com;

AA: adauto@ensp.fiocruz.br;

JM: johnicamorrow@yahoo.com;

JB: buikstra@asu.edu;

KR: kreinhard1@mac.com*

Abstract

In the field of archaeological parasitology, researchers have long documented the distribution of parasites in archaeological time and space through the analysis of coprolites and human remains. This area of research defined the origin and migration of parasites through presence/absence studies. By the end of the 20th century, the field of pathoecology had emerged as researchers developed an interest in the ancient ecology of parasite transmission. Supporting studies were conducted to establish the relationships between parasites and humans, including cultural, subsistence, and ecological reconstructions. Parasite prevalence data were collected to infer the impact of parasitism on human health. In the last few decades,

a paleoepidemiological approach has emerged with a focus on applying statistical techniques for quantification. The application of egg per gram (EPG) quantification methods provide data about parasites' prevalence in ancient populations and also identify the pathological potential that parasitism presented in different time periods and geographic places. Herein, we compare the methods used in several laboratories for reporting parasite prevalence and EPG quantification. We present newer quantification methods to explore patterns of parasite overdispersion among ancient people. These new methods will be able to produce more realistic measures of parasite infections among people of the past. These measures allow researchers to compare epidemiological patterns in both ancient and modern populations.

Keywords: Coprolite, Quantification, Epidemiology, Overdispersion, Parasite

Background

Parasite evidence has been recovered from mummies, coprolites and skeletons for six decades. During this time, parasitology as applied to archaeology has become increasingly quantitative. As detailed in several reviews [1-3], the focus on quantification developed as research goals changed. In turn, new research perspectives were envisioned as methods were refined. Today, we are at a point at which parasitological data have distinct relevance to paleopathologists. Herein, we review the methods and accumulated data sets to address various historical goals and new potentials for the field.

Between 1955 and 1969, pioneering researchers developed methods for the recovery of parasite evidence and published their findings for several regions [1-3]. This approach reached its most successful year in 1969 with the publication of three articles in *Science*, one reporting the oldest pinworm [4], another reporting the oldest thorny-headed worm [5] and the third reporting no evidence of infection in 50 examined samples [6]. The latter paper was especially noteworthy for recognizing the significance of negative data in comparing the relative infection state between archaeological cultures. That theme would be further developed during the 1980s. Subsequent to 1969, the interest among archaeologists and parasitologists led to expanded analysis and new research goals.

In the decade of the 1970s, the analysis of large numbers of coprolites archived in museums intensified (Table 1). From these collections, parasite prevalence was assessed [1-3]. In modern parasitology, prevalence is a statistical concept referring to the number of cases of a disease that are present in a particular population at a given time. This has to be carefully approached archaeologically because the actual population represented by the coprolite series has to be assessed by field and museum sampling. This led to provenience-based sampling

strategies in the field and laboratory. The development of sampling methods is discussed below in Development of methods. A landmark book, tracing parasitism and diet adaptations across the Great Basin and adjoining the Colorado Plateau, was published in 1977 by Gary Fry [7]. This overview was based on prevalence quantification and details stratigraphic sampling of coprolite samples. The book, *Analysis of Prehistoric Coprolites from Utah*, defined the biogeography of parasite infection for this region through time and subsistence strategies.

Table 1 Studies on coprolites and mummies published from 1944 through 2016. Coprolites and mummies are most common in the Americas and archaeologists have excavated them since the 1940s. Large numbers of coprolites were analyzed beginning in the 1960s. Therefore, these data are dominated by North and South American studies. Korea's Joseon Dynasty mummies are bolded, since are part of other geographical area and context

Provenience	Material	<i>n</i>^a	Type^b	Method	Reference/Year
Drobnitz Girl, Germany	mummy	1	A	?	1944 [75]
Karwinden Man, Poland	mummy	1	A	?	1944 [75]
El Plomo, Chile	coprolite/mummy	1	A	?	1954 [76]
Ming Dynasty, Guangzhou, China	coprolite/ mummy	1	A	?	1956 [17]
Grauballe Man, Denmark	mummy	1	A	?	1958[17]
Tollund Man, Denmark	mummy	1	A	?	1958 [77]
Odra River, Poland	coprolites	?	?	?	1960 [78]
Nahal- Mishmar Valley, Israel	coprolites	2	A	?	1961 [79]
Step House, CO, USA	coprolites	20	AB	Callen	1965 [43]
Lovelock Cave, CA, USA	coprolites	168	AB	Callen	1970 [9]
Frightful Cave, Mexico	coprolites	32	AB	Callen	1970 [9]
Clyde's Cavern, USA	coprolites	16	AB	Callen	1971 [9]
Lion House,	coprolites	4	A	Callen	1972 [9]

Provenience	Material	<i>n</i>^a	Type^b	Method	Reference/Year
CO, USA Hoy House, CO, USA Western Han Dynasty, Changsha City, China	coprolites	56	AB	Callen	1972 [9]
Pisco, Peru	mummy intestine section	1	A	Callen	1974 [80]
Upper Salts Cave, KY, USA	coprolites	8	A	Callen	1974 [81]
Ch'angsha, Hunan Province, China	mummy intestine section	1	A	?	1974 [82]
Glenn Canyon, USA	coprolites	40	AB	Callen	1977 [9]
Danger Cave, UT, USA	coprolites	46	AB	Callen	1977 [9]
Hogup Cave, UT, USA	coprolites	60	AB	Callen	1977 [9]
Hinds Cave, TX USA	coprolites	13	A	Callen	1978 [9]
Canyon del Muerto, NM, USA	coprolites/ mummies	2	A	Callen	1980 [83]
Gentio II, MS, Brazil	coprolites	22	AB	Lutz	1980 [84]
Itacambira, MG, Brazil	coprolites/ mummies	3	A	Lutz	1981 [85]
Han Dynasty Jinagling City, China	coprolite/mummy	1	A	?	1981[17]
Boqueirão Soberbo, MS, Brazil	coprolites	?	?	Lutz	1982 [86]
Gentio II, MS, Brazil	coprolite/mummy	1	A	Lutz	1983 [87]
Llods Street Pavement, UK	coprolite	1	A	HCl	1983 [59]
Los Gavilanes, Peru	coprolites	52	AB	?	1983 [88]
Hinds Cave, TX, USA	coprolites	7	A	Callen	1983[9]
Tiliviche, Chile	coprolites	26	AB	Lutz	1984 [89]
Chu Dynasty, Jingmen City,	coprolite/mummy	1	A	?	1984[17]

Provenience	Material	<i>n</i>^a	Type^b	Method	Reference/Year
South Korea					
Caserones, Chile	coprolites	10	A	Lutz	1985 [90]
Antelope House, AZ, USA	coprolites	90	AB	Callen	1986 [9]
Lindow Man, England	mummy	1	A	?	1986[75]
Chaco Canyon, NM, USA	coprolites	20	AB	Callen	1987 [9]
Turkey Pen Cave, UT, USA	coprolites	24	AB	Callen	1987 [9]
Antelope House, AZ, USA	coprolites	62	AB	Callen	1987 [9]
Dust Devil Cave, UT, USA	coprolites	100	AB	Callen	1987 [9]
Salmon Ruins, NM, USA	coprolites	112	AB	Callen	1987 [9]
Pedra Furada, PI, Brazil	coprolites	17	AB	Lutz	1987 [91]
Bighorn Sheep Ruin, UT, USA	coprolites	20	AB	Callen?	1988 [9]
Qilaleitsoq, Greenland	coprolite/mummy	1	A	?	1989 [92]
Big Bone Cave	coprolites	8	A	Formalin-ethyl acetate sedimention	1989 [93]
Estrago Cave, PE, Brazil	coprolites	4	A	Lutz	1989 [94]
NAN Ranch Ruin, NM, USA	coprolites/burial	1	A	Callen/Lyco	1989 [58]
Ventana Cave, AZ, USA	coprolite/mummy	1	A	Callen/Lyco	1991 [95]
Antelope House, AZ, USA	coprolites	180	AB	Callen	1992 [9]
Inscription House AZ, USA	coprolites	16	AB	Callen	1992 [9]
Baker Cave, TX, USA	coprolites	17	AB	Callen/Lyco	1992 [9]
Hinds Cave, TX, USA	coprolites	39	AB	Callen/Lyco	1992 [9]
Dan Canyon,	coprolites/burial	1	A	Callen/Lyco	1992 [96]

Provenience	Material	<i>n</i> ^a	Type ^b	Method	Reference/Year
AZ, USA					
Klethla, AZ, USA	sediments/burial	1	A	Chemical	1992 [9]
Montbéliard, France	coprolites/sediments	?	?	Reims	2002 [97]
León, Spain	mummy contents	4	A	Flotation	2003 [57]
Bighorn Cave, AZ, USA	coprolites	35	ABCD	Callen/Lyco	2002 [98]
Chiribaya, Peru	coprolites	29	AB	Callen	2003 [99]
Chiribaya, Peru	coprolites/mummy	43	ABCD	Callen/Lyco	2003 [10]
Skyles					
Mummy, TX, USA	coprolites/mummy	1	AC	Callen/Lyco	2003 [100]
Lluta Valley, Chile	coprolites/mummy	39	ABCD	Callen/Lyco	2003 [50]
Diverse sites, Switzerland and Germany	coprolites and sediments	89	AB	Reims	2005 [101]
Lapa do Boquete, Brazil	coprolite/mummy	1	AC	Callen/Lyco	2002 [51]
Gangneung, South Korea	coprolite/mummy	1	AB	Lutz	2007 [39]
Yangju, South Korea	coprolite/mummy	1	AB	Lutz	2007 [39]
SN2-19-1, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2007 [39]
SN1-2, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2007 [39]
SN3-7-1, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2007 [39]
SN2-19-2, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2007 [39]
Hadong-1, South Korea	coprolite/mummy	1	AB	Lutz	2008 [39]
GJ1-2, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2008 [39]
Yongin, South Korea	coprolite/mummy	1	AB	Lutz	2009 [39]
Waegwan, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2010 [39]
Seocheon, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2010 [39]
Sinnae, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2010 [39]
Chinchorro, Chile	coprolite/mummy	24	ABCD	Callen/Lyco	2010 [70]

Provenience	Material	n^a	Type^b	Method	Reference/Year
Piraino 1, Sicily	coprolite/mummy	1	ABC	Callen/Lyco	2010 [48]
El-Deir, Oasis of Kharga, Egypt	coprolites and sediments from mummies	12	A	Reims	2010 [54]
Dangjin, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2011 [39]
Gongju, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2011 [39]
Antelope Cave, AZ, USA	coprolites	20	ABCD	Callen/Lyco	2011 [29]
Sapgyo, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2012 [39]
CMC, Mexico	coprolites	36	ABCD	Callen/Lyco	2012 [33]
Zweeloo, Belgium	mummy intestine section	1	ABC	Searcey	2013 [56]
Jinju, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2014 [39]
Hadong-2, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2014 [39]
Sacheon, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2014 [39]
Mungyeong, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2014 [39]
PJ-SM, South Korea	coprolite/ mummy	1	AB	Lutz	2014 [39]
Vilnius, Lithuania	mummy intestine sections	10	AC	Searcey	2014 [49]
Nivelles, Belgium	Burials coprolites and Sediments	3	AC	HCl	2015 [34]
Furna do Estrago, Brazil	coprolites/burials	6	AC	Lutz/Lyco	2015 [28]
Mamluk Period, Jerusalem	coprolites	12	AC	Reims	2015 [55]
CMC, Mexico	coprolites	100	ABCD	Callen/Lyco	2017 [26]

^an, number of samples analyzed

^b“Type” refers to whether the derived data are reliable for positive/negative (A), prevalence (B), infection intensity (C), or overdispersion (D) studies

Abbreviations: HCl, studies that needed to use acidified rehydration solution following [59]; Lyco, analysis included epg estimation by using *Lycopodium* spores

The last two decades of the 20th century were a time of geographical expansion of study areas and exploration of cultural influences on parasitism. As reviewed by Araújo and colleagues [8], Brazilian work emerged in the nineteen eighties. Discoveries in Brazil and

Chile led to papers on the origins and dispersal of common parasites as well as the first papers on animal coprolites. In North America, the influence of cultural trends was defined and parasitological data were related to bone pathology data, especially porotic hyperostosis [1-3, 9].

The first decade of the 21st century was a time of review and consolidation of findings. A volume of the *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* was dedicated to “paleoparasitology”. Thirty articles were presented covering new methods, new theories, case studies and summaries of findings. Two new perspectives were introduced. The pathoecology perspective was introduced by Martinson and colleagues [10]. She presented a case study that united archaeological reconstruction of cultural patterns and life-cycles of parasites to define risk factors of infection and pathology for villages in Peru. Eggs per gram values were introduced in this study to quantify infection levels for different sites. Reinhard & Buikstra [11], introduced quantification of louse infestation to determine whether or not the negative binomial distribution of overdispersion could be seen in archaeological data. Both of these perspectives were developed in subsequent years and the overdispersion concept, when combined with EPG estimates, can be a powerful approach to determining infection intensity.

Pathoecology allows for the generation of testable hypotheses based on archaeological data and knowledge of parasite life-cycles [1, 3, 12-14]. The field is based on Pavlovsky’s nidus concept [15] applied to archaeology [16]. Reinhard & Bryant [3] wrote, “The nidus is a geographic or other special area containing pathogens, vectors, reservoir hosts, and recipient hosts that can be used to predict infections based on one’s knowledge of ecological factors related to infection. Ecological factors include the presence of vectors, reservoir hosts, humans, and external environment favorable for the transmission of parasites. An individual nidus therefore reflects the limits of transmission of a given parasite or pathogen within specific areas of interaction: bedbugs in a bedroom, for example. Thus, a nidus is a focus of infection. A nidus can be as confined as a single room containing a bed and with access to the room by rodents carrying plague-infected fleas. However, a nidus can also be as large as the community and its surrounding area in which there is a transmission of hookworms.”

Reinhard & Araújo [14] refined the concept to develop a predictive tool that in turn can be used to develop hypotheses testable via archaeological investigations. For the Lower Pecos Canyonlands, they assimilated the distribution of natural definitive hosts with an overlay of the distribution of intermediate hosts, and integrated the distribution of hunter-gatherer features that would have expanded the nidi for infection. Based on this work, the

authors recommended excavation and laboratory strategies to recover evidence of parasite transmission.

Archaeological data can have practical value to modern epidemiology. The continuity from archaeological to modern patterns has been shown with mummies and coprolites from Asia. Han and colleagues [17] reviewed studies from Korea and China and showed that comparisons between modern and ancient parasite data have been done for some time. Korean colleagues opened this current trend in diachronic epidemiological study comparing infection prevalence and distribution between late 20th century parasite infection surveys and evidence from the Joseon Dynasty of the 1400s to 1800s in South Korea [18, 19]. The distribution of *Trichuris trichiura* and *Ascaris lumbricoides* were the same between the two periods. However, the prevalence of trematode species was higher for the Joseon people and some flukes had a broader distribution in the Joseon times relative to modern times. Hookworm emerged after the Joseon Dynasty. These studies showed that if methods are consistently applied, then data coming from archaeological contexts are comparable to modern clinical contexts.

In the last decade, quantification methods were applied to coprolites and mummies to estimate EPG values. This was a methodological breakthrough that opened the possibility of estimating infection intensity and relative pathological implications. Furthermore, this allows parasitologists to examine overdispersion in archaeological populations. These methods allow us to recover parasite data that can be examined from an epidemiological perspective.

In the negative binomial distribution, the variance is greater than the mean, so the variance divided by the mean is greater than 1. Whenever the variance/mean is greater than 1, we say that the distribution is overdispersed or aggregated. Overdispersion characterizes a phenomenon of aggregation of a majority of parasites in a minority of the host population. Thus, the majority of hosts have no or few parasites. A very small number of hosts, however, carry a great number of parasites. Crofton [20] showed that overdispersion was present for parasite populations. Since then, overdispersion has been defined as axiomatic among parasites of a variety of vertebrate and invertebrate hosts [21-23]. Patterns of overdispersion from wildlife parasitology are presented in Fig. 1 derived from overview studies [23, 24]. This illustrates the pattern across species. Example A shows data for tapeworm (*Triaenophorus nodulosus*) infections in perch (*Perca fluviatilis*). In this example, the aggregation is not as pronounced as in other cases; 54% of the tapeworms were in 18.5% of hosts with 81.5% of hosts remaining uninfected or lightly infected. Example B shows data for nematode (*Porrocaecum ensicaudatum*) infections in starlings (*Sturnus vulgaris*). In this case,

89% of the hosts are uninfected or lightly infected, and 69% of the parasites were recorded in 11% of the hosts. Example C shows data for nematode (*Spiroxys japonica*) infections in pond frogs (*Pelophylax nigromaculata*). In this case, 70% of the parasites were recorded in just 4% of the hosts while 88% of the hosts were uninfected and 8% had light infections.

Overdispersion was discovered for four species of the most common human-infecting geohelminths [25].

To demonstrate normal versus overdispersed patterns in archaeological and modern humans, we compared data from coprolites excavated at La Cueva de los Muertos Chiquitos (CMC) (Fig. 2) with pinworm (*Enterobius vermicularis*) overdispersion in a clinical study (Fig. 3). The CMC data are drawn from Morrow & Reinhard [26] and the clinical data from Chai and colleagues [27]. The difference is that the Korean study was based on the recovery of worms from children compared to the CMC analysis, which was based on EPG counts from a diversified sample of coprolites. The Korean worm counts corresponded with a negative binomial distribution and 72% of the worms were recorded in 13% of the subjects while 53% were uninfected [27]. The CMC data are also overdispersed with 66% of samples being negative for pinworms. The ten samples with the highest EPG counts contained 76% of the eggs. This is of interest from two perspectives. First, the CMC data show aggregation in that a minority of coprolites contained a majority of the eggs. The second point is that overdispersion in pinworm egg counts is not necessarily intuitive in context of the pinworm life-cycle. Pinworms lay substantial numbers of eggs on the perianal folds. Therefore, one might not expect to find eggs within coprolites. However, the CMC data indicate that EPG concentrations for pinworms can be used to document overdispersion.

To paleopathologists, overdispersion of parasites is important from several perspectives. First, infected hosts exhibit lower fitness. This might be signaled in highly infected hosts by lower fecundity, slower growth rates, more severe expression of pathology or higher mortality rates. In the paleopathological record, the osseous evidence of short stature, non-specific stress indicators, and skewed age-at-death ratios could well be the influence of overdispersion on individual fitness. A second relevant issue relates to parasite transmission by heavily infected individuals, sometimes called “superspreaders”. In modern infection control strategies, superspreaders are targeted for infection management. Simply put, clinical examination diagnoses the superspreaders who are treated and subsequently the transmission of the parasites is reduced. Paleopathologically, evidence of treatment of heavily infected individuals has been found as reviewed by Teixeira-Santos and colleagues [28]. In

some cases, evidence of medicinal plants is associated with highly infected individuals [29]. Thus, the connection between infection, spreaders and treatment was recognized in prehistory.

In the broader picture, overdispersion relates to regulation of host populations since aggregation of parasites is a stabilizing force in host population dynamics. In bioarchaeology, relative population success, as represented by pathology such as porotic hyperostosis, may be a result of disruptions of life styles by environmental change, crowding, or other issues [3, 12, 30, 31]. In summary, we can make these connections from modern epidemiology to past epidemiology through the analysis of overdispersion. Aggregation of parasites among hosts is important because individual-level parasite loads determine individual host fitness and transmission potential. Paleopathologically, the individual-level conditions amplify on a population level to influence transmission and then the bioarchaeological stability of populations through time.

Bryant & Reinhard [30] referred to coprolites as the “missing links” in paleopathology. Coprolites contain the data needed to define diet and infection. These were two essential factors that defined over-all health in prehistory. Infection prevalence and intensity can be documented between sites with new EPG quantification methods. However, fewer quantified data sets have been collected during the past decades. We believe that these data can address three issues. First, at the level of individuals, good diagnoses of any sample(s) can be used to trace parasites through time and space, which are relevant to paleopathologists. Secondly, data from large, diverse samples can be used to assess prevalence, which are relevant to understanding pathology at a population level. These population data then become relevant to bioarchaeologists. Thirdly, defining EPG leads to estimating infection intensity, and ultimately overdispersion. These topics are especially powerful for assessing disease in the past at both the individual and population levels, which is relevant to paleopathology. At this early state, EPG methods are currently being developed in independent laboratories utilizing different methods. Herein, we assess the ease and comparability of these methods and discuss these important issues in developing an approach to studying parasite overdispersion among those who occupied archaeological sites.

It must be noted that clinical methods were tested and reviewed in several laboratories in the 1960s-1980s [32]. The combined experience showed that with coprolites and mummies, clinical techniques were not consistently successful. Continued research in the last decades came to the same conclusions [33-35]. Also, for most studies of coprolites and mummies, detailed analyses of diet were required [3, 30]. Therefore, methods had to be developed to

recover seeds, pollen, starch grains, and parasite eggs. This goal was accomplished during the 1960s (see reviews by Reinhard & Bryant [3] and Bryant & Reinhard [30]).

This paper focuses on methods developed for coprolites and mummies. By reviewing the development of methods used on these remains, we will define which data sets collected over the last six decades are applicable to studies of distribution, prevalence and quantified epidemiology. Preservation conditions for coprolites and mummies are best in the Americas. A majority of the European parasite work in historical or archaeological material has centered on latrines, which are not amenable to overdispersion studies, as they contain combined refuse from an unknown number of individuals, often spanning several temporal horizons. Therefore, this paper has a mostly American focus.

Development of methods

The goal of sampling should be to derive samples from a diverse set of individuals. Ideally, one would have some independent measure of the number of people occupying that site (e.g. burials), but in most cases that is not easily possible. Corroborative archaeological evidence is sometimes available. For example, Morrow & Reinhard [36] used an analysis of dental casts made from quids to infer that a population of at least 50 people contributed to the sample based on distinct dental cast morphology [37]. Archaeological estimates of population size based on room numbers has also been used [12]. For each site, the parasitologist should obtain at least an estimate of the size of population that used the site and over what time range. Then he/she can develop a sampling strategy that as close as possible statistically determines how many samples are needed to get an informative representation of prevalence. For some sites, an appropriate sample number can simply not be met, because there are only so many preserved coprolites. In such cases, it is especially important to report the effect on the confidence level of the statistical inference as recommended by Jovani & Tella [38].

A guide for sample size selection should be based on modern studies of prevalence estimates at different sample sizes of actual populational prevalences. Jovani & Tella [38] completed an extensive review of prevalence studies. For minimum sample sizes between 10 and 20, they recommended using 15 as a reasonable trade-off for maintaining acceptable levels of uncertainty. At sample sizes ranging between 20–100, reliable prevalence data are obtainable. Therefore, for prevalence data, sample sizes of 16 or greater should be used [38]. The reliability of the data increases with larger sample sizes and researchers must acknowledge the influence that sample size has on their conclusions. Also, this is only

relevant for reasonably high prevalence levels. If prevalence levels are very low, large sample sizes are needed in any case for detection. This is a very important consideration for archaeological parasitologists. For some archaeological cultures, high prevalences did occur [16, 18, 39]. However, prevalence was very low among hunter-gatherers across the western arid regions of North America [7, 9]. Reinhard & Bryant [40] (p. 245–288) and Reinhard [9] asserted that many samples, as close to 100 as possible, are needed for parasite prevalence studies for hunter-gatherers. The prevalence of parasite infection for hunter-gatherers ranged between 0–4%. Therefore, sample sizes of 50 to over 100 were used to ensure that evidence of true infections was found. However, when these methods were applied in the 1980s and 1990s to agricultural sites, it became apparent that sample size could be reduced because parasite prevalence increased to 3–29% among agricultural people. Because it takes a tremendous commitment of time and trained personnel to conduct parallel dietary analyses, it became attractive to researchers interested in the parasite-diet interface to be able to reduce sample size to 30–50 coprolites while maintaining rigor in data collection.

Based on the discussion above, one might think that higher sample size is always better. This is not necessarily the case. From the archaeological perspective, one must also consider diversifying provenience sampling. If high number samples are based on sampling fewer proveniences, then the sample will be skewed by individuals represented in limited contexts. Therefore, archaeological samples must consider both number of samples and number of proveniences from each site. It is often necessary to reduce the number of samples for sites that have limited distinct proveniences.

Sample size and sample diversification are essential in assessing overdispersion and prevalence. It is important to have large numbers of samples and for these samples to come from diverse archaeological contexts. Secure sample diversification is achievable when samples are recovered from burials or mummies because each sample is associated with a specific person. Reinhard [41] addressed methods for non-burial archaeological contexts. Different sites exhibit different sanitation strategies and some of these sites have many small latrine features. Diversification can be achieved by analyzing one coprolite from each individual feature. More often, archaeologists encounter large deposits containing hundreds to thousands of samples. In such cases, diversification can be achieved by focusing the sampling strategies on grid squares and levels [41]. Finally, at some sites, coprolites are recovered in discrete contexts each isolated from the other. These individual deposition episodes represent activities separated by significant time passage and every sample under these conditions can be included.

This conclusion is supported by examining modern prevalence assessments. Jovani & Tella [38] completed an extensive review of prevalence studies. They define low sample sizes as 1–15, at which there is poor prevalence statistical reliability. At sample sizes ranging between 16–100, reliable prevalence data are obtainable. Therefore, for prevalence data, sample sizes of 16 or greater should be used. However, the reliability of the data increases with larger sample sizes and researchers must acknowledge the influence that sample size has on their conclusions. In Table 1, we note studies with sample sizes larger than 15 as appropriate for prevalence assessments.

In archaeological samples of mummies from specific cultural horizons, aggregated prevalence data have been derived from individual studies of difference cemeteries. For example, 20 Joseon Dynasty mummies have been recovered and analyzed (Table 1). Because these are derived from the same cultural horizon and cultural class, they have been used to assess the prevalence of parasites specific to the higher socio-economic class of this culture [39]. This is, in our assessment, a reasonable approach to parasite prevalence assessment.

Sample size for overdispersion studies should follow the guidelines for prevalence analysis. A minimum size of 16 samples should be used for these examinations. However, we are experimenting with larger sample sizes (50–100) to obtain data for the common parasites as well as for more rare infections [26, 42].

There are further archaeological considerations relevant to interpreting even large and diverse samples. The power of inference depends on the geographical scale considered. Even if the prevalence is derived from a good and statistically relevant sampling from a single archeological site, it may not reflect the prevalence of a large population dispersed over multiple sites within a limited geographical space. This had been recognized in some research areas for decades leading to multiple Ancestral Pueblo site studies [7]. The benefit of multiple analyses over time was ever increasing fine-grained results delimiting parasitism patterns for sub-regions and time periods [9]. This is also because - as noted in the nidus concept above - infected individuals are not necessarily evenly distributed among the population, but may occur "clumped", in certain favorable ecologies, but not in others [12]. Or in other words, several nidi were involved in the manifestation of overdispersion on a landscape level. This extended to the diversity of parasites across space and time. Because of the relative abundance of Ancestral Pueblo sites, fine-grained ecological comparisons were possible. However, for archaeological populations that left a more sparse record, and especially hunter-gatherers, we must keep in mind that any sample may only represent a seasonal, transitory parasitological snapshot. The data from each sample must result in a more circumspect interpretation. In

general archaeoparasitologists recognize that samples come from a stratified landscape of prevalence across subpopulations, time, and often unknown topography.

Coprolite analysis began earnest in the 1960s (Table 1). Samuels [43] published a very early rehydration solution of NaOH and EDTA. By the 1970s, methods had been standardized by researchers in Canada, Peru and the USA. Although early researchers experimented with clinical methods of the day, such as formalin-ether separation and zinc sulphate ($ZnSO_4$) flotation, the development of a simple rehydration method was rapidly adopted by institutions that hosted coprolite research.

The Callen method

Canadian researchers Eric Callen and T. W. M. Cameron adapted the rehydration method of Van Cleave & Ross [44] as the standard first step in coprolite methods [45-47]. It is important to remember that Callen and Cameron were a botanist/parasitologist team that established the interdisciplinary approach to coprolite analysis that is used today [46]. Their interdisciplinary need to recover all types of data from samples defined the rehydration method subsequently applied by North American researchers. This method, henceforth called the Callen method, employs 0.5% trisodium phosphate (Na_3PO_4) aqueous solution to rehydrate coprolite samples. As applied today, this method facilitates the recovery of parasites, pollen, starch, and macroscopic dietary remains. Reinhard & Bryant [3] present a detailed literature review of subsequent articles, chapters, theses, and dissertations that were built on this method.

The Callen method, as applied from 1970 onwards, involves rehydration, disaggregation, and screening microscopic remains, followed by parasitological and dietary analyses. As applied today, the Callen method begins with describing, cleaning, photographing, and weighing each sample. The samples are subsampled, ideally by sectioning the sample longitudinally. For each sample, one portion is preserved for future analysis and the second portion is processed. The subsamples are weighed and rehydrated in 0.5% trisodium phosphate aqueous solution for 48 hours. After this time, the samples are transferred into beakers on stir plates and disaggregated using a stir bar. Disaggregation continues until the microscopic particles are completely separated from macroscopic fibers, bones and seeds. The disaggregated remains are poured through 250 μm mesh screens over a second series of beakers. Using distilled water jets from wash bottles, the macroscopic samples are washed while being separated with laboratory minispatulas and glass stir rods. In this way, the microscopic remains are completely removed from the macroscopic remains.

Following screening, macroscopic remains are transferred from the mesh screens to sterile filter paper, labeled, and left to dry for analysis. The dried macroremains are later examined using dissection microscopes. The water and microscopic residues that pass through the screen and are collected in beakers are subsequently concentrated *via* repeated centrifugation. Microscopic examinations are conducted utilizing an aliquot of the microremains.

This basic Callen method has been modified in recent decades to permit EPG concentration [10, 29, 33, 34, 48-51]. At the end of the 48 hours rehydration period, one or more tablets of *Lycopodium* spores (available from the University of Lund, Sweden) are dissolved in 1–5% HCl and added to the rehydrating coprolites. In general, one tablet is added per gram of sample. These spores mix with the samples during the disaggregation phase. The concentration of EPG can then be estimated by dividing the number of eggs counted by the number of *Lycopodium* spores counted. This quotient is multiplied by the number of spores added and then divided by the weight of the subsample.

The Lutz method

In Brazil, the Callen method was combined with the spontaneous sedimentation method [52]. This method is reviewed by Camacho and colleagues [53]. Samples are rehydrated in 0.5% trisodium phosphate aqueous solution (Na_3PO_4) for 72 hours [45]. After this period of time, the samples are disaggregated with a glass stir rod, strained through triple folded gauze on a glass funnel into conical glass jars and left to sediment for 24 hours. Drops of the sediment are taken from the bottom with Pasteur pipettes to make microscope preparations.

Korean researchers use a slightly modified spontaneous sedimentation method [19]. The samples are rehydrated in 0.5% trisodium phosphate aqueous solution over a week-long period. During this rehydration period, the samples are shaken several times to ensure disaggregation. After the rehydration, samples are filtered through several layers of gauze and precipitated for 1 day. Then, the precipitates are dissolved in 10% neutral buffered formalin, and pipetted onto microscopic slides.

Very recently, researchers experimented with *Lycopodium* quantification of EPG with the Lutz method [28]. A tablet of *Lycopodium* spores is dissolved in HCl and added to the rehydrating coprolites. This is followed by a thorough disaggregation to homogenized microscopic remains in the rehydration fluid and to separate them from larger food remains, such as bone fragments and seeds. After this, the material is strained in double gauze folded into conical receptacles where they were left to sediment for 24 hours.

The Reims method

This method was formally named and defined by Le Bailly and colleagues [54]. The method was developed by Françoise Bouchet at the Université de Reims, France. Le Bailly and colleagues [54] modified the method by reducing sonication time. Samples are first rehydrated for 10 days in a 0.5% trisodium phosphate aqueous solution and 5% glycerinated water solution. Several drops of 10% formalin are added to prevent fungal or bacteria growth. The samples are then crushed using a mortar and pestle and subjected to ultrasonic treatment for 1 min, to mix the solution and separate parasite remains from the sediment. The solution is filtered in a column of sieves, with mesh sizes of 315, 160, 50 and 25 μm , using an ultra-pure water constant flux system (Millipore, Direct-Q 5 system, Molsheim, France). The sediment retained by each sieve is stored in tubes with several drops of 10% formalin.

A modification of the Reims method was presented by Yeh and colleagues [55]. The specific modification was that 0.2 g of each coprolite was examined microscopically until the entire sample was analyzed. Afterward, the number of eggs counted was multiplied by 5 to determine the EPG.

The Searcey method

Some mummies do not retain coprolites in the intestine sections. For such cases, an intestinal wash method has been developed [49, 56]. First, an intestinal segment is described, photographed, and weighed. The section is then placed in a gridded (1 cm^2) Petri plate and rehydrated using 0.5% trisodium phosphate aqueous solution. During rehydration, the section increases in size and the grid helps to document this phenomenon. For a control sample, the exterior of the rehydrated intestine is then washed for microscopic remains. The rehydration fluid from the petri plate is poured through a 250 μm mesh screen covering a 600 ml glass beaker. The section is then placed in the screen and washed with a jet of distilled water while being gently scraped with a lab minispatula to loosen any adherent material. Following screening, macroscopic remains are transferred from the mesh screens onto sterile filter paper, labeled and left to dry. The dried macroremains, if recovered, are later examined *via* stereomicroscopy. The microscopic remains in the 600 ml beaker are concentrated *via* repeated centrifugation and serve as analysis control.

The section is transferred to a fresh Petri plate. Then it is opened along the longest dimension with a scalpel and the section is unrolled. The interior of the section is washed with a jet of distilled water through a 250 μm mesh screen covering a 600 ml glass beaker. The fluid in the beaker is concentrated *via* repeated centrifugation. Following screening,

macroscopic remains are transferred from the mesh screens onto sterile filter paper, labeled and left to dry. The dried macroremains, if recovered, are later examined *via* stereomicroscopy.

Two centrifuge tubes of microscopic remains result from this process and should be labeled “interior” and “exterior control”. The number of milliliters in each sample is recorded. A *Lycopodium* spore tablet is dissolved in HCl and added to each tube. The microscopic remains are then washed several times in distilled water before microscopic analyses begin.

Miscellaneous methods

Methods for analyzing mummies are adapted according to the conditions of preservation. As reviewed by Seo [39], the majority of Korean mummy studies is based on coprolites recovered from intestinal tracts. Therefore, the Callen or Lutz methods are applicable. However, for some South American mummies, trisodium phosphate does not rehydrate remains. In such cases, a 4% solution of potassium hydroxide has been successful (unpublished observations). Hidalgo-Argüello and colleagues [57] used 7% potassium hydroxide, combined with the clinical McMaster method, to recover eggs from mummy abdominal contents and other entombed remains.

Skeletal analysis

Coprolites are sometimes recovered from skeletons [34, 58] or open air sites [59]. Often, such remains are calcified and for this reason the rehydration with 0.5% trisodium phosphate aqueous solution is not successful. However, such samples rapidly disaggregate in 4% HCl solution and can be processed as described for the Callen method. In Table 1, this method is signified by “HCl”.

Comparability

The methods are summarized Table 2. It is important to note that the labs from the (i) Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ, Brazil, (ii) Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Mar del Plata, Argentina and (iii) Anthropology and Paleopathology Laboratory, Institute of Forensic Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea, share samples with the (iv) Pathoecology and Palynology Laboratory, School of Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln. Through this interchange, we have learned that the Lutz method as applied in Argentina, Korea and Brazil produces comparable prevalence results with the Callen

method [33]. However, the gauze used in the process is not conducive to the total separation and concentration of microscopic remains *via* centrifugation as employed in the Callen method.

The Searcey method is not comparable with coprolites because the quantification of mummy material is based on the volume of microscopic remains recovered from the intestinal washes. We are currently applying this method to more intestinal sections and will eventually build a data set from mummies that will be comparable with one another.

Table 2 Comparison of major coprolite and intestinal wash methods.

Method	Prelim ^a	Quant ^b	Rehydrat ^c	Disaggreg ^d	Screening ^e	Concent ^f	Post-analysis ^g
Callen	Cleaned, imaged, sectioned or cored	Lyco	0.5% Na ₃ PO ₄ ; 48hr	Magnetic stirrer, active separation of particles w/ water jet and spatula agitation	250 µm mesh	Centrifuge	Retain all macro and micro remains and unprocessed section
Lutz, Korea	–	–	0.5% Na ₃ PO ₄ ; 1 wk		Three layers of double gauze	Passive sediment 1 day then mixed w/10% neutral buffered formalin	–
Lutz, Brazil	Cleaned	–	0.5% Na ₃ PO ₄	Glass stir rod	Three layers of double gauze	Passive sediment 1 day	Retain all macro and micro remains and unprocessed section
Reims	–	–	0.5% Na ₃ PO ₄ in 5% glycerin-water w/ formalin	Crushed then ultrasonic treatment	Screened w/315 mm, 160 mm, 50 mm, and 25 mm meshes. Micro remains retained on screen		–

^a“Prelim” refers to preliminary preparation of samples

^b“Quant” refers to egg per gram (epg) quantification method

^c“Rehydrat” refers to solution and time

^d“Disaggreg” shows how the rehydrated samples are disaggregated

^e“Screening” refers to how macroscopic remains are separated from microscopic

^f“Concent” refers to methods of concentrating microscopic remains

§“Post analysis” relates to sample conservation

Abbreviations: “Lycos” refers to the application of quantification method based on *Lycopodium* counting

In a recent paper, Dufour & Le Bailly [60] compared the Reims method with the Warnock & Reinhard [61] method for recovering eggs from sediments. Comparison showed that the Reims method was deficient in eggs recovery. Judging from the graphs presented by Dufour & Le Bailly [60], about 52% of ascarid eggs and about 73% of trichurid eggs are lost in the Reims screening method. We recommend that researchers avoid the Reims method for coprolite analysis until it is further refined. Instead, we recommend the methods developed by Jones [59] for coprolites from open sites and applied by Rácz and colleagues [34] for burials as summarized above in Skeletal analysis.

Considering sampling estimation methods based in a population approach and coprolite processing, the criteria used for ancient parasite analysis is specified in Table 3.

Table 3 Criteria for rigorous quantitative paleoparasitological analyses aiming a quantitative approach in coprolite studies

	Sampling		Processing
Population size estimation per site	Diversification		The Callen method with <i>Lycopodium</i> spore quantification has been proven to be the best method for measuring eggs per gram
Number of rooms; corroborative archaeology; number of burials; number of documented dentitions [37]; modern prevalence studies or previous prevalence observations in the same site;	Provenience		
	Mummies	Coprolites from latrines	
	Sample as many individuals as possible	Use archaeological strata (grid squares and levels) to devise a diverse sample	

Geographical representation of the current data set

Table 1 shows that the samples processed by the Callen method number 1485. The number processed by the Lutz method amounts to over 100. This provides a large data set of comparable samples that has allowed researchers to look at parasite prevalence over time and space. These data have been used by past researchers to define prevalence of infection over large geographic areas [7, 62-67]. Examples of these prevalence studies are presented below.

The Great Basin is the largest geographic area of optimal preservation in the United States, taking up parts of California, Oregon and Idaho, half of Utah and nearly all of Nevada. As reviewed by Reinhard & Bryant [3], the area was the focus of intensive archaeological work and large numbers of coprolites were recovered from desert and lacustrine areas of the region. This allowed parasitologists to define the spread of parasites. In the desert regions of Utah and Oregon, tapeworm, thorny-headed worms, and pinworms infected hunter-gatherers for some 10,000 years [7, 29]. These parasites were absent in the lacustrine area of Nevada. However, fluke eggs were present in human coprolites. As of today, it is still unknown if these represent true infections of humans, or if the eggs were consumed with prey animals without causing human infections [66]. At the southern extremity of the Great Basin, but within the Great Basin cultural area, pinworms and thorny-headed worms have been found among agricultural peoples. The coprolite database from this area is robust enough to emphatically show how parasitism emerged over 10,000 years of time and differentiated based on ecological and technological variation.

Among Ancestral Pueblo populations in the Southwest USA, the prevalence of parasite remains in coprolites varied profoundly. For the Ancestral Pueblo cultures of the Colorado Plateau, pinworm prevalence was especially variable. Analysis of housing style and location shows that stone-walled villages had the highest prevalences while small villages had the lowest prevalences. Large stone-walled villages unenclosed by caves had high variation. Researchers related this variation to limited air flow in caves which promoted airborne infection combined with the crowd effect of many people living in a concentrated cave environment [68]. Large villages outside of caves exhibit variance to differences in population size and patterns of space use, especially in terms of plaza and roof usage [12]. The ancestral pueblo parasite database, combined with skeletal pathology evidence, revealed patterns in prevalence of parasitism that varied with pathology resulting from vitamin B₁₂ deficiency [9, 31]. These analyses show how fine-grained interpretations can be made from prevalence data combined with archaeological reconstructions.

Working towards a paleoepidemiological approach

Epidemiology was applied to archaeology in a series of papers published from 2003 and onwards. All were based on new quantification methods. Reinhard & Buikstra [11] quantified lice on Peruvian mummies and demonstrated that the negative binomial of parasite aggregation was evident in archaeological sources. This axiom in parasitology simply states that the majority of parasites of a single species will be concentrated in a few number of individual hosts, around 10%. This in itself raised the possibility that studies of large samples could reveal variance in overdispersion and intensity based on host population factors. Arriaza and colleagues [69] continued this approach to louse parasitism in large populations studies of mummies, which led to conclusions regarding prehistoric social interaction over time.

A series of endoparasite papers has emerged recently and most utilize *Lycopodium* quantification. Arriaza and colleagues [70] connected Chinchorro prevalence of fish tapeworm prevalence in mummies to El Niño events. Importantly, these researchers built their database with data derived from both Lutz and Callen methods. Martinson and colleagues [10] showed that variation in parasite infection occurred between villages in the same river valley. Santoro and colleagues [50] looked at Inca Empire expansion, which impacted the Lluta Valley of northern Chile. Prior to the Inca, farms were small communities dispersed in the valley. The Inca established a large central town for the farmers and due to taxes on maize, the farmers expanded their subsistence by including fish on their diet. Tapeworm infection became common with this dietary expansion. In addition, the crowd parasite, human pinworm, became established in the town. Before the Inca, this parasite had been absent in the valley.

The variety of these examples shows how the accumulation of the data presented in Table 1 has already been used in diverse studies. The next step was developing a new database based on quantification in terms of EPG. An obvious application of this is the determination of worm burden. It must be said that some researchers have published reservations about the direct connection of worm burden estimates from EPG calculations. Dainton [71] was the first to state concerns related to archaeological work. He pointed out factors such as parasite diurnal variation in egg production, variable distribution of eggs within the same fecal pellet, effects of differential moisture level between feces, and other concerns. However, more recent reviews substantiate the value of assessing *Ascaris lumbricoides* worm burden and estimating pathology based on EPG fecal counts [72]. An important observation presented by these authors is that the negative binomial distribution in EPG is reflected cross-culturally and in very different geographic areas [72]. When EPG

calculations are related to pathology, these values have been determined: 1–1999 EPG = light infection; 2000–3999 = moderate infection; > 4000 = heavy infection. However, assessing worm number based on EPG might be confounded by the fact that *A. lumbricoides* individual fecundity is inversely related to increasing worm burden. Therefore, the higher the number of worms, the lower the egg production of each individual female. Kotze & Kopp [73] reviewed the evidence of density-dependent fecundity for other parasites and find that hookworms and perhaps whipworms also exhibit this trait. For this reason, paleopathological estimates of worm burden are presented as ranges of worms present in the host, or the average daily egg production of females per gram of sample. For example, using the average egg count of 14,000 eggs per female per day of infection with whipworms [74], a gram of coprolite that contains 50,000 EPG could be said to contain the product of 3.57 females. Multiplying this value by the weight of the entire coprolite sample will provide an estimate of the worm production per coprolite. Only if the entire contents of the colon are represented from a mummy or skeleton, is it possible to estimate the range of adult worms in the human host [34].

A simple example of the Callen *Lycopodium* method of EPG concentrations comes from the comparison of whipworm EPG concentrations from the published literature for Inca [50], Chiribaya [10], Rio Zape [33], Piraino 1 [48], Mamluk [55], Zweeloo [56], Vilnius [49] and Medieval remains [34, 59]. These EPG values are presented in Table 4. Regarding the highest count from the Lloyds Bank Pavement coprolite from Medieval York, England, Jones's high counts of whipworm and maw-worm led him to conclude that the individual "was parasitized by at least a small number of maw-worms and several hundred whipworms. Such an infestation today would be classed as a heavy one, although well within the limits of human tolerance" [59]. Rácz and colleagues [34] came to a more dismal conclusion from their analysis of material from a Medieval skeleton recovered in Nivelles, Belgium. The Nivelles skeleton retained an intestinal tract represented by eight recovered coprolites. They calculated an average value of 51,630 EPG for the coprolites. This value, when multiplied by the weights of all the samples, yielded a total value of 1,500,000 eggs in all of the samples. They concluded that this represented a worm burden beyond human tolerance and likely contributed to the death of the individual. Kumm & colleagues [48] analyzed Piraino 1, which yielded a value of 34,529 EPG. This relatively high value likely resulted from the lowered immunity of Piraino 1, who died of metastatic cancer [48]. The remaining values in Table 4 show counts consistent with subclinical infections that provoked no symptoms. This simple

analysis of a small sample of cases shows that egg quantification is essential for assessing pathology caused by parasite infection.

Table 4 Whipworm egg per gram counts from various sites. The egg per gram data are converted to average output of a female whipworm of 14,000 eggs per day [74].

Site	EPG/worm(s) per gram	Year [Reference]
Lloyds Bank Pavement, York	66,000/4.7	1983 [59]
Nivelles, Belgium	51,630/3.7	2015 [34]
Piraino, Sicily	34,529/2.5	2010 [48]
Inca, Arica, Chile	5,400/0.4	2003 [50]
Chiribaya, Arica, Chile	1,800/0.1	2014 [49]
Vilnius, Lithuania	4,779/0.3	2003 [10]
Chiribaya, Ilo, Peru	2,240/0.2	2012 [33]
Chiribaya, Ilo, Peru	435/0.03	2015 [55]
Zape Mexico	1,127/0.1	2013 [56]
Mamluk Period cesspool	162/0.01	
Zweeloo, Netherlands	traces	

Other smaller studies demonstrated overdispersion in samples for human-specific, direct life-cycle parasites, such as pinworms. This trend was also evident in smaller samples from Andean coprolites. In reviewing the pinworm data from the analysis of Inca coprolites from Santoro and colleagues [50], overdispersion is evident. For the Inca study, 24 samples were examined and six were positive for pinworm. In positive samples, the EPG counts ranged from 700 to 2100. Sixty-nine percent of the eggs were found in three (12.5%) of the hosts. The mean intensity of infection was 1350 EPG. Pinworm females carry 4000 to 16,000 eggs when they are ready to oviposit. The Inca pinworm counts represent less than one worm's egg production per gram of sample. Using Jones's vernacular, these infections were "well within the limits of human tolerance" [59]. Can we expect to find overdispersion from multiple-host helminths? To answer this question, we are reviewing the fish tapeworm data recovered previously from analysis of Chiribaya coprolites [10, 50]. The fish tapeworm data from Chiribaya coprolites are intriguing. Previously, Martinson and colleagues [10] had identified a high prevalence of fish tapeworm infection among production class villages of farmers and fisherman. One aspect of the study was the analysis of 11 coprolites recovered from the site of Chiribaya Baja. Seven were positive for eggs and the numbers ranged from 90 to 17,800 EPG. Sixty-seven percent of the eggs were recovered from a single individual (9%) and 89% of the eggs were recovered from the two (18%) most infected individuals. These results are consistent with overdispersion. The mean intensity of infection is 3794 EPG which

is a tiny fraction of the estimated daily egg production of a million eggs per day. Therefore, the high prevalence of 64% infection probably had little impact on health. This analysis of a small sample series demonstrates that overdispersion is present in archaeological helminth data and preliminary intensity data reflect variation. Thus, when quantification methods are applied to coprolites, comparable helminth analyses are possible.

To demonstrate aggregation in ectoparasites, we will use the louse data collected by Reinhard & Buikstra [11]. Lice data were collected from 146 mummies [11]. To quantify louse infestation, all nits and eggs were counted within a 2×2 cm area. Three counts were taken at the area of maximum scalp infestation and three for the area of minimal infestation. This was repeated for the hair three inches away from the scalp. Therefore, a total of 12 measurements were taken for each mummy. These data fit the negative binomial of overdispersion and heralded the emergence of true parasite epidemiology in mummy studies. Three sites were analyzed. The first was a large administrative center, Chiribaya Alta. The second village was El Yaral which specialized in Llama herding. The third site, Algodonal, was a small hamlet of refugees from the Lake Titicaca region who moved into the Chiribaya Alta area to escape the impacts of environmental collapse. Prevalence was variable between the sites: Chiribaya Alta (36%), El Yaral (18%) and Algodonal (71%). The mean intensity is a measurement of the average number of parasites for infested or infected hosts. For these sites, the mean intensity, as measured in terms of number of eggs/lice per cm^2 varied: Chiribaya Alta (4.7), El Yaral (9.1) and Algodonal (12.4). The surprising contrast between the high El Yaral intensity and low prevalence is noteworthy. It shows that although fewer people were infested, those that were infested had heavy louse burdens. For the low status immigrants at Algodonal, the prevalence and intensity were both high. The lice data demonstrate that overdispersion is evident in archaeological data and that prevalence and intensity data are recoverable.

These small-sample examples show that quantification of helminth infection from coprolites is a promising area to explore. It is unfortunate that the truly large samples analyzed for parasites between 1970 and 1992 were processed before *Lycopodium* quantification was established [10, 50]. The analysis of such large samples would have allowed for the documentation of overdispersion and measures of infection intensity. Applying this type of work to large coprolite series associated with skeletal evidence of pathology could clarify the connection between parasitism, diet, and pathology. Dietary reconstruction is another avenue of coprolite research [30]. Previously, Reinhard [9] found a positive and significant correlation between pinworm prevalence in coprolites and cranial

lesions of porotic hyperostosis in skeletons from the same sites and regions. These sites also differed in the number of parasites species evident in the samples. In addition, using the original Callen & Cameron [45] approach to coprolite analysis, while cooperating with bioarchaeologists, will allow researchers to explore both the diet and parasite factors that affected ancient health [31].

Conclusions

The researchers focusing on archaeological parasitology had different goals through the years of study. The first works were focused on establishing the presence of parasites in ancient contexts. These pioneering studies defined the diversity of parasites in the Americas and Europe and developed methods for analysis. In the 1960s and 1970s, scholars began population-level studies that compared and contrasted parasitism in various geographical regions. At this time, prevalence studies dominated the field. Prevalence data stimulated interest in the consequences that parasite infections had among ancient people. This interest led to the question of whether infection provoked disease, which, in turn, led to investigations of paleoepidemiology. Paleoepidemiology required refinement of methods, especially quantification. This perspective necessitated the recovery of statistical data regarding overdispersion and infection intensity. Eventually, the paleoepidemiological approach will create comparable data from archaeological and modern human communities. For these reasons, quantification methods needed to be evaluated. The adaptation of *Lycopodium* spore quantification has been very successful when combined with the Callen method. However, it is not effective when combined with the Lutz method. This is due to the fact that it is difficult, or in some cases impossible, to mechanically separate the microscopic and macroscopic remains from the folds of gauze. We emphasize that the Callen-*Lycopodium* method is ideal for measuring EPG concentrations. Once EPG quantification is done globally, parasitologists working in archaeology will be able to clarify the conditions in which these people were living and associate infections to pathology. Interpreting the data within cultural and environmental contexts, the pathoecology of infections can be documented through time and space. In order to interpret ancient parasitological data on these perspectives, it is important to consider the quantification methods and also the concept of overdispersion on parasite-host systems within populations of the past. We hope that research on parasites in ancient material will continue in this direction and that the epidemiological perspective will be broadly applied to the interpretation of parasite infections among ancient populations.

Abbreviations

EPG: egg per gram; CMC: La Cueva de Los Muertos Chiquitos; NaOH: sodium hydroxide; EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; ZnSO₄: zinc sulphate; Na₃PO₄: trisodium phosphate; HCl: chloridric acid.

Acknowledgements

Our work was supported by the Brazilian funding agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) especially the Ciências sem Fronteiras. We would also like to thank reviewers for their contributions to this paper.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The data presented in this review are derived from published literature. The sources for the data are cited in Table 1 and listed in References. The review on literature was discussed based on the quantification perspective and methodological analysis for research on ancient parasites proposed, by the present authors. The literature search was carried out at PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>), Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>) and Google Scholar. Conclusions rely on the papers searched along with the author's interpretations.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

The authors wish to acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) especially the Ciências sem Fronteiras program for the financial support of this study.

Authors' contributions

AA, MC and KR wrote the first draft. MC was responsible for literature review and accumulating the data presented in the tables. AA, MC and KR discussed the relative efficiency of the methods presented in the review. JM provided data and edited the manuscript. JB provided contributions on population perspective on archaeological sites and how to establish sample number based on an epidemiological view in order to provide parasite data for a regional site and also for a geographical scattered culture. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Dittmar K, Reinhard KJ, Araújo A. The study of parasites through time: archaeoparasitology and paleoparasitology. In: Grauer A, editor. *Paleopathology: a companion Volume*. Hoboken: Wiley/Blackwell Press; 2011. p. 170-190.
2. Reinhard KJ, Araújo A. Synthesizing archaeology with parasitology in paleopathology. In: Buikstra JE, Roberts CA, editors. *A global history of paleopathology*. Oxford: Oxford University Press; 2012. p. 751-764.
3. Reinhard K, Bryant V. Pathoecology and the future of coprolite studies. In: Stodder AWM, editor. *Reanalysis and reinterpretation in southwestern bioarchaeology*. Tempe: Arizona State University Press; 2008. p. 199-216.
4. Fry GF, Moore JG. *Enterobius vermicularis*: 10,000-year-old human infection. *Science*. 1969; 166(Suppl. 3913):1620.
5. Moore JG, Fry GF, Englert EJr. Thorny-headed worm infection in North American prehistoric man. *Science*. 1969;163(Suppl. 3873):1324–1325.
6. Heizer RF, Napton LK. Biological and cultural evidence from prehistoric human coprolites. *Science*. 1969;165(Suppl. 3893):563-568.
7. Fry GF. *Analysis of prehistoric coprolites from Utah*. 1st ed. Salt Lake City: University of Utah Press; 1977.
8. Araújo A, Reinhard K, Ferreira L. Palaeoparasitology - human parasites in ancient material. *Adv Parasitol*. 2015;90:349–387.
9. Reinhard K. Patterns of diet, parasitism and anemia in prehistoric west North America. In: Stuart-Macadam P, Kent S, editors. *Diet, demography and disease: changing perspectives on anemia*. New York: Aldine de Gruyter; 1992. p. 219–258.
10. Martinson E, Reinhard KJ, Buikstra JE, Cruz KD de la. Pathoecology of Chiribaya parasitism. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(Suppl. 1):195–205.

11. Reinhard KJ, Buikstra J. Louse infestation of the Chiribaya culture, Southern Peru: variation in prevalence by age and sex. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(Suppl. 1):173–179.
12. Reinhard KJ. Pathoecology of two Ancestral Pueblo villages. In: Reitz EJ, Newsom LA, Scudder SJ, editors. *Case studies in environmental archaeology.* New York: Plenum Press; 2008a. p. 191-210.
13. Reinhard K. Parasite pathoecology of Chacoan Great Houses: the healthiest and wormiest ancestral Puebloans. In: Reed PF, editor. *Chaco's northern prodigies Salmon, Aztec, and the ascendancy of the middle San Juan region after AD 1100.* Salt Lake City: University of Utah Press; 2008b. p. 86–95.
14. Reinhard KJ, Araújo A. Prehistoric earth oven facilities and the pathoecology of Chagas disease in the Lower Pecos Canyonlands. *J Archaeol Sci.* 2014;53:227–234.
15. Pavlovsky EN. *Natural nidity of transmissible diseases with special reference to the landscape ecology of zoonoses.* 1st ed. Urbana: University of Illinois Press; 1966.
16. Slepchenko S, Reinhard K. Paleoparasitology and pathoecology in Russia: investigations and perspectives. *Int J Paleopath.* 2017 (in press).
17. Han ET, Guk SM, Kim JL, Jeong HJ, Kim SN, Chai JY. Detection of parasite eggs from archaeological excavations in the Republic of Korea. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(Suppl. 1):123–126.
18. Seo M, Oh CS, Chai JY, Jeong MS, Hong SW, Seo YM, Shin DH. The changing pattern of parasitic infection among Korean populations by paleoparasitological study of Joseon Dynasty mummies. *J Parasitol.* 2014;100:147–150.
19. Seo M, Shin DH, Guk SM, Oh CS, Lee EJ, Shin MH, et al. *Gymnophalloides seoi* eggs from the stool of a 17th century female mummy found in Hadong, Republic of Korea. *J Parasitol.* 2008;94:467–472.
20. Crofton HD. A quantitative approach to parasitism. *Parasitology.* 1971;62:179–193.
21. Anderson RM, May RM. Helminth infections of humans: mathematical models, population dynamics, and control. *Adv Parasitol.* 1985;24:1–101.
22. Crompton DW, Keymer AE, Arnold SE, Investigating over-dispersion; *Moniliformis* (Acanthocephala) and rats. *Parasitology.* 1984;88:317–331.
23. Shaw DJ, Grenfell BT, Dobson AP. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitology.* 1998;117:597–610.
24. Wilson K, Bjørnstad ON, Dobson AP, Merler S, Poglayen G, Randolph SE, et al. Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes. In: Hudson PJ, Rizzoli A,

- Grenfell BT, Heesterbeek H, Dobson AP, editors. The ecology of wildlife diseases. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 6-44.
25. Croll NA, Ghadirian E. Wormy persons: contributions to the nature and patterns of overdispersion with *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* and *Trichuris trichiura*. Trop Geogr Med. 1981;33:241–248.
 26. Morrow JJ, Reinhard KJ. The paleoepidemiology of *Enterobius vermicularis* (Nemata: Oxyuridae) among the Loma San Gabriel at La Cueva de los Muertos Chiquitos (600-800 CE), Rio Zape Valley, Durango, Mexico. Comp Parasitol. 2017 (in press).
 27. Chai JY, Cho SY, Kang SY, Seo BS. Frequency distribution of *Enterobius vermicularis* in a highly endemic population. Korean J Parasitol. 1976;14:103-108.
 28. Teixeira-Santos I, Sianto L, Araújo A, Reinhard KJ, Chaves SAM. The evidence of medicinal plants in human sediments from Furna do Estrago prehistoric site, Pernambuco State, Brazil. Quat Int. 2015;377:112-117.
 29. Fugassa MH, Reinhard KJ, Johnson KL, Gardner SL, Vieira M, Araújo A. Parasitism of prehistoric humans and companion animals from Antelope Cave, Mojave County, northwest Arizona. J Parasitol. 2011;97:862–867.
 30. Bryant VM, Reinhard KJ. Coprolites and archaeology: the missing links in understanding human health. Vertebr Coprolites N M Mus Nat Hist Sci Bull. 2012;51:379–387.
 31. Walker PL, Bathurst RR, Richman R, Gjerdrum T, Andrushko V. The causes of porotic hyperostosis and *cribra orbitalia*: a reappraisal of the iron-deficiency-anemia hypothesis. Am J Phys Anthropol. 2009;139:109–25.
 32. Reinhard K, Araújo A, Ferreira LF, Herrmann B. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. Homo. 1986;37:217-239.
 33. Jiménez FA, Gardner SL, Araújo A, Fugassa M, Brooks RH, Racz E, Reinhard KJ. Zoonotic and human parasites of inhabitants of Cueva de Los Muertos Chiquitos, Rio Zape Valley, Durango, Mexico. J Parasitol. 2012;98:304–309.
 34. Rácz SE, Araújo EP de, Jensen E, Mostek C, Morrow JJ, Van Hove ML, et al. Parasitology in an archaeological context: analysis of medieval burials in Nivelles, Belgium. J Archaeol Sci. 2015;53:304–315.
 35. Reinhard KJ, Hevly RH, Anderson GA. Helminth remains from prehistoric Indian coprolites on the Colorado Plateau. J Parasitol. 1987; 73:630–639.
 36. Morrow JJ, Reinhard KJ. Assessing the archaeoparasitological potential of quids as a source material for immunodiagnostic analyses. Korean J Parasitol. 2016;54: 605 – 616.

37. Hammerl EE, Baier MA, Reinhard KJ. Agave chewing and dental wear: evidence from quids. *PLoS One*. 2015;10:7.
38. Jovani R, Tella JL. Parasite prevalence and sample size: misconceptions and solutions. *Trends Parasitol*. 2006;22:214-218.
39. Seo M, Araújo A, Reinhard K, Chai JY, Shin DH. Paleoparasitological studies on mummies of the Joseon Dynasty, Korea. *Korean J Parasitol*. 2014;52:235-242.
40. Reinhard KJ, Bryant VM. Coprolite analysis: a biological perspective on archaeology. In: Schiffer MB, editor. *Advances in archaeological method and theory*. Tucson: University of Arizona Press; 1992. p. 245-288.
41. Reinhard KJ. Reestablishing rigor in archaeological parasitology. *Int J Paleopathol*. 2017;doi:10.1016/j.ijpp.2017.06.002.
42. Morrow JJ, Reinhard KJ. *Cryptosporidium parvum* among coprolites from La Cueva de los Muertos Chiquitos (600–800 AD), Rio Zape Valley, Durango, Mexico. *J Parasitol*. 2016;102:429-35.
43. Samuels R. Parasitological study of long-dried fecal samples. *Mem Soc Am Archaeol*. 1965;19:175–179.
44. Van Cleave HJ, Ross JA. A method for reclaiming dried zoological specimens. *Science*. 1947;105(Suppl. 2725):318.
45. Callen EO, Cameron TWM. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Sci*. 1960;8:35–40.
46. Bryant VM. Callen's Legacy. In: Sobolik KD, editor. *Paleonutrition: the diet and health of prehistoric Americans*. Carbondale: Southern Illinois University Press; 1994. p. 151–160.
47. Bryant VM, Dean GW. Archaeological coprolite science: The legacy of Eric O. Callen (1912–1970). *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*. 2006;237:51–66.
48. Kumm KJ, Reinhard KJ, Piombino-Mascalì D, Araújo A. Archaeoparasitological investigations of a mummy from Sicily (18th - 19th Century AD). *Anthropol Int J Hum Divers Evol*. 2010;48:177–184.
49. Morrow JJ, Larsen AS, Piombino-Mascalì D, Jankauskas R, Kozakaitė J, Araújo A, Reinhard KJ. Taphonomic considerations of a whipworm infection in a mummy from the Dominican Church of the Holy Spirit, Vilnius, Lithuania. *Int J Paleopathol*. 2014;7:83–87.
50. Santoro C, Vinton SD, Reinhard KJ. Inca expansion and parasitism in the Lluta Valley: preliminary data. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98:161–163.
51. Sianto L, Reinhard KJ, Chame M, Chaves S, Mendonça S, Gonçalves ML, et al. The finding of *Echinostoma* (Trematoda: Digenea) and hookworm eggs in coprolites collected

- from a Brazilian mummified body dated 600–1,200 years before present. *J Parasitol.* 2005;91:972–975.
52. Lutz A. O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo observações, feitas no Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1919;11:1.
53. Camacho M, Pessanha T, Leles D, Dutra JM, Silva R, Souza SM, Araújo A. Lutz's spontaneous sedimentation technique and the paleoparasitological analysis of *sambaqui* (shell mound) sediments. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108:155–159.
54. Le Bailly M, Mouze S, Rocha GC da, Heim J-L., Lichtenberg R, Dimand F, Bouchet F. Identification of *Taenia* sp. in a mummy from a Christian necropolis in El-Deir, Oasis of Kharga, Ancient Egypt. *J Parasitol.* 2010;96:213–215.
55. Yeh H-Y, Prag K, Clamer C, Humbert J-B, Mitchell PD. Human intestinal parasites from a Mamluk Period cesspool in the Christian Quarter of Jerusalem: potential indicators for long distance travel in the 15th century AD. *Inter J Paleopath.* 2015;9:69-75.
56. Searcey N, Reinhard KJ, Egarter-Vigl E, Maixner F, Piombino-Mascali D, Zink AR, et al. Parasitism of the Zweeloo Woman: Dicrocoeliasis evidenced in a Roman period bog mummy. *Int J Paleopathol.* 2013;3:224–228.
57. Hidalgo-Argüello MR, Díez Baños N, Fregeneda Grandes J, Prada Marcos E. Parasitological analysis of Leonese royalty from Collegiate-Basilica of St. Isidoro, León (Spain): helminths, protozoa, and mites. *J Parasitol.* 2003;89:738–743.
58. Shafer HJ, Marek M, Reinhard KJ. A Mimbres burial with associated colon remains from the NAN Ranch Ruin, New Mexico. *J Field Archaeol.* 1989;16:17–30.
59. Jones A. 1983. A coprolite from 6–8 pavement. In: Hall AR, Kenward HK, Williams D, Greig JRA, editors. *Environment and living conditions at two Anglo-Scandinavian sites.* York: Council of British Archaeology; 1983. p. 225–229.
60. Dufour B, Le Bailly M. Testing new parasite egg extraction methods in paleoparasitology and an attempt at quantification. *Int J Paleopath.* 2013;3:199–203.
61. Warnock PJ, Reinhard KJ. Methods of extracting pollen and parasite eggs from latrine soils. *J Archaeol Sci.* 1992;19:261–264.
62. Araújo A, Reinhard K, Leles D, Sianto L, Iñiguez A, Fugassa M, et al. Paleoepidemiology of intestinal parasites and lice in pre-columbian South America. *Chungara.* 2011;43:303–313.
63. Araújo A, Reinhard KJ, Ferreira LF, Gardner SL. Parasites as probes for prehistoric human migrations? *Trends Parasitol.* 2008;24:112–115.
64. Drake A, Oxenham M. Disease, climate and the peopling of the Americas. *Hist Biol.* 2013;25:565–597.

65. Reinhard K. Cultural ecology of prehistoric parasitism on the Colorado Plateau as evidenced by coprology. *Am J Phys Anthropol.* 1988;77:355–366.
66. Reinhard KJ. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol.* 1990;82:145–163.
67. Reinhard KJ, Araújo A, Morrow JJ. Temporal and spatial distribution of *Enterobius vermicularis* (Nematoda: Oxyuridae) in the prehistoric Americas. *Korean J Parasitol.* 2016;54:591-603.
68. Hugot JP, Reinhard KJ, Gardner SL, Morand S. Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. *Parasite.* 1999;6:201–208.
69. Arriaza B, Standen V, Reinhard K, Araújo A, Heukelbach J, Dittmar K. On head lice and social interaction in archaic Andean coastal populations. *Int J Paleopathol.* 2013;3:257–268.
70. Arriaza BT, Reinhard KJ, Araújo AG, Orellana NC, Standen VG. Possible influence of the ENSO phenomenon on the pathoecology of diphyllbothriasis and anisakiasis in ancient Chinchorro populations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105:66–72.
71. Dainton M. A quick, semi-quantitative method for recording nematode gut parasite eggs from archaeological deposits. *Circaea J Assoc Environ Archaeol.* 1992;9:58–63.
72. Walker, M., Hall, A., Basáñez, M.-G. Individual predisposition, household clustering and risk factors for human infection with *Ascaris lumbricoides*: new epidemiological insights. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5:e1047.
73. Kotze AC, Kopp SR. The potential impact of density dependent fecundity on the use of the faecal egg count reduction test for detecting drug resistance in human hookworms. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2:e297.
74. John DT, Petri WA. *Markell and Voge's medical parasitology.* 9th ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2006.
75. Leles D, Reinhard KJ, Fugassa M, Ferreira LF, Iñiguez AM, Araújo A. A parasitological paradox: Why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas? *J Archaeol Sci.* 2010;37:1510–1520.
76. Pizzi T, Schenone H. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. *Bol Chil Parasitol.* 1954;9:73–75.
77. Thomas S. Danish Prehistory: A review. *Antiquity.* 1958;32:183–186.
78. Grzywiński L. Analysis of feces from the Middle Age period. *Zool Pol.* 1961;10:195–199.
79. Witenberg G. Human parasites in archaeological findings. *Bull Isr Explor Soc.* 1961;25:86.

80. Allison MJ, Mendoza D, Pezzia A. A radiographic approach to childhood illness in precolumbian inhabitants of southern Peru. *Am J Phys Anthropol.* 1974;40:409–415.
81. Fry G. Ovum and parasite examination of salts cave human paleofeces. In: Watson PJ, editor. *Archeology of the Mammoth Cave Area.* New York: Academic Press; 1974. p. 61.
82. Hall A. A Lady from China's Past. *Natl Geogr Mag.* 1974;145:660–681.
83. El-Najjar MY, Benitez J, Fry G, Lynn GE, Ortner DJ, Reyman TA, Small PA. Autopsies on two Native American mummies. *Amer J Phys Anthropol.* 1980;53:197-202.
84. Ferreira LF, Araújo AJG de, Confalonieri UEC. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1980;74:798–800.
85. Confalonieri UE, Araújo AJ de, Ferreira LF. *Trichuris trichiura* infection in Colonial Brazil. *Paleopathol Newsl.* 1981;35:13–14.
86. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U. Untitled note. *Paleopathol Newsl.* 1982;38:5.
87. Ferreira LF, Araújo AJG de, Confalonieri UEC. The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983;77:65–67.
88. Patrucco R, Tello R, Bonavia D. Parasitological studies of coprolites of Pre-Hispanic Peruvian populations. *Curr Anthropol.* 1983;24:393–394.
89. Ferreira LF, Araújo AJG de, Confalonieri UEC, Nuñez L. The finding of eggs of *Diphyllobothrium* in human coprolites (4.100–1.950 BC) from northern Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79:175-180.
90. Araújo AJ de, Ferreira LF, Confalonieri UE, Nuñez L, Ribeiro Filho BM. The finding of *Enterobius vermicularis* eggs in pre-Columbian human coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1985;80:141-143.
91. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Chame M, Ribeiro Filho B. The finding of hookworm eggs in human coprolites from 7230 ± 80 years BP, from Piauí, Brazil. *An Acad Bras Cienc.* 1987;59:280–281.
92. Lorentzen B, Rørdam AM. Investigation of faeces from a mummified Eskimo woman. In: Hart Hansen JP, Gullov HC, editors. *The Mummies from Qilaleitsoq: Eskimos in the 15th Century.* Copenhagen, Denmark: Kommissionen for Videnskabelige Undersøgelser i Grønland; 1989. p. 139–143.
93. Faulkner CT, Patton S, Johnson SS. Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, Van Buren County, Tennessee. *J Parasitol.* 1989;75:461–463.

94. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Lima JM de. *Trichuris trichiura* eggs in human coprolites from the archaeological site of Furna do Estrago, Brejo da Madre de Deus, Pernambuco, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84:581.
95. Reinhard, K.J., Hevly, R.H., 1991. Dietary and parasitological analysis of coprolites recovered from mummy 5, Ventana Cave, Arizona. Kiva. 1991;56:319-325.
96. Dominguez S, Reinhard KJ, Sandness KL, Edwards CA, Danielson D. The Dan Canyon Burial, 42A21339, a P III Burial in Glen Canyon National Recreation Area. Lincoln: Midwest Archeological Center's Occasional Studies Series 26; 1992. p. 108.
97. Bouchet F, Harter S, Paicheler JC, Araújo A, Ferreira LF. First recovery of *Schistosoma mansoni* eggs from a latrine in Europe (15–16th centuries). J Parasitol. 2002;88:404–405.
98. Reinhard K, Danielson DR, Daniels M, Miranda Chaves S. Multidisciplinary Coprolite Analysis. In: Geib PR, Keller DR, editors. Bighorn Cave: test excavation of a stratified dry shelter Mojave County, Arizona. Flagstaff: Northern Arizona University Bilby Research Center Occasional Papers 1; 2002. p. 135–152.
99. Holiday DM, Guillen S, Richardson DJ. Diphyllobothriasis of the Chiribaya Culture (700–1476 AD) of southern Peru. Comp Parasitol. 2003; 70:167–171.
100. Reinhard K, Fink TM, Skiles J. A case of megacolon in Rio Grande Valley as a possible case of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98(Suppl. 1):165–172.
101. Le Bailly M, Leuzinger U, Schlichtherle H, Bouchet F. *Diphyllobothrium*: Neolithic Parasite? J Parasitol. 2005;91:957–959.

Figure legends

Fig. 1 Graph derived from three examples of endoparasite overdispersion [23, 24]. Example A, a more marginal example of aggregation shows data for tapeworm infection (*Triaenophorus nodulosus*) in perch (*Perca fluviatilis*). In this example 54% of the tapeworms were in 18.5% of hosts with 81.5% uninfected or lightly infected. Example B shows pronounced overdispersion of the nematode (*Porrocaecum ensicaudatum*) in starlings (*Sturnus vulgaris*). In this case, 89% of the hosts are uninfected or lightly infected, and 69% of the parasites were recorded in 11% of the hosts. Example C shows a very pronounced case of overdispersion for nematodes (*Spiroxys japonica*) in pond frogs (*Rana nigromaculata*). In this case, 70% of the parasites were recorded in just 4% of the hosts while 88% of the hosts were uninfected and 8% had light infections.

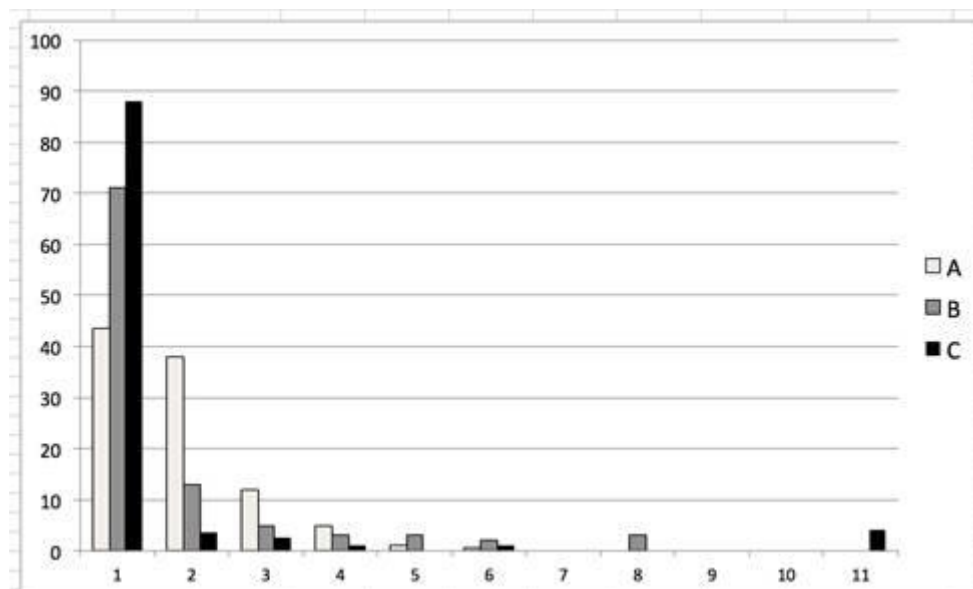


Fig. 2 Graph derived on pinworm eggs recovered from La Cueva de los Muertos Chiquitos coprolites [26]. The graph exemplifies pronounced overdispersion with 66 of 100 samples negative. The ten samples with the highest counts contained 76% of the eggs. This is most similar to example C in Fig. 1.

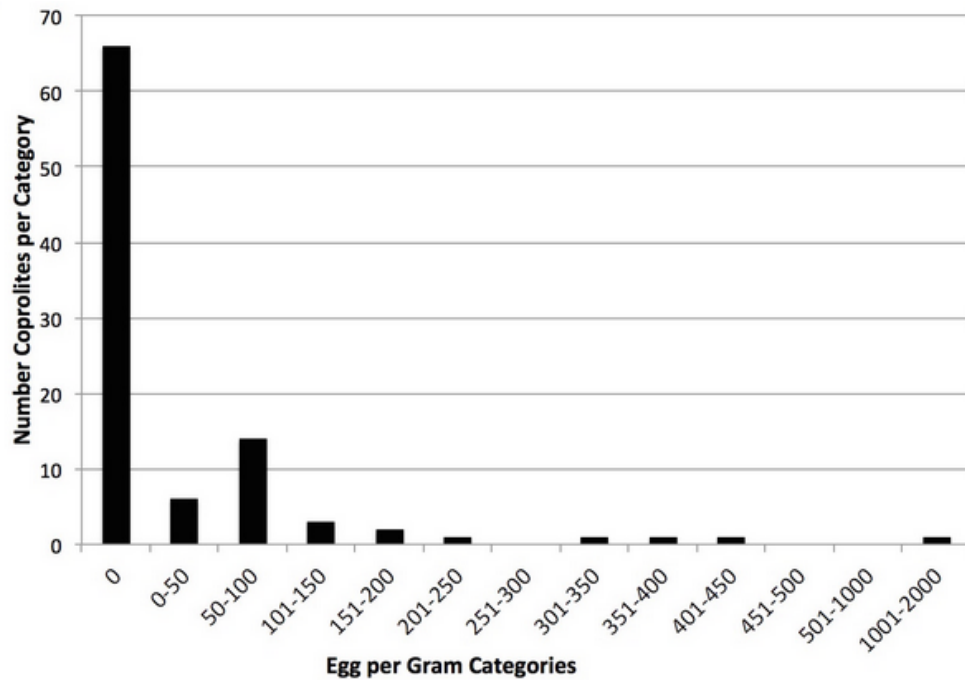
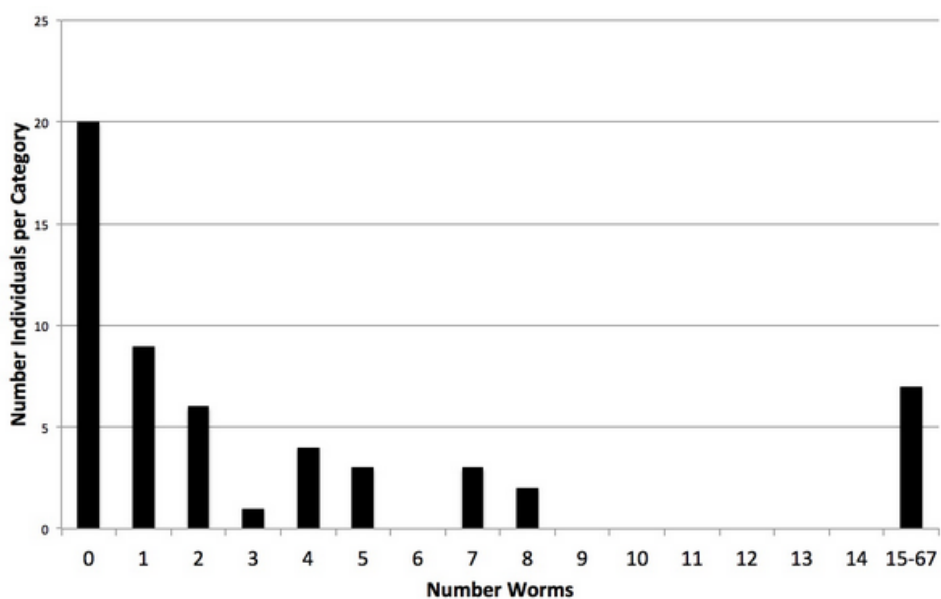


Fig. 3 Graph derived from pinworm infection data from Korean school children [27] (Fig. 1, trial 2). The data were collected in several anthelmintic “dewormings”. One of three treatments revealed a dispersed, negative binomial distribution: 72% of the worms were recovered in 13% of the subjects while 53% were uninfected.



9 ARTIGO 2 - CONSIDERATIONS ON PINWORM PATHOECOLOGY IN THREE ANCESTRAL PUEBLO SITES AND POSSIBLE CORRELATION WITH MODERN EPIDEMIOLOGICAL STUDIES. SUBMETIDO ÀS MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Considerations on pinworm pathoecology.

Considerations on pinworm pathoecology in three Ancestral Pueblo sites and possible correlation with modern epidemiological studies.

Morgana Camacho^{a,b}; Alena Mayo Iñiguez^{b*}; Karl Jan Reinhard^c

^aEscola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

^bLaboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21040360, Rio de Janeiro, Brasil, Telephone number: +55 21 2562-1616. Email address: alena@ioc.fiocruz.br

^cPathoecology Laboratory, School of Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln, Nebraska, USA.

Abstract

Background

Pinworms infected Ancestral Pueblo populations since early occupations. Previous study correlated high prevalence of pinworm with habitation style. Turkey Pen Cave, an early occupation site and Salmon Ruins a late occupation site exhibit prevalences that are contrary to this assumption. These sites could indicate outliers or it could be that the previous quantification method applied was not successful in detecting the real amount of pinworm eggs per gram thus leading to inexact interpretations.

Objectives

Investigate the pathoecology of pinworm infection in three Ancestral Pueblo sites.

Methods

Turkey Pen Cave, Salmon Ruins and Aztec Ruins Rooms 219 and 225 human coprolites were weighted, rehydrated along with the addition *Lycopodium* tablets and screened in 250 μ m meshes. Eggs were counted until a minimum of 200 *Lycopodium* spores was quantified and egg per gram was estimated for each sample. Parasitological statistical parameters were calculated at Quantitative Parasitology 3.0 software.

Findings

Pinworm was the only parasite recovered with prevalences of 38.5% at Turkey Pen Cave, 32.8% at Salmon Ruins, 14.3% at Aztec Ruins room 219 and 72.7% at room 225. Salmon Ruins had the highest mean and median intensity and Aztec Ruins Room 225 presented the highest mean abundance. Variance to mean ratio showed that pinworms were aggregated in these Ancestral Pueblo populations. Difference between all sites prevalences was statistically significant. Aztec Ruins Room 225 prevalence was significantly different when compared with Room 219 and Salmon Ruins, but not with Turkey Pen Cave. Comparisons between Salmon Ruins and Turkey Pen Cave and Salmon Ruins and Aztec Ruins Room 219 prevalences were not significantly different.

Main conclusions

Prevalences found in early and late occupation refutes previous hypothesis. Previous quantification method probably interfered in the interpretation on Ancestral Pueblo pinworm infection. This study reveals a new paleoparasitological panorama of pinworm infection in Ancestral Pueblo populations.

Key words: Pinworm; Quantification; Ancestral Puebloans

Sponsorships: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (AMI, grant number 307932/2014-1); Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro, FAPERJ (AMI, grant number CNE 2/2016).

Introduction

Paleoparasitology studies parasite lifeforms in archaeological and paleontological materials. Since its creation, paleoparasitology concerned in answering questions about which parasites infected humans through time and migration and also to explain the relationship between hosts and parasites (Ferreira et al. 2011). Through time, paleoparasitology began to investigate the epidemiological meaning of infection by applying the pathoecology concept

(Reinhard & Bryant 2008). Pathoecology is the study of the environmental and cultural factors that influence infections and diseases emergence (Reinhard 1974; Reinhard & Bryant 2008). This concept is applied in order to contribute to the interpretation of the ecological factors involved in the manifestation of infection in ancient populations. Along with pathoecology, paleoparasitology started to apply quantification methods so it can improve the interpretative potential of the parasitological evidence (Reinhard & Buikstra 2003). However, quantification methods are only applicable in archaeological sites that exhibit excellent preservation conditions, which are not usually found (Rácz et al. 2015; Reinhard & Buikstra 2003). Ancestral Pueblo archaeological sites present exceptional conditions of conservation and offer the opportunity to verify the epidemiological meaning of infection in these populations. Furthermore, with these data it is possible to demonstrate if epidemiology of ancient population infections is comparable with modern epidemiological data. This is important to help predict epidemiological sceneries of emergence or reemergence of infections in modern populations (Reinhard & Buikstra 2003).

Parasites are found to be aggregated in their host populations (Crofton 1971). This parasite distribution characterizes the phenomenon of parasite aggregation when most of the hosts have very low parasite burdens, and a few hosts have very high burdens (Shaw et al. 1998). The most common way to verify parasite distribution is to calculate the Variance to Mean Ratio (VMR), which is a measure used to quantify if a set of observed occurrences is aggregated or dispersed, compared to a standard statistical model (Rózsa et al. 2000). This estimative is the statistical parameter that have been used to compare ancient with modern parasitological data (Rácz et al. 2015; Reinhard & Buikstra 2003). If ancient parasite distribution in the host population is similar to the parasite distribution found in modern populations, then we can consider that both epidemiological sceneries are probably equivalent with similar determinants of infection (Reinhard & Buikstra 2003). As a consequence, with this approach, we attempt to demonstrate that archaeological data could be comparable with contemporary epidemiological data.

Pinworm is a common parasite in Ancestral Pueblo populations (Reinhard et al. 2016). Variable prevalences are observed in sites from early (Basketmaker II – 100 to 400 AD) to late (Pueblo III - 1020 to 1350 AD) occupations, which were associated by Hugot et al. (1999) with the architecture styles used by these populations through time. The researchers' hypothesis was that small villages with no stonewall constructions (Basketmaker II) would have the lowest pinworm prevalences, while large villages with stonewall constructions inside

caves (Pueblo III) would have the highest (Hugot et al. 1999). Turkey Pen Cave, located in Grand Gulch, Utah, a Basketmaker II site had 29% of pinworm prevalence. Salmon Ruins, located in Bloomfield, New Mexico, a Pueblo II to Pueblo III site presented 8% of pinworm prevalence. These sites represent a contrast to this hypothesis (Reinhard 2008).

The estimation of prevalence of infection is based on the application of quantification method that helps not only to assess this parameter, but also provides egg per gram of coprolite. Thus it turns possible to apply parasitological statistics in order to study the impact of infection in ancient populations (Reinhard & Buikstra 2003). The quantification method applied in all Ancestral Pueblo sites involved the addition of *Lycopodium* tablets and the microscopic analyses in which parasites eggs and spores were counted (Reinhard 2008; Reinhard et al. 1987). As previous standardized pattern of quantification, a minimum of 25 *Lycopodium* spores was quantified together with parasite eggs. After the achievement of this number of spores, coprolite analysis is interrupted and the sample is identified as positive or negative for parasites. Morrow (2016) tested different minimum values of *Lycopodium* spore quantification, 25, 50, 100, 200 and 500 in order to verify the accuracy of the positive and negative samples detected. Samples quantified using 25, 50 and 100 minimum values of *Lycopodium* spores yielded differences in the number of positive and negative samples for parasite egg. However, when quantification was based on 200 and 500 minimum spore count, the same values of positive and negative samples were reported. Positive and negative sample values are translated into frequency of infection/prevalence estimation. For this reason, Morrow (2016) suggested the minimum value of 200 *Lycopodium* spores quantification in order to provide the more precise prevalence of infection in archaeological sites. Based in Morrow's (2016) conclusion, we hypothesized that prevalence numbers estimated for pinworm infection in Ancestral Pueblo sites are underestimated.

Considering these arguments, we investigate the pathoecology of pinworm infection in Turkey Pen Cave and Salmon Ruins by applying the new *Lycopodium* quantification approach. Thus, we verify if Hugot et al. (1999) hypothesis on pinworm infection is valid for Ancestral Pueblo sites. Samples from two latrines of Aztec Ruins (Rooms 219 and 225), a Pueblo III occupation site never studied before, are also analyzed. Descriptive and comparative parasitological statistical parameters were calculated in order to discuss the epidemiological impact of pinworm infection in these populations.

Materials and Methods

Human coprolites from three Ancestral Pueblo archaeological sites, dated from different periods of time, were analyzed in the present study. Turkey Pen Cave is located in Grand Gulch, Utah (Figure 1). It represents the first period of Ancestral Puebloan occupation, known as Basketmaker II, and it is dated between 0 - 100 years AD (Anno Domini). This site is characterized by a rock shelter and the Ancestral Puebloan population was already relying on maize horticulture as the main diet source (Matson & Chisholm 1991). Thirteen coprolites were collected from this site. On the other hand, Salmon Ruins and Aztec Ruins (Figure 1) represent a more recent occupation and were built by the Chaco Culture between 1000 – 1200 years AD, when the Late Pueblo II and Early Pueblo III were present in this region (Gwinn Vivian & Hilpert 2012).

Salmon Ruins is a Chaco outlier community located by the San Juan River, in Bloomfield, New Mexico. It is composed by several small ruins and a Great House that had 150 rooms in the ground-floor and nearly 100 rooms on the second floor (Figure 2). It was built between 1088 – 1100 AD and abandoned by the Chaco occupation around 1130 AD (Gwinn Vivian & Hilpert 2012). A second Mesa Verde Ancestral Puebloan occupation began at 1180 AD. This population remodeled most of the Great House construction and used it as burial place, storage, ritual place and latrine (Gwinn Vivian & Hilpert 2012). For this study, 67 coprolites were collected from one remain latrine, room 62W (Figure 2).

Aztec Ruins is the largest Chaco outlier community and it is located in the junction of the San Juan and Animas Rivers, in Aztec, New Mexico. It is a complex of ruins, in which the West Ruin, a Great House with 400 rooms is the best studied and excavated (Figure 3). For reasons that are not clear, the Chaco population abandoned Aztec Ruins by 1275 AD and a second occupation by a Mesa Verde population is, after this period, evidenced by ceramics and burials. The second occupation population used the West Ruin as a burial, storage, ritual place and latrine (Gwinn Vivian & Hilpert 2012). Until now, archaeologists found two latrines, rooms 219 and 225, from which 21 and 22 samples were collected, respectively. In this study, samples from these latrines were analyzed separately, as representative of two populations. Future dietary analyses will clarify if these latrines were used by the same population or by different ones or if they were used by different groups in the same population.

Individual protection equipment and disposable material were used to collect coprolites individually, in order to avoid contamination. Coprolites were stored in individual airtight plastic bags in environmental temperature and transported to the Palynology Lab, School of Natural Resources, University of Nebraska, Lincoln, USA. At the lab, samples were weighed at a scale and 1g - 5g of coprolites were selected for analyses. Samples were rehydrated in 0.5% trisodium phosphate (Na_3PO_4) aqueous solution during 24 hours (Callen & Cameron 1960). During this process, one *Lycopodium* tablet, containing approximately 12500 spores (Batch No. 12496), was added for each gram of coprolite, for quantification. Two-hundred microliters of 40% hydrochloric acid (HCl) were added to enable the tablets and some of the mineralized coprolites to dissociate (Reinhard et al. 2008).

After the rehydration process, each sample was vortexed during 40 seconds and immediately poured through a 250 μm mesh placed in a 50ml beaker, in order to separate the macro from the microresidues. Distilled water and a metal spatula were used to disaggregate the macroresidues in the mesh. Alcohol was poured to avoid microorganisms proliferation. The macroresidues were placed in a filter and dried at room temperature. After this process, each sample microresidue was stored in individual airtight plastic bags for future analyses. The microresidues in the beakers were pipetted into 50ml graduated plastic tubes with screw caps. Drops of each sample were pipetted to microscope slides, mixed with glycerin and cover-slipped. The slides were analyzed at 100x and photographs were taken at 400x magnification. A minimum of 200 *Lycopodium* spores was quantified for each sample, along with any parasite eggs found during these analyses (Morrow 2016).

To calculate eggs per gram (EPG) of coprolite, we applied the formula (modified for parasite eggs) (Pearsall 2016): $\text{EPG} = [(p/m) \times a]/v$, where **p** is the number of parasite eggs counted, **m** is the number of *Lycopodium* spores counted, **a** is the number of *Lycopodium* spores added and **v** is the quantity of sample processed. Descriptive and comparative statistics were calculated at the Quantitative Parasitology 3.0 software by using the parameters described by Reiczigel and Rózsa (2005) and Rózsa, Reiczigel and Majoros (2000). For descriptive statistics, prevalence, mean intensity, median intensity, mean abundance and VMR were calculated (Rózsa et al. 2000). To estimate the parasite distribution in each site (population), VMR was calculated and the results interpreted as it follows (Bush et al. 1997): $\text{VMR} < 1$ – underdispersed (binomial distribution), $\text{VMR} = 0$ – not dispersed (constant random variable), $\text{VMR} = 1$ – Poisson distribution, $\text{VMR} > 1$ – aggregated distribution. Prevalence

comparisons between all sites were made by using χ^2 and Fisher's exact test ($P < 0.05$). Comparison between these groups mean intensities and mean abundances was made by applying the Bootstrap test ($P < 0.05$) (Reiczigel & Rózsa 2005; Rózsa et al. 2000).

Results

The results evidenced that Ancestral Puebloans from all the sites studied were infected by *E. vermicularis* and only by this helminth parasite. In Turkey Pen Cave, five of 13 samples were positive, representing 38.5% of prevalence. In Salmon Ruins, 22 of 67 samples (32.8%) had pinworm eggs. In Aztec Ruins room 219, only three of 21 samples (14.3%) were positive, the lowest prevalence found. The higher prevalence, 72.7%, was observed in Aztec Ruins room 225, where 16 samples of 22 were positive. EPG values indicated a high number of eggs in some samples compared to most of the other coprolites analyzed (Figure 3) (Tables 2 – 5).

Pinworm eggs recovered exhibited different degrees of preservation (Figures 4, 5, 6 and 7). All eggs recovered in Turkey Pen Cave samples were extremely well preserved with intact eggshells and visible larvae inside the eggs (Figure 4). In Salmon Ruins most eggs were well preserved, but in eight samples, eggs showed degraded eggshells and no larvae (Figure 5). In Aztec Ruins room 225, preservation was also excellent (Figure 6). However, in Aztec Ruins room 219, pinworm eggs had the worst preservation, with only half egg preserved, and the other eggs with badly preserved eggshells, difficulting the morphological diagnosis (Figure 7).

Descriptive statistics for each site is discriminated in Table 1. Mean intensity results indicate that individuals from Salmon Ruins exhibited a higher parasitic load than the other sites and room 219 the lower, but no significant difference was found. Salmon Ruins also presented the highest median intensity when compared to the other sites, but with no statistical significant difference.

Aztec Ruins Room 225 presented the highest mean number of eggs found in all hosts, based on the estimated mean abundance. Parasite distribution analysis showed substantially aggregation in all archaeological sites. Results demonstrated that VMR values were considerably greater than 1 for all sites (Table 1).

The statistical comparison of prevalences of infection indicated highly significant differences between all sites (χ^2 and Fisher's exact tests, $P = 0.00$). The comparison of the prevalence between the Ancestral Pueblo populations indicated statistically significant

differences for some sites. Aztec Ruins Room 225 prevalence was significantly different when compared with Room 219 and Salmon Ruins (χ^2 and Fisher's exact test, $P=0.00$), but not with Turkey Pen Cave (χ^2 , $P=0.05$; Fisher's exact test, $P=0.07$). Comparisons between Salmon Ruins and Turkey Pen Cave (χ^2 , $P=0.69$; Fisher's exact test, $P=0.75$) and Salmon Ruins and Aztec Ruins Room 219 (χ^2 , $P=0.10$; Fisher's exact test, $P=0.16$) prevalences were not significantly different.

Discussion

This study demonstrates the highest prevalences of pinworm infection found in Ancestral Puebloan populations. The prevalences observed in Turkey Pen Cave (38.5%) and Salmon Ruins (32.8%) were higher than the ones observed in previous studies, especially for Salmon Ruins. This indicates that previous prevalences for these and all other sites studied are possibly underestimated, probably because of the quantification method applied using a minimum of 25 *Lycopodium* spores count.

The standard technique applied to diagnose pinworm infection is the cellophane tape pressed against the perianus region and analyzed under a light microscope. Pinworm females deposit very few eggs in the host intestine, so fecal analysis usually results in false negatives (Roberts et al. 2013). Only 5-10% of the individuals parasitized with *Enterobius vermicularis* show eggs in their feces (Rey 2008; Roberts et al. 2013). In the present study, even with the parasitological analysis of ancient fecal samples, the prevalences significantly exceeded way above the values found in fecal samples from contemporary parasitized individuals.

Descriptive and comparative statistical parameters calculated for all sites demonstrate that for most patterns of infection these sites populations were equally highly infected. To interpret these statistical data it is also important to consider factors that interfere in parasite information, such as taphonomy (Morrow et al. 2016). Most sites present excellent egg preservation, however, Aztec Ruins Room 219's eggs were badly preserved, which suggests that the prevalence observed and in consequence the other statistical parameters probably do not correspond to reality. A more accurate investigation is being made concerning taphonomy and its influences in pinworm egg diagnosis and quantification in these sites.

Prevalences found also indicate that both Basketmaker II (100 – 400 AD) and Pueblo III (1020 – 1350 AD) sites are equally highly infected. Hugot and colleagues (1999) suggested that pinworm infection in Ancestral Pueblo sites was correlated with the architecture style

adopted by each period of occupation, with the early occupations presenting the lowest prevalences and the recent occupations, the highest. Reinhard et al. (2016) also consider this hypothesis. However, in the present study, the results indicate that all periods of occupation and styles of habitation were highly infected by pinworms and consequently this parasite probably represented health problems to these populations. Roberts et al. (2013) describe health problems for highly infected individuals. In this case it can cause ulcerations in the intestine due to the attachment of adults to the tissue leading to inflammation and bacterial infection; damage in the perianal area due to scratching and dermatitis due to the presence of eggs in this region; and complications due to worms migration to the vagina, uterus and oviducts that can cause the formation of granulomas and lead to infertility (Roberts et al. 2013).

The sites studied are located in arid areas that explain excellent preservation in most of them. However, the high prevalence is especially remarkable when one considers that pinworm eggs rapidly die in arid environments. Experimental hatching of eggs after exposure to aridity provided these data: 6 hours drying resulted in 67% viability, 12 hours produced 53% viability, 24 hours produced 33% viability, 2 days produced 22% viability, three days produced 15% viability, and five days produced 0% viability (Hulínska 1974). Pinworms retain higher viability in humid climates and are susceptible to desiccation induced egg death in aridity. In arid climates, pinworm eggs need to achieve the host before inevitable desiccation. Therefore, the Pueblo persistent pinworm parasitism had to have involved infection that overcame in some way the egg susceptibility to desiccation.

Humidification of habitations could have been a key feature that promoted pinworm transmission. The increased humidity of rooms, compared to the surrounding desert, can be felt in intact rooms such as those along the back wall of Aztec Ruin. It would be worthwhile to measure the humidity within these rooms compared to the outside humidity to get a baseline figure for the inherent potential of Pueblo room construction in humidifying the Pueblo environment. The humidity trapped in multistoried Pueblos of 100 rooms could have been substantial. Rooms used for communal activity such as kivas, mealing rooms, cooking areas and sleeping areas could have made ideal pinworm nidi.

At the peak of its occupation, Salmon Ruins had 300 people living in the Great House which have approximately 250 rooms. Not all of the rooms were used as habitation, since they also had ritual, burial and storage functions. This fact leads us to presume that people

congregated in these rooms, thus facilitating the air-borne kind of transmission. Rituals happened in plazas or in kivas (round underground constructions). Time spent inside a kiva probably contributed to pinworm spread infection in this population. The same can be said about Aztec Ruins, despite the second occupation did not use the West Ruins Great House as habitation. At this site it was established an occupation between 700 – 1000 people (Lister & Lister 1987). The ritual constructions continued to be used, thus facilitating pinworm transmission and maintenance.

Other factors that need to be discussed are the hygiene habits adopted by these populations. Previous observed pinworm prevalence for Salmon Ruins raised this discussion. Pinworm epidemiology is correlated to temperate climate and to hygiene habits. Bathing and frequency of clothing change are cited as protective against pinworm infection (Rey 2008). In Salmon Ruins, Bohrer (1980) speculated on the production of soaps by Salmon Ruins inhabitants using *Yucca* roots. All other components of this plant were found in this site, except for the roots, thus leading to this hypothesis. The higher pinworm prevalence found in the recent study suggests that hygiene habits were maybe not as good as we thought, at least considering pinworm transmission. Maybe this population simply chose to use *yucca* roots for other purpose or not to use it at all. The fact is that the conception of hygiene in this population was modified by the recent study.

We believe that earlier Basketmaker II pithouses would have served as nidi for infection as described for kivas. The pithouses, like kivas, were designed to promote air circulation via smoke holes, deflectors and air drafted in from the antechamber. As habitations for extended families, these structures would have made all people susceptible to airborne and person-person contact.

The VMR analysis indicates that pinworms were aggregated in these Ancestral Pueblo populations. This distribution is generally found in modern parasitological studies (Bush et al. 1997; Crofton 1971; Rózsa et al. 2000) and the identification of the same pattern found in these ancient populations suggests that these data can be compared. This indicates that all environmental and cultural determinants for infection discussed in the present study can be applicable in modern epidemiological studies. These observations mean that possibly other ancient epidemiological studies on other infections could also be considered to help understand the modern epidemiology on emergence and reemergence of infections.

Acknowledgements

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (AMI, grant number 307932/2014-1); Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro, FAPERJ (AMI, grant number CNE 2/2016).

Author's contribution:

Morgana Camacho participated in the coprolite collections, analyzed the coprolites and calculated EPG, prevalences and mean intensity of infection. Alena Mayo Iñiguez participated in the study design, computed parasitological parameters and measures of aggregation, performed statistical analysis calculation and contributed to the data interpretation. Karl Jan Reinhard participated in the coprolite collections, analyzed the coprolites, and contributed to the data interpretation.

References

- Bohrer VL. Salmon Ruin ethnobotanical report. *In*: Irwin-Williams C, Shelly PH, Investigations at the Salmon site: the structure of Chacoan society in the Northern Southwest. Texas: Department of Anthropology, Texas A&M University; 1980. 163-351.
- Bush A, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J Parasitol.* 1997; 83(4): 575-583.
- Callen EO, Cameron TWM. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Sci.* 1960; 8: 35-40.
- Crofton HA. A quantitative approach to parasitism. *Parasitology.* 1971; 62(2): 179-193.
- Doyel DE. Anasazi regional organization and the Chaco system. Vol. I. Albuquerque: Maxwell Museum of Anthropology; 1992. 182 pp.
- Ferreira LF, Reinhard KJ, Araújo A. Fundamentos da Paleoparasitologia. Vol. I. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2011. 484 pp.
- Gwinn Vivian R, Hilpert B. The Chaco handbook: an encyclopedic guide. Vol. I. Salt Lake City: The University of Utah Press; 2012. 317 pp.
- Hugot JP, Reinhard KJ, Gardner SL, Morand S. Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. *Parasite.* 1999; 6(3): 201-208.

Hulínska D. Morphogenesis and viability of larvae in the eggs of *Enterobius vermicularis*. *Folia Parasitol.* 1974; 21: 225-232.

Lister R, Lister F. Aztec Ruins on the Animas: excavated, preserved, and interpreted. Vol. I. Tucson: Southwest Parks and Monuments Association; 1996. 120 pp.

Matson R, Chisholm B. Basketmaker II subsistence: carbon isotopes and other dietary indicators from Cedar Mesa, Utah. *Am Antiq.* 1991; 56(3): 444-459.

Morrow JJ. Exploring parasitism in antiquity through the analysis of coprolites and quids from La Cueva de Los Muertos Chiquitos, Rio Zape, Durango, Mexico. [PhD Thesis]. Lincoln: University of Nebraska, Lincoln; 2016. 162 pp.

Morrow JJ, Newby J, Piombino-Mascali D, Reinhard KJ. Taphonomic considerations for the analysis of parasites in archaeological remains. *Int J Paleopathol.* 2016; 13: 56-64.

Pearsall DM. Pollen analysis. *In*: Pearsall DM, Paleoethnobotany, third edition: a handbook of procedures. New York: Routledge Taylor and Francis Group; 2016. 214-225.

Rácz SE, Pucu de Araújo E, Jensen E, Mostek C, Morrow JJ, Van Hove ML, Bianucci R, Willems D, Heller F, Araújo A, Reinhard KJ. Parasitology in an archaeological context: analysis of medieval burials in Nivelles, Belgium. *J Archaeol Sci.* 2015; 53: 304-315.

Reiczigel J, Rózsa L. *Quantitative Parasitology 3.0*. Budapest. 2005.

Reinhard K. Relation of climate to epidemiology of infectious disease among Arctic populations. *Alaska Med.* 1974; 16: 25-30.

Reinhard KJ. Parasite pathoecology of Chacoan Great Houses: the healthiest and wormiest Ancestral Puebloans. *In*: Reed P, Chaco's northern prodigies Salmon, Aztec, and the ascendancy of middle San Juan region after AD 1100. Salt Lake City: The University of Utah Press; 2008. 86-95.

Reinhard KJ, Araújo A, Morrow JJ. Temporal and spatial distribution of *Enterobius vermicularis* (Nemata: Oxyuridae) in prehistoric Americas. *Korean J Parasitol.* 2016; 54(5): 591-603.

Reinhard KJ, Araújo A, Sianto L, Costello JG, Swope K. Chinese liver flukes in latrine sediments from Wong Nim's property, San Bernardino, California: archaeoparasitology of the Caltrans District headquarters. *J Parasitol.* 2008; 94(1): 300-303.

Reinhard KJ, Bryant VM. Pathoecology and the future of coprolite studies in bioarchaeology. *Papers in Natural Resources.* 2008; 205-224.

Reinhard KJ, Buikstra J. Louse infestation of the Chiribaya Culture, Southern Peru: variation in prevalence by age and sex. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98: 173-179.

Reinhard KJ, Hevly R, Anderson G. Helminth remains from prehistoric Indian coprolites on the Colorado Plateau. *J Parasitol.* 1987; 73(3): 630-639.

Rey L. *Parasitologia – Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais.* Vol I. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 883 pp.

Roberts LS, Janovy Jr., J, Nadler S. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' *Foundations of Parasitology.* Vol. I. New York: McGraw-Hill International Edition; 2013. 670 pp.

Rózsa L, Reiczigel J, Majoros G. Quantifying parasites in samples of hosts. *J Parasitol.* 2000; 86(2): 228-232.

Shaw D, Grenfell B, Dobson A. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. *Parasitology.* 1998; 117(6): 597-610.

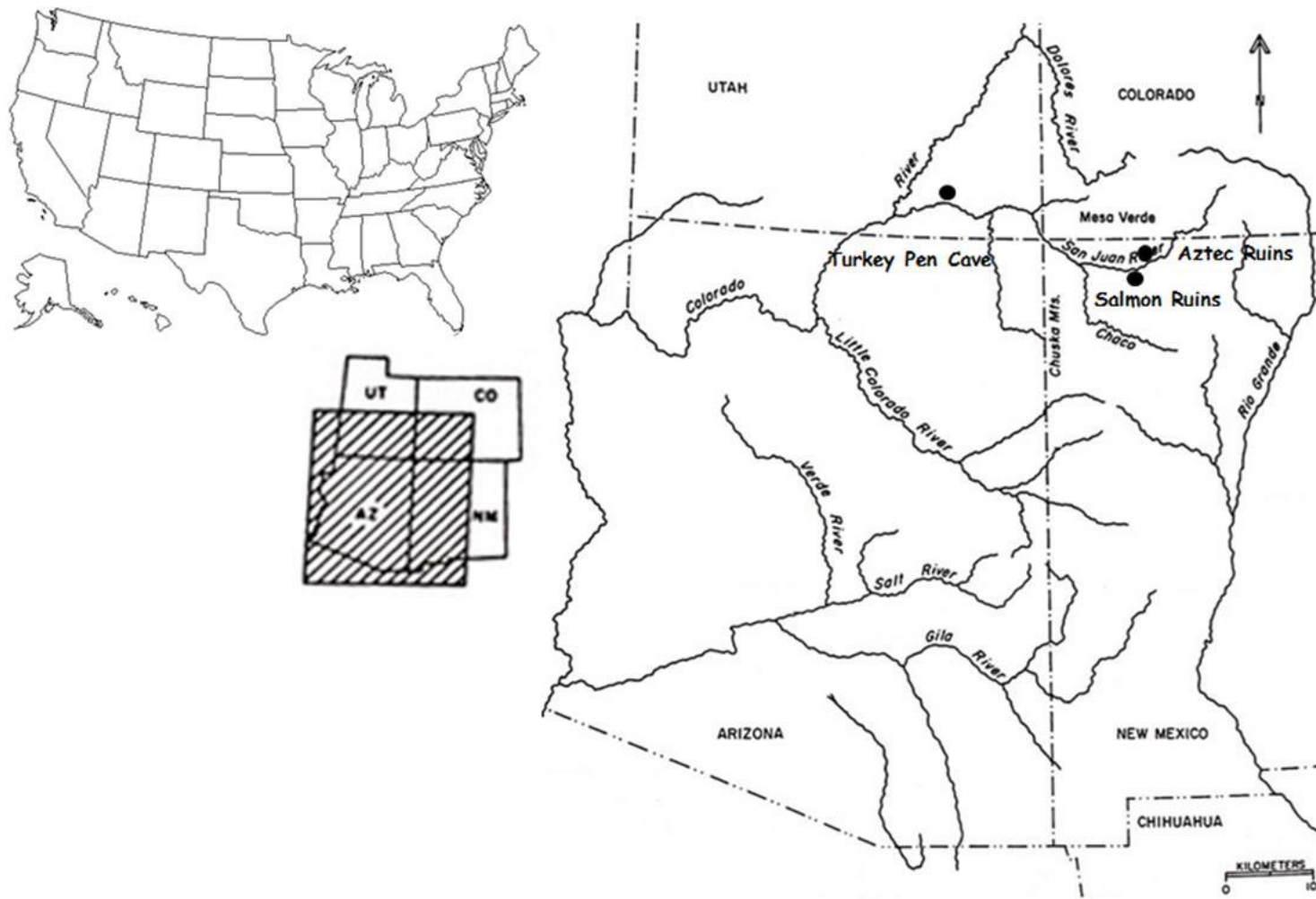
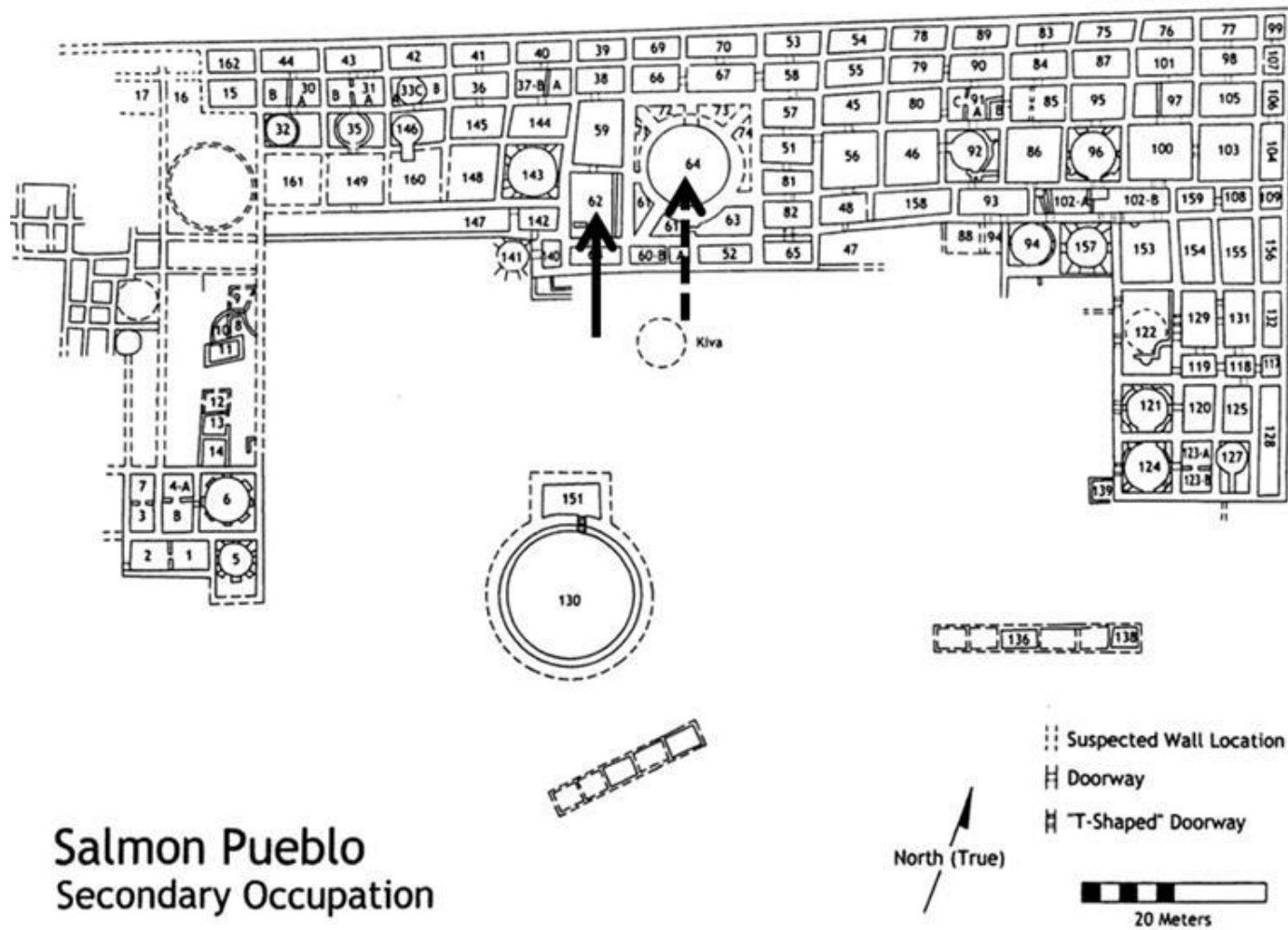


Figure 1 – Map demonstrating the geographical location of Turkey Pen Cave, Salmon Ruins and Aztec Ruins. Modified from Doyel (1992).



**Salmon Pueblo
Secondary Occupation**

Figure 2 – Schematic drawing of Salmon Ruins Great House. The black arrow indicates the only remain latrine, room 62W. The dotted arrow indicates the location of the elevated kiva. Source: San Juan County Archaeological Research Center and Library.

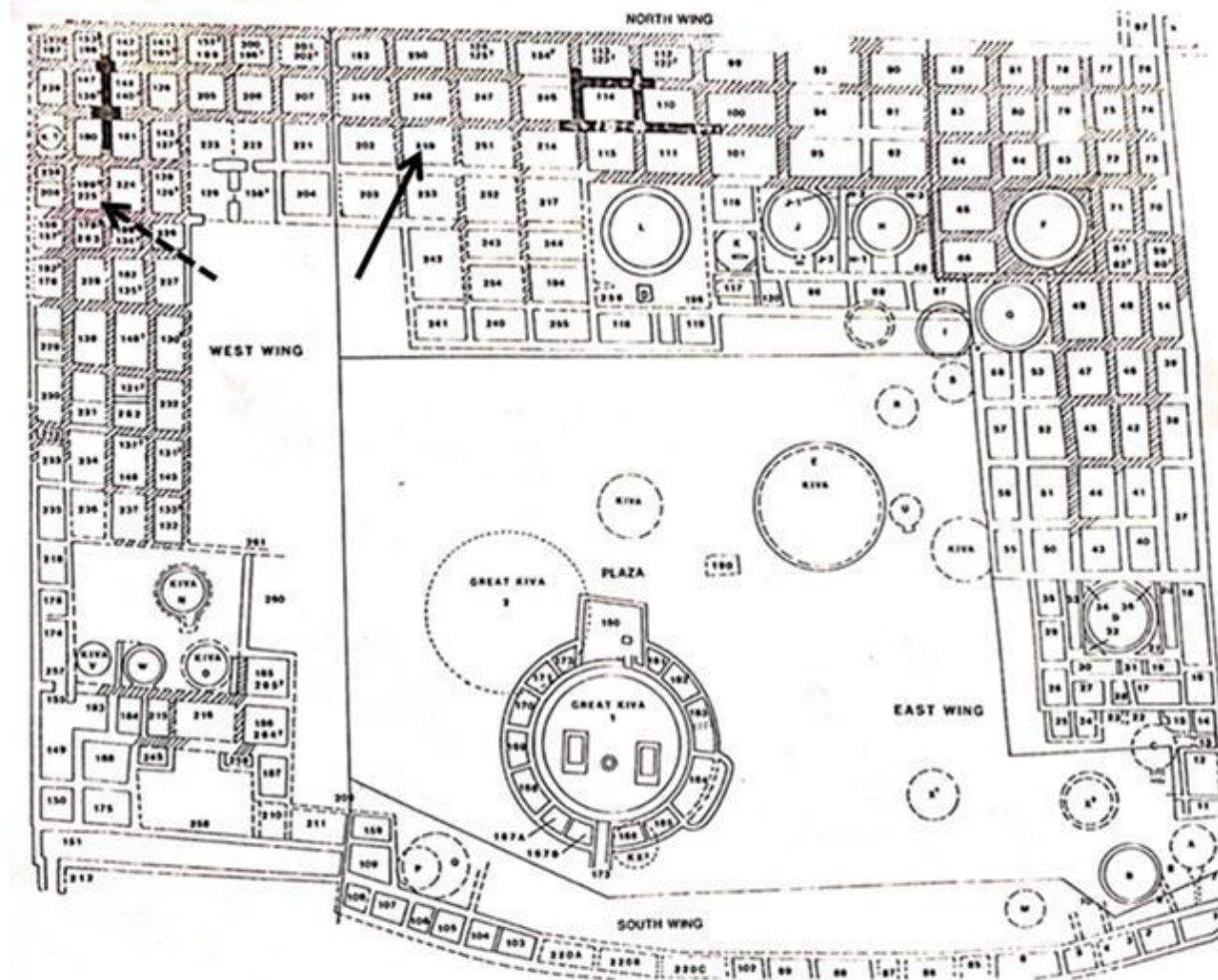


Figure 3 – Schematic drawing of Aztec Ruins West Ruin. The black arrow indicates the location of the first latrine, room 219. The dotted arrow indicates the location of the second latrine, room 225. Source: Aztec Ruins National Monument New Mexico.

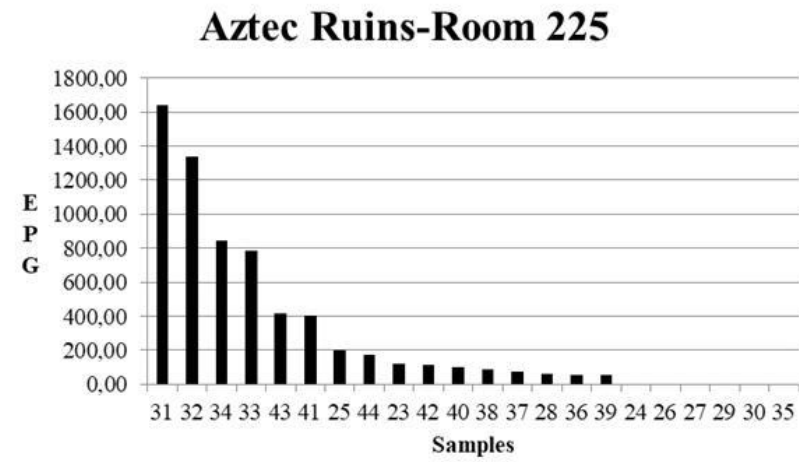
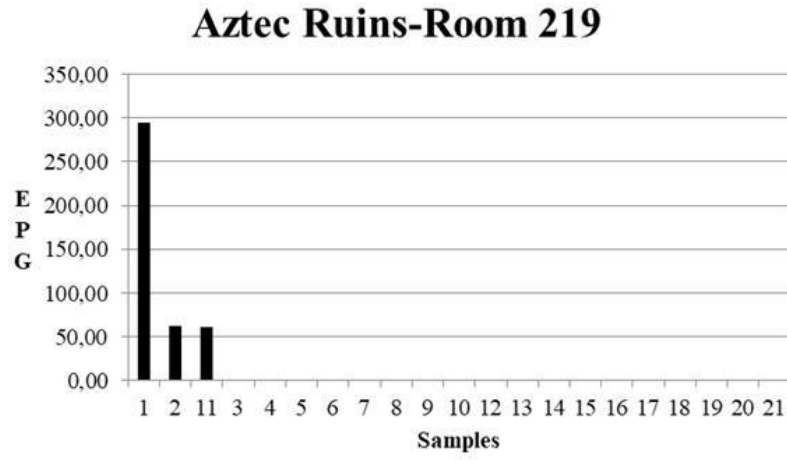
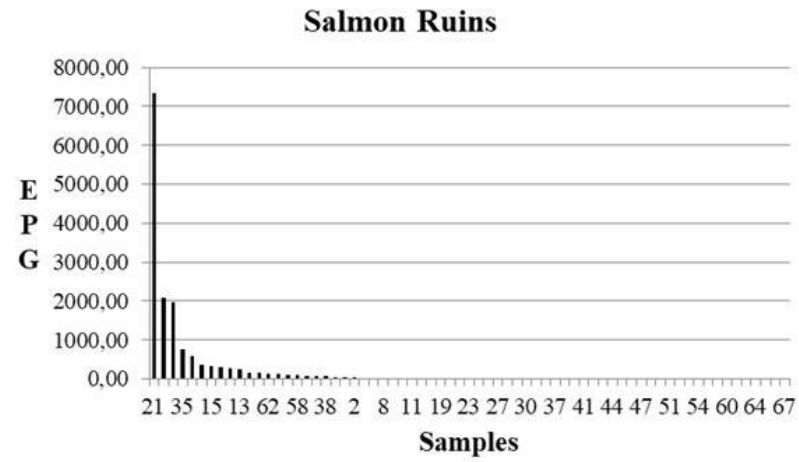
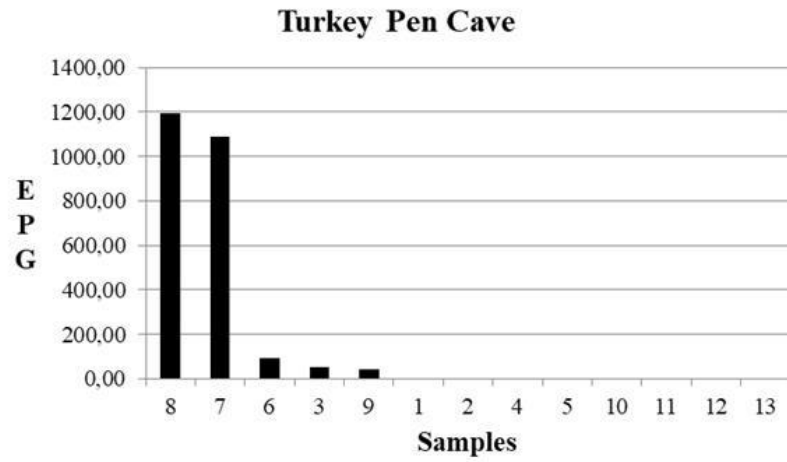


Figure 4 – Egg per gram of coprolite per site in the coprolite samples from this study.

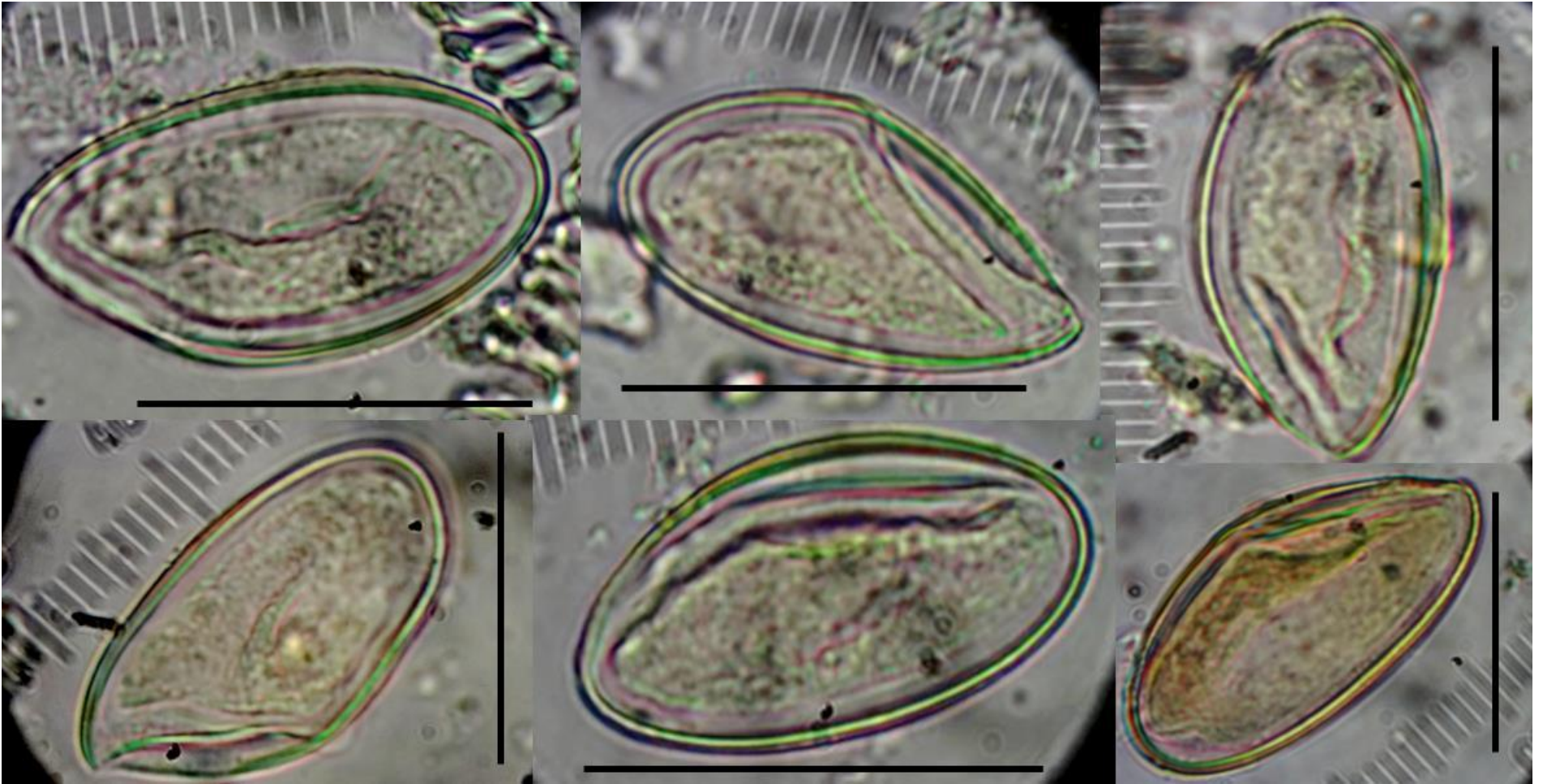


Figure 5 – Pinworm eggs found in Turkey Pen Cave coprolites. Eggs show preserved eggshells and larvae.

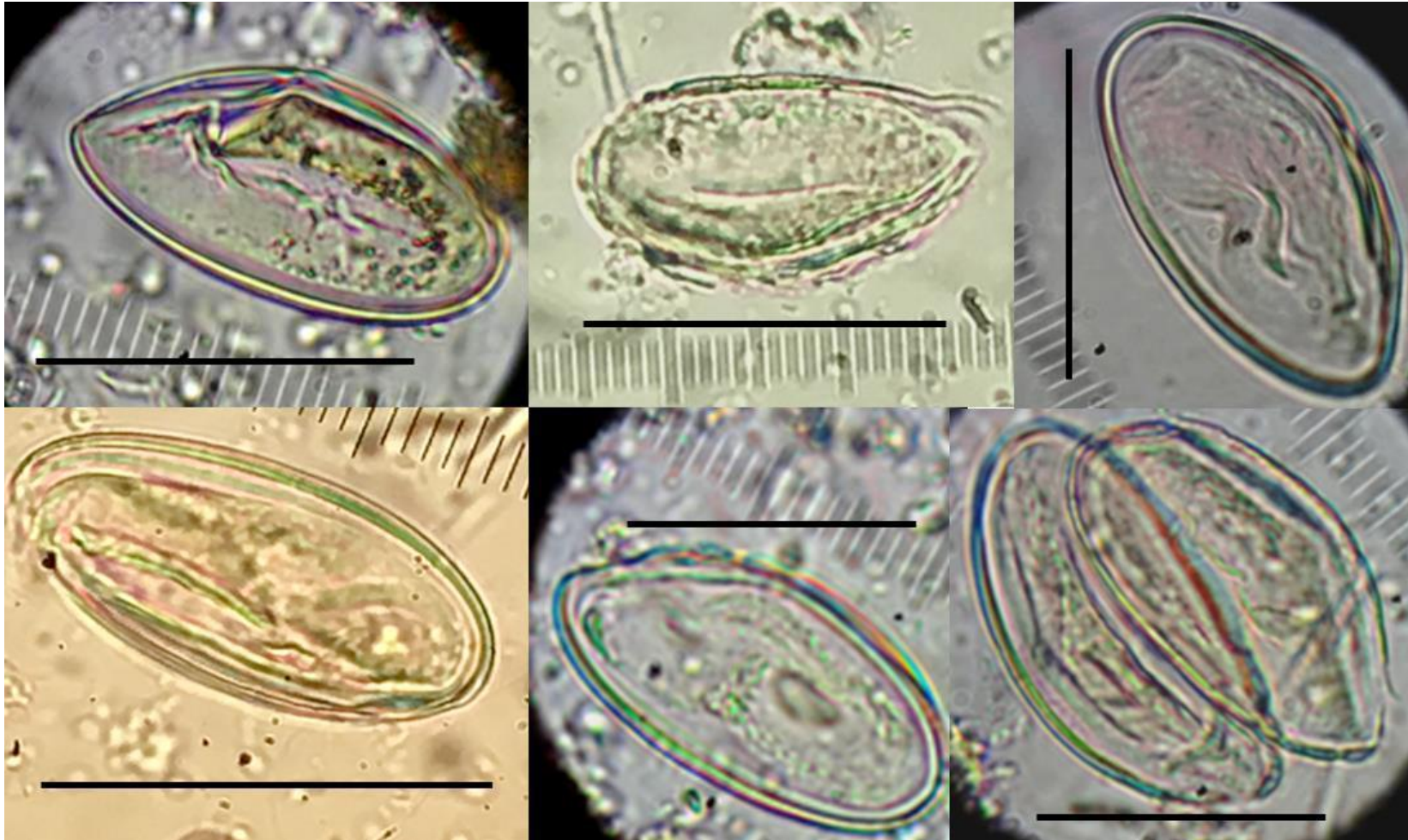


Figure 6 – Pinworm eggs found in Salmon Ruins. Eggs show different degrees of preservation, with some of them with preserved eggshells and larvae and others with eggshells and larvae degraded.



Figure 7 – Pinworm eggs found in Aztec Ruins room 225. Eggs present excellent preservation, with both eggshells and larvae almost intact.



Figure 8 – Pinworm eggs found in Aztec Ruins room 219. Eggs are poorly preserved and one of them is fragmented.

Table 1 – Populational data for all sites studied. Prevalence, Mean Intensity, Median Intensity, Mean Abundance and Variance to Mean Ratio (VMR) data concerning pinworm infection.

Data	Sites			
	Turkey Pen Cave (n=13)	Salmon Ruins (n=67)	Aztec Ruins	
			room 219 (n=21)	room 225 (n=22)
Prevalence	38.5%	32.8%	14.3%	72.7%
Mean Intensity	494.93	701	138.92	403.54
Median Intensity	93.0	166.5	61.0	145.0
Mean abundance	190.492	230.179	19.857	293.545
VMR*	943.03	3961.29	708.29	216.87

*Variance to Mean Ratio

Table 2 – Sample identification and weight, number of *Lycopodium* spores quantified, pinworm eggs recovered and Eggs per Gram (EPG) results for Turkey Pen Cave samples.

Sample Identification	Weight (g)	<i>Lycopodium</i> spores quantified	<i>Enterobius vermicularis</i> eggs	EPG
1	2,06	223	0	0,00
2	2,38	206	0	0,00
3	2,04	224	1	54,71
4	1,01	236	0	0,00
5	1,82	202	0	0,00
6	2,04	264	2	92,84
7	5	298	26	1090,60
8	2	283	27	1192,58
9	1,3	219	1	43,91
10	1,14	261	0	0,00
11	1,92	247	0	0,00
12	0,81	210	0	0,00
13	2,18	232	0	0,00

Table 3 – Sample identification and weight, number of *Lycopodium* spores quantified, pinworm eggs recovered, Eggs per Gram (EPG) results for Salmon Ruins samples.

Sample Identification	Weight (g)	<i>Lycopodium</i> spores quantified	<i>Enterobius vermicularis</i> eggs	EPG
1	2,02	220	3	168,77
2	2,13	220	1	53,35
3	2,13	251	42	1963,98
4	2,07	214	2	112,87
5	2,05	210	0	0,00
6	2,11	207	0	0,00
7	2,03	310	2	79,45
8	2,05	213	0	0,00
9	2	206	0	0,00
10	2,09	212	0	0,00
11	2,05	219	0	0,00
12	2,02	221	0	0,00
13	2,11	244	5	242,79
14	2,01	257	0	0,00
15	2,13	244	7	336,72
16	2,06	222	3	164,00
17	2,02	231	1	53,58
18	2,02	118	20	2097,67
19	2,05	212	0	0,00
20	2	201	0	0,00
21	2,02	123	73	7345,25
22	2,05	221	0	0,00
23	2,02	203	0	0,00
24	2,01	228	1	54,55
25	2,11	211	0	0,00
26	2	201	0	0,00
27	2,05	266	0	0,00
28	2,05	207	0	0,00
29	2,01	202	0	0,00
30	2,01	202	0	0,00
31	2,02	200	6	371,29
32	2,02	211	0	0,00
33	2,01	210	0	0,00
34	2,08	200	1	60,10

35	2	214	13	759,35
36	2,01	205	2	121,34
37	2,09	206	0	0,00
38	2,09	204	1	58,64
39	2,01	204	0	0,00
40	2,01	221	0	0,00
41	2,01	232	0	0,00
42	2	208	0	0,00
43	2	200	0	0,00
44	2	213	0	0,00
45	2	203	0	0,00
46	2	203	0	0,00
47	2	237	0	0,00
48	2,06	211	0	0,00
49	2,01	237	5	262,40
50	2	200	0	0,00
51	2	210	0	0,00
52	2,01	224	0	0,00
53	2,03	248	0	0,00
54	2,03	200	0	0,00
55	2,05	205	0	0,00
56	2,05	208	10	586,30
57	2,04	207	5	296,01
58	2,04	223	2	109,91
59	2,05	216	0	0,00
60	2,03	213	0	0,00
61	2	207	0	0,00
62	2	202	2	123,76
63	2,01	217	0	0,00
64	2	225	0	0,00
65	2	222	0	0,00
66	2,02	212	0	0,00
67	2,04	207	0	0,00

Table 4 – Sample identification and weight, number of *Lycopodium* spores quantified, pinworm eggs recovered, Eggs per Gram (EPG) results for Aztec Ruins room 225 samples.

Sample Identification	Weight (g)	<i>Lycopodium</i> spores quantified	<i>Enterobius vermicularis</i> eggs	EPG
1	1,63	261	2	117,53
2	1,71	241	0	0,00
3	3,02	249	4	199,47
4	3,03	204	0	0,00
5	3,07	201	0	0,00
6	3,02	205	1	60,57
7	3,09	201	0	0,00
8	3,06	240	0	0,00
9	3,14	255	35	1639,19
10	3,12	270	30	1335,47
11	3,11	200	13	783,76
12	3,03	235	16	842,64
13	3,06	221	0	0,00
14	3,08	214	1	56,89
15	2,56	202	1	72,52
16	1,38	203	2	89,24
17	3,12	228	1	52,72
18	3,12	244	2	98,52
19	3,16	235	8	403,99
20	3,01	214	2	116,43
21	3,08	205	7	415,74
22	3,03	216	3	171,89

Table 5 – Sample identification and weight, number of *Lycopodium* spores quantified, pinworm eggs recovered, Eggs per Gram (EPG) results for Aztec Ruins room 219 samples.

Sample Identification	Weight (g)	<i>Lycopodium</i> spores quantified	<i>Enterobius vermicularis</i> eggs	EPG
1	3	212	5	294,81
2	3	204	1	61,27
3	3	212	0	0,00
4	3,05	211	0	0,00
5	3	246	0	0,00
6	3	212	0	0,00
7	3,04	222	0	0,00
8	3	235	0	0,00
9	3	208	0	0,00
10	3,01	217	0	0,00
11	3	206	1	60,68
12	3,01	229	0	0,00
13	3,01	204	0	0,00
14	3,02	202	0	0,00
15	3	228	0	0,00
16	3,01	213	0	0,00
17	3,05	230	0	0,00
18	3,01	220	0	0,00
19	3,03	207	0	0,00
20	3,13	208	0	0,00
21	3,01	249	0	0,00

10 ARTIGO 3 - TAPHONOMIC CONSIDERATIONS ON PINWORM PREVALENCE IN THREE ANCESTRAL PUEBLOAN LATRINES. SUBMETIDO AO JOURNAL OF ARCHAEOLOGICAL SCIENCE REPORTS

Taphonomic considerations on pinworm prevalence in three Ancestral Puebloan latrines.

Morgana Camacho^{a,b}, Alena Mayo Iñiguez^{b*}, Karl Jan Reinhard^{c*}

^aEscola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões 1480, Manguinhos, 21041-210, Rio de Janeiro, Brasil.

^bLaboratório de Biologia de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Avenida Brasil 4365, Manguinhos, 21040360, Rio de Janeiro, Brasil.

^cPathoecology Laboratory, School of Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, Nebraska, 68583-0962, USA.

Email addresses: morganacamacho88@gmail.com, alena@ioc.fiocruz.br, kreinhard1@mac.com

Corresponding author: alena@ioc.fiocruz.br

Abstract

For archaeological studies it is always necessary to consider taphonomic factors that could have influenced on ancient material preservation. Parasite eggs are usually highly degraded in ancient sites dated from all periods of time and taphonomic factors are mentioned to explain absence and low quantity of eggs found. In this study, we compare parasite egg recovery of three Great House latrines: two from Aztec Ruins (rooms 219 and 225) and one from Salmon Ruins. We compared through statistical regression the recovery of eggs with the abundance of two classes of decomposers: nematodes and mites. These microorganisms have relation with nematode larvae and parasites eggs degradation in mostly in moist environments. Pinworm was the only parasite found. Prevalences were 32.8% at Salmon Ruins, 72.7% at Aztec Ruins room 225 and 14.3% at room 219. Egg preservation was considered good at Salmon Ruins and Aztec Ruins room 225. At room 219, the eggs were badly preserved and there was a significant statistical correlation with

mites (multiple $r(18) = 0.64/P=0.002$). This correlation could indicate that mites could be involved in preservation, and consequently that pinworm prevalence in this latrine is underestimated. Considering the extreme egg degradation at latrine 219, it is not possible to strictly compare parasite data with other Ancestral Pueblo sites, even with room 225, located at the same site. Room 225 prevalence is the highest found in Ancestral Pueblo prevalence until now. Taphonomic analysis shows that decomposers operated at different levels of severity, despite the latrines' close location.

1. Introduction

Taphonomy was firstly defined by (Efremov, 1940) as the study of all of aspects involved in the transition of animal remains from the biosphere into the lithosphere. Anthropologists, study the degradation of biological remains after they are deposited in archaeological context (Sorg and Haglund, 2002). After the death of any given organism, it becomes a new microenvironment, serving as a food source for several decomposers. The action of these decomposers and the assimilation of the resources provided by the organism deposited in a local, depend on factors such as climate, humidity, pH, soil, and others that impact on the intensity of the degradation (Lyman, 2010; Sorg and Haglund, 2002).

The taphonomy of parasite remains in archaeological materials has been addressed by some authors beginning with (Reinhard et al., 1986). In this study, the authors evaluated aspects of sample processing, sediment pH and fungal action in degrading parasite eggs. They found that fungal proliferation can degrade eggshells and embryos, thus compromising parasitological diagnosis in ancient material. More recently, parasite egg taphonomy was addressed in Morrow et al. (2016; 2014) and Rácz et al. (2015) papers. They mentioned specific characteristics of eggs morphologies and environmental conditions that make certain egg more susceptible to decay than others. The factors they discussed included water saturation of sediments and humidity as main factors that can result in differential species preservation, even in samples from the same site (Morrow et al., 2016, 2014; Rácz et al., 2015).

Morrow et al. (2016) define five sets of factors that can destroy parasite eggs: abiotic, contextual, anthropogenic, organismal and ecological. Abiotic refers to temperature, soil, pH, humidity and other non-living factors. Contextual refers to the archaeological material that was

analyzed to obtain the parasitological information. Anthropogenic refers to the human manipulation of the parasite source from the moment of its deposition until the collection, transportation and analysis by the researcher. Organismal refers to the individual biological characteristics of each parasite, like egg resistance, fecundity and life cycle. Ecological, refers to the decomposer organisms that are part of the environment from which the archaeological material for parasites came from.

Ancestral Pueblo archaeological sites exhibit excellent coprolite preservation (Reinhard, 2008; Reinhard and Bryant, 2008). These sites are located in dry environments, recognized as one of the best places to preserve parasite remains (Reinhard et al., 1986). Among the sets defined by Morrow et al. (2016), the Organismal and Ecological conditions are the most relevant to the study in these sites. Organismal conditions to be considered involve the resistance of thick-walled eggs such as whipworm compared to thin-walled eggs such as pinworm (Jaeger and Iñiguez, 2014). Hatched nematode larvae, such as those from hookworms, are most susceptible to decay. Ecological conditions to be considered include decomposer organisms such as free-living nematodes, mites, fungi, bacteria and insects. The taphonomy experience as of 2012 was summarized by Reinhard who wrote “In our combined experience there is significant decomposition of remains from latrines by fungi and arthropods as described by Reinhard et al. (1986). In contrast, coprolites exhibit the best preservation. Mummies (Reinhard and Urban, 2003) and sediments from sacra (Fugassa et al., 2008) also show excellent preservation of delicate eggs” (Reinhard et al., 2013).

From Ancestral Pueblo sites, coprolites have been recovered from caves and open site latrines (Reinhard, 2008). For many years, researchers have noticed that pinworm eggs from open sites are more poorly preserved than those recovered from caves. This was especially true for Chaco Great House latrines (Reinhard, 1992; Reinhard and Clary, 1986). Mites are arachnids, usually microscopic that possess mouthparts specialized to the feeding habit (Roberts et al., 2013a). These are organismal taphonomic factors that are frequently seen in Ancestral Pueblo coprolite samples (Reinhard et al., 2012). Mites have been associated to free-living nematode predation. Experimental studies concluded that some mites show predation preference for nematode larvae (Epsky et al., 1988; Martikainen and Huhta, 1990; Muraoka and Ishibashi, 1976; Read et al., 2006; Santos et al., 1981). Despite this relation, the role as taphonomic factor that

interfere in parasite egg preservation and a statistical correlation between the presence of mites and egg degradation is not yet established in the literature.

Nematode larvae are also frequently found in Ancestral Pueblo coprolite samples (Paseka, 2010). In the literature, some nematode larvae are associated with soil protozoans' decomposition (Georgieva et al., 2005), but there is no record of its relation with parasite egg degradation. In order to verify the probable interference of mites and nematode larvae in parasite egg degradation, in this study, the recovery of pinworm eggs in three Great House latrines was compared relative to mites and nematode larvae per gram of coprolite.

2. Materials and Methods

Coprolites from Salmon Ruins and Aztec Ruins Ancestral Pueblo archaeological sites were collected to perform this study (Figure 1). Salmon Ruins and Aztec Ruins represent relatively recent occupations of the Chaco Culture and are dated between 1000 – 1200 years Anno Domini (AD), period when the Pueblo II and Pueblo III were present in this region (Gwinn Vivian and Hilpert, 2012).

Salmon Ruins is identified as a Chaco outlier community and it is located by the San Juan River, in Bloomfield, New Mexico (Figure 1). The main ruin is a Great House built with almost 250 rooms and two story-high (Figure 2 A). It was built in relatively short time, between 1088 – 1100 AD, and abandoned by the Chacoan occupation by the year 1130 AD. The Great House was occupied a second time by Mesa Verde Ancestral Puebloans after 1180 AD leading to the remodeling of the site. In the second occupation, the population used the Great House as a burial place, storage, ritual place and latrine (Gwinn Vivian and Hilpert, 2012). The site used to have three latrines. However, two of them were destroyed due to a fire. Room 62W is the last remaining latrine where 67 samples were collected for this study.

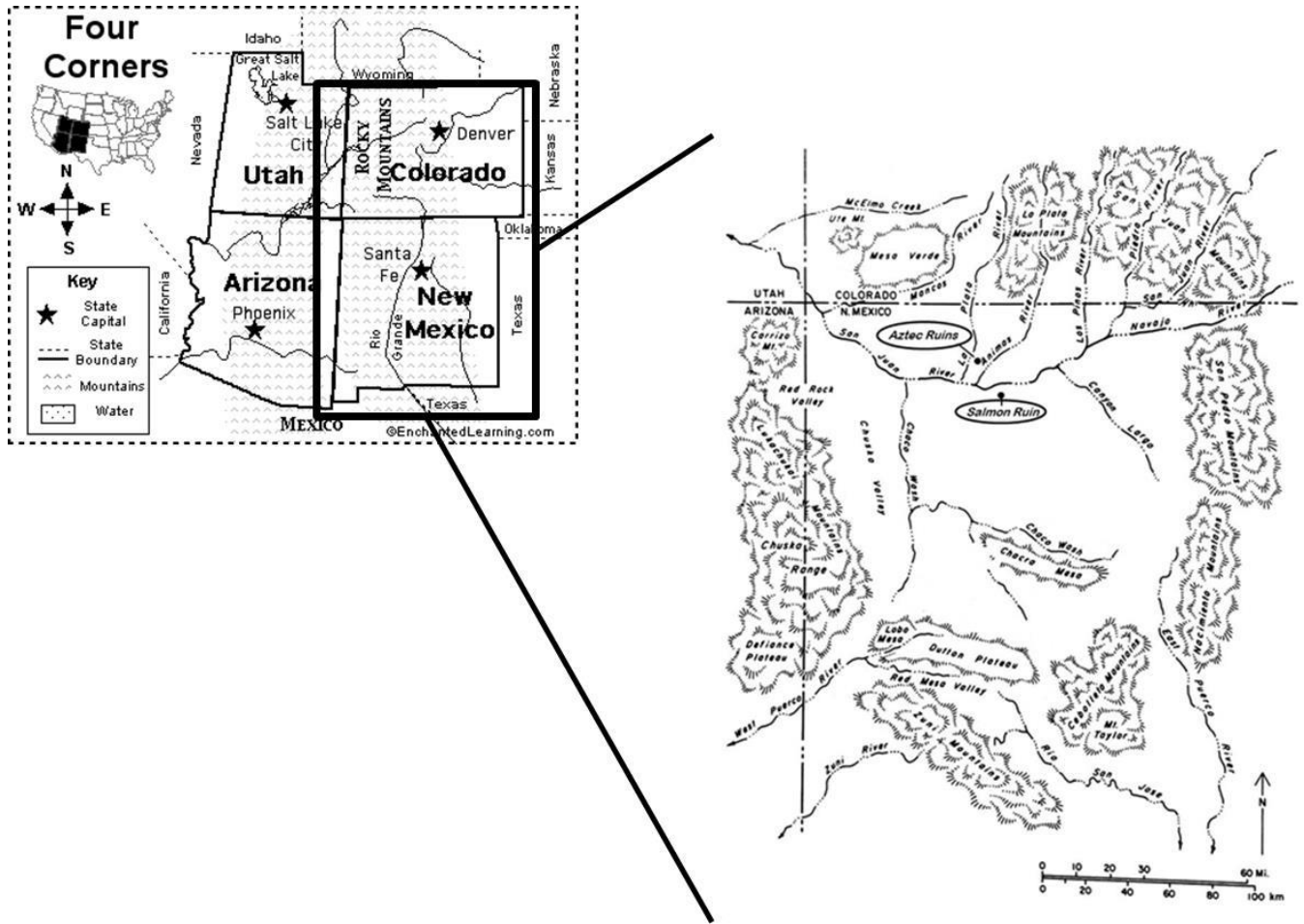


Figure 1 – Geographical location of Aztec Ruins and Salmon Ruins. Modified from Gwinn Vivian (1990).

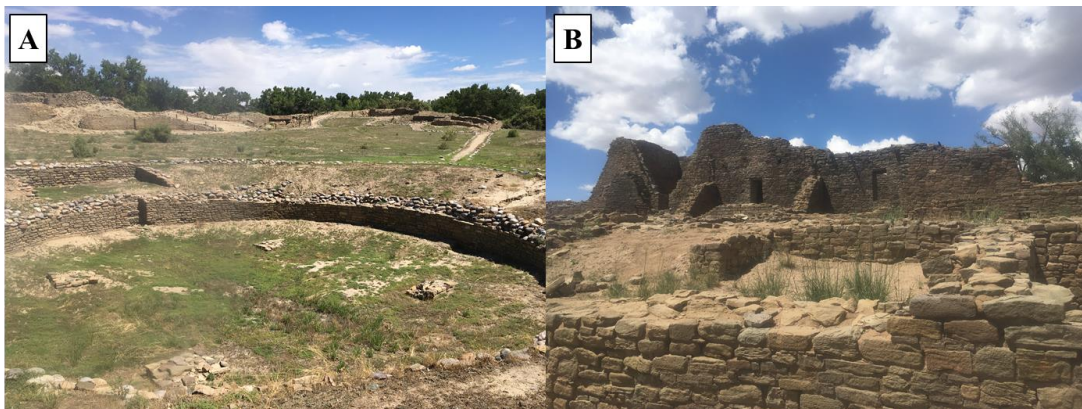


Figure 2 – (A) View of the remaining ruins of Salmon Ruins; (B) the remaining ruins of Aztec Ruins. Photos: Morgana Camacho by visiting the site

Aztec Ruins is an archaeological Ancestral Pueblo site located near the Animas River in Aztec, New Mexico (Figure 1). It was originally built by the Chaco Canyon Culture, between 1000 -1200 years AD. It is considered as a Chaco outlier community characterized by a set of constructions. The larger and most studied of these constructions is the West Ruin, a Great House with 400 rooms, used by this population as a regional administrative and religious center (Figure 2 B). These constructions were abandoned by the Chacoans around 1275, for unknown reasons. After the abandonment, Mesa Verde Ancestral Puebloans migrated to this complex and occupied the ruins. These Ancestral Puebloans used the West Ruin as ritual and burial place, to store their agricultural produce and as latrine, but not as habitation. The Mesa Verdean occupation is signaled by the several ceramic styles and burials found in the West Ruin. Archaeologists identified 2 latrines, rooms 219 and 225, dated from the second occupation period (room 219 - 1182-1250 AD/room 225 - 1185-1253 AD) (Schillaci and Stojanowski, 2002; Gwinn Vivian and Hilpert, 2012).

Coprolite samples from both latrines were collected to perform this study. Twenty-one samples from room 219 and 22 samples from room 225. The samples were collected using disposable materials and tools for each coprolite as well as personal protection equipment. The coprolites were stored in individual airtight plastic bags and transported at environmental temperature to the Palynology Lab, School of Natural Resources, University of Nebraska, Lincoln, USA, for further analysis.

Samples were weighed in scale and 2g - 3g of each coprolite was selected for process. Samples were rehydrated in 0.5% trisodium phosphate (Na_3PO_4) aqueous solution during 24 hours in individual plastic tubes with screw caps (Callen and Cameron, 1960). During this process, one *Lycopodium* tablet containing 12500 spores (Batch No. 12496) was added for each gram of sample, for quantification (Reinhard, 1991). Two-hundred microliters of 40% of hydrochloric acid (HCl) were added to enable the dissolution of the tablets and the dissociation of some mineralized coprolites (Reinhard et al., 2008).

After the rehydration, the tubes were vortexed for 40 seconds and the samples were immediately washed through 250 μm mesh placed in 50ml beakers, in order to separate the macro from the microresidues. Distilled water jets and a metal minispatula were used to disaggregate the

macroresidues retained in the mesh. Alcohol was added to the samples avoid microorganisms proliferation. The macroresidues were transferred to individual filter papers, left to dry at environmental temperature and stored in airtight plastic bags for future analyses.

The microresidues in the beakers were pipetted and transferred back into the tubes. Drops of each sample were pipetted to microscope slides, mixed with glycerin and cover-slipped. The samples were analyzed in a light microscope at 100x and photographs were taken at 400x magnification. A minimum of 200 *Lycopodium* spores was quantified for each sample, along with parasite eggs (Morrow, 2016), mites and nematode larvae.

To calculate the eggs, mites and nematode larvae per gram of coprolite (EPG/MPG/LPG), the following formula was applied (Pearsall, 2016): $EPG = [(p/m) \times a]/v$, where **p** is the number of parasite eggs counted, **m** is the number of *Lycopodium* spores counted, **a** is the number of *Lycopodium* spores added and **v** is the quantity of sample processed. A statistical regression was applied in order to establish the possible positive correlation between the egg degradation and mites/larvae per gram of coprolite. The correlation was made by comparing the EPG data separately with the MPG data and then with the LPG data. Samples that were negative for mites and larvae were excluded from the analysis.

3. Results

Pinworm was the only parasite recovered from all the analyzed coprolites. In Salmon Ruins, 22 of the 67 samples were positive, representing 32.8% of prevalence. Aztec Ruins showed extremely different results, when comparing the two latrines. At Room 219, three of the 21 samples were positive for *Enterobius vermicularis* eggs while at room 225, 16 of the 22 samples had eggs of this parasite, with prevalences of 14.3% and 72.7%, respectively. Egg preservation was variable at the sites. In Salmon Ruins eggs were generally well preserved, however, eggs exhibited degradation of eggshells and absence of larvae in eight samples (Figure 3 A – F). In Aztec Ruins room 219, pinworm eggs were badly preserved with highly degraded eggshells, no larvae preserved and one of the eggs was only half preserved (Figure 4 A – C). In Aztec Ruins room 225 preservation was excellent, with both eggshells and larvae intact (Figure 5 A – F).

There was a variety of mites and larvae, demonstrated in Figures 6 and 7. In Salmon Ruins, 62 samples had mites and only four of the 67 samples had larvae. In Aztec Ruins Room 219, 20 samples had mites and only three from 21 samples had larvae. In Aztec Ruins Room 225, 15 samples had mites and 14 from 22 samples had larvae. Estimation of eggs, mites and larvae per gram of coprolite (EPG/MPG/LPG) for Salmon Ruins and Aztec Ruins Rooms 219 and 225 are shown in Tables 1 – 3. Statistical regression was applied in order to establish the positive or negative correlation between egg degradation and the number of MPG and LPG. For Salmon Ruins (multiple $r(60)=0.09/P=0.442$) and Aztec Ruins room 225 (multiple $r(13)=0.26/P=0.341$) the correlation between pinworm egg degradation and mites per gram of coprolite was not statistically significant. However there was a statistically significant correlation between egg degradation and MPG in Aztec Ruins room 219 (multiple $r(18) = 0.64/P=0.002$).

The correlation between egg degradation and the number of LPG of coprolite was calculated only for Aztec Ruins 225, since in Salmon Ruins and Aztec Ruins Room 219 only a few samples presented larvae. However, this correlation was not statistically significant at Aztec Ruins room 225 (multiple $r(12)=0.13/ P=0.635$).

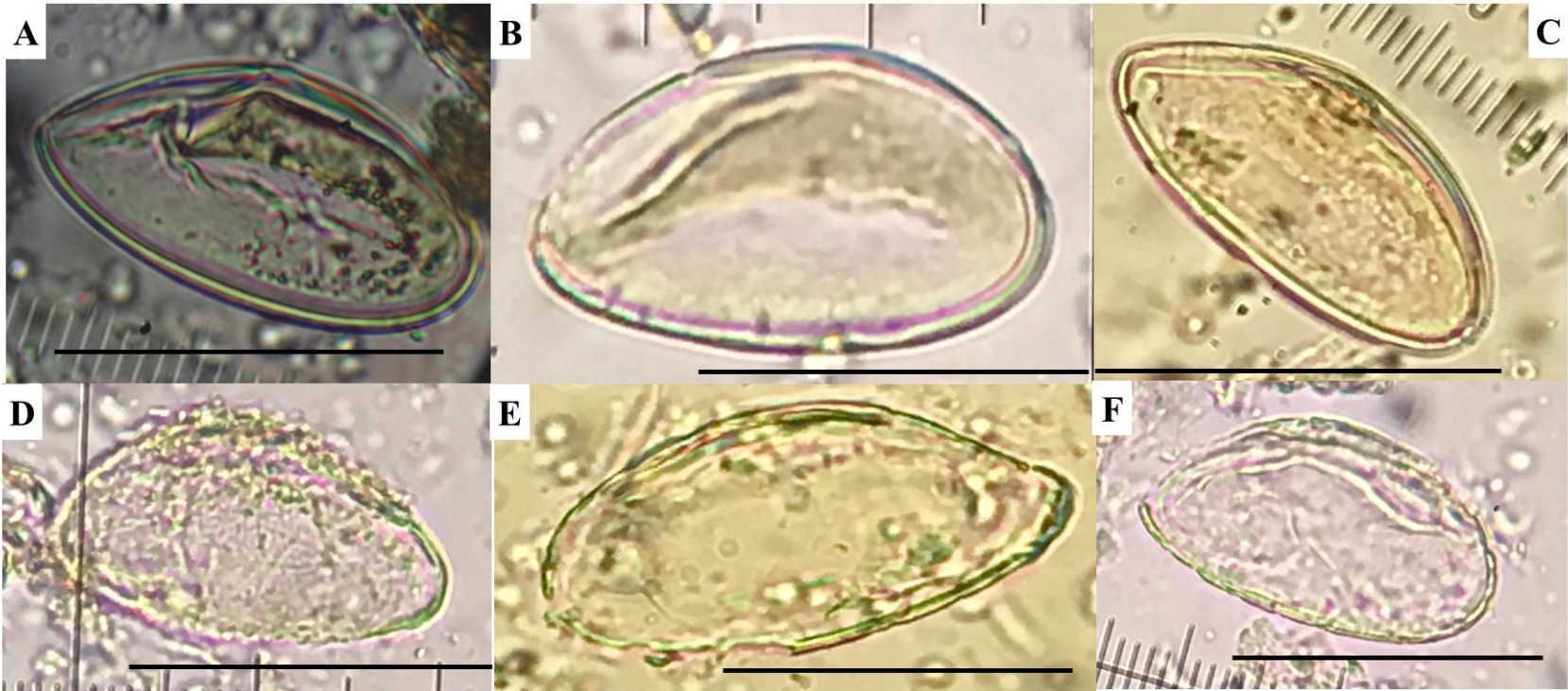


Figure 3 A - F – Pinworm eggs recovered from Salmon Ruins. A - C: Eggs with excellent preservation, showing preserved eggshells and larvae C and D: Eggs with some level of degradation showing degraded eggshells. Scale-bar=50 μ m.

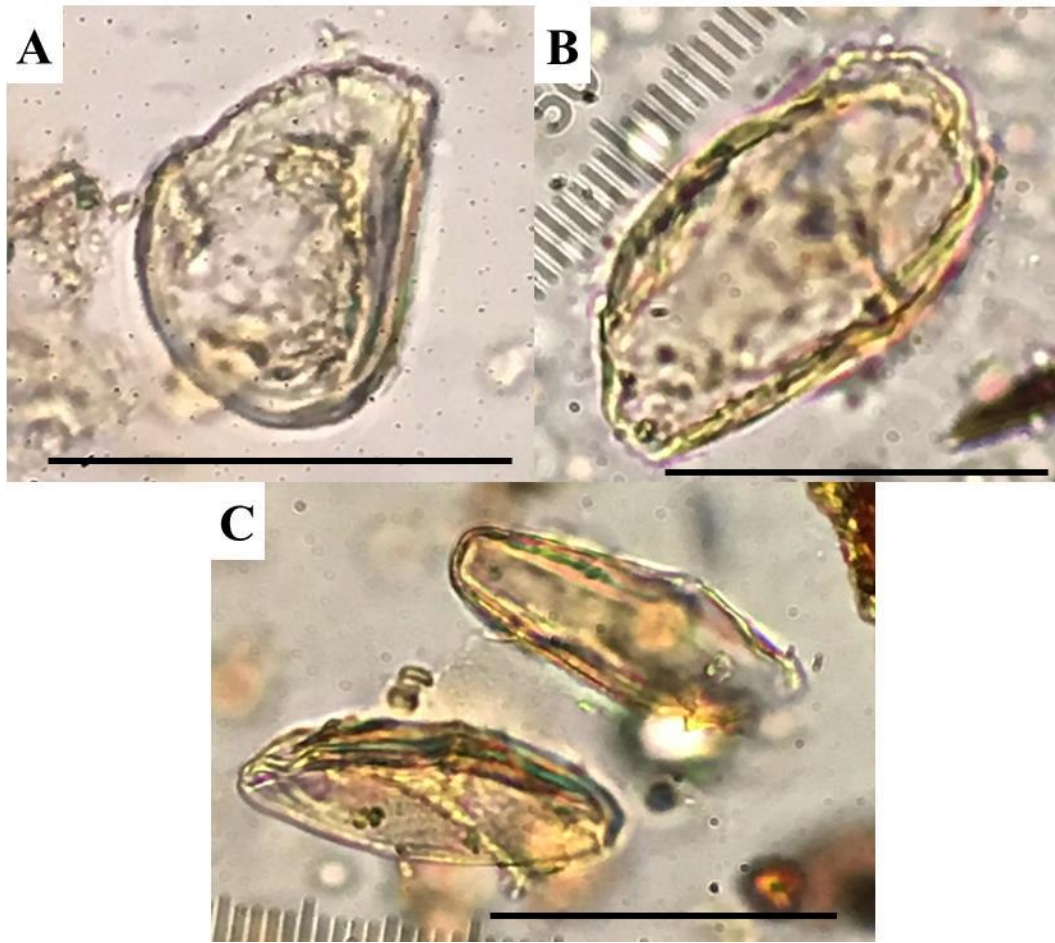


Figure 4 A - C – Pinworm eggs recovered from Aztec Ruins room 219. All eggs presented poor preservation. A: Half of a pinworm egg. B: Eggshell show high level of degradation that can compromise parasitological diagnosis. C: Two pinworm eggs with compromised morphology. Scale-bars: 50 μ m.



Figure 5 A - F – Pinworm eggs recovered from Aztec Ruins room 225 presenting excellent preservation. All the eggs showed preserved eggshells and larvae. Scale-bar=50 μ m.

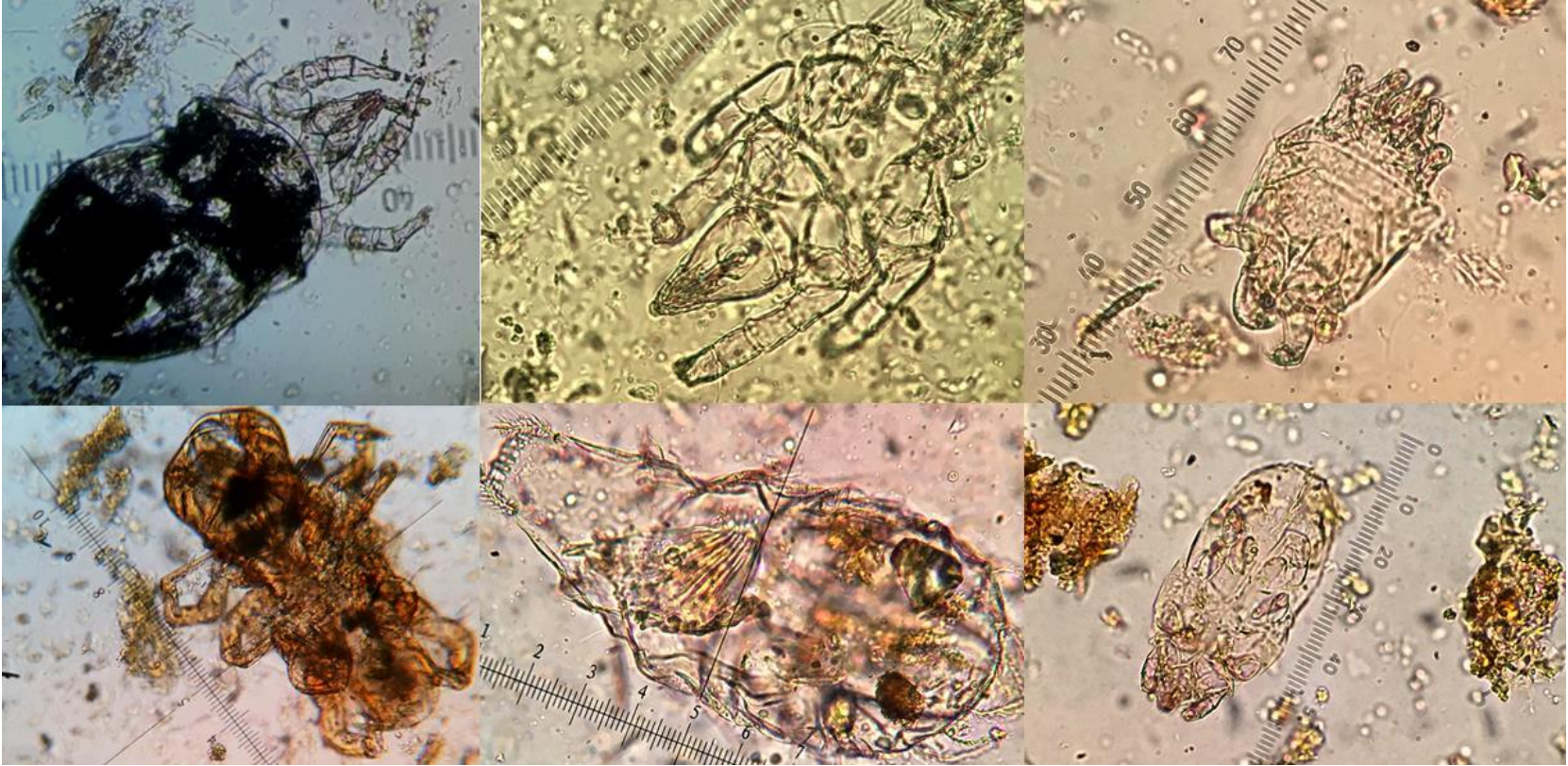


Figure 6–Mites found in the coprolites analyses from all sites.

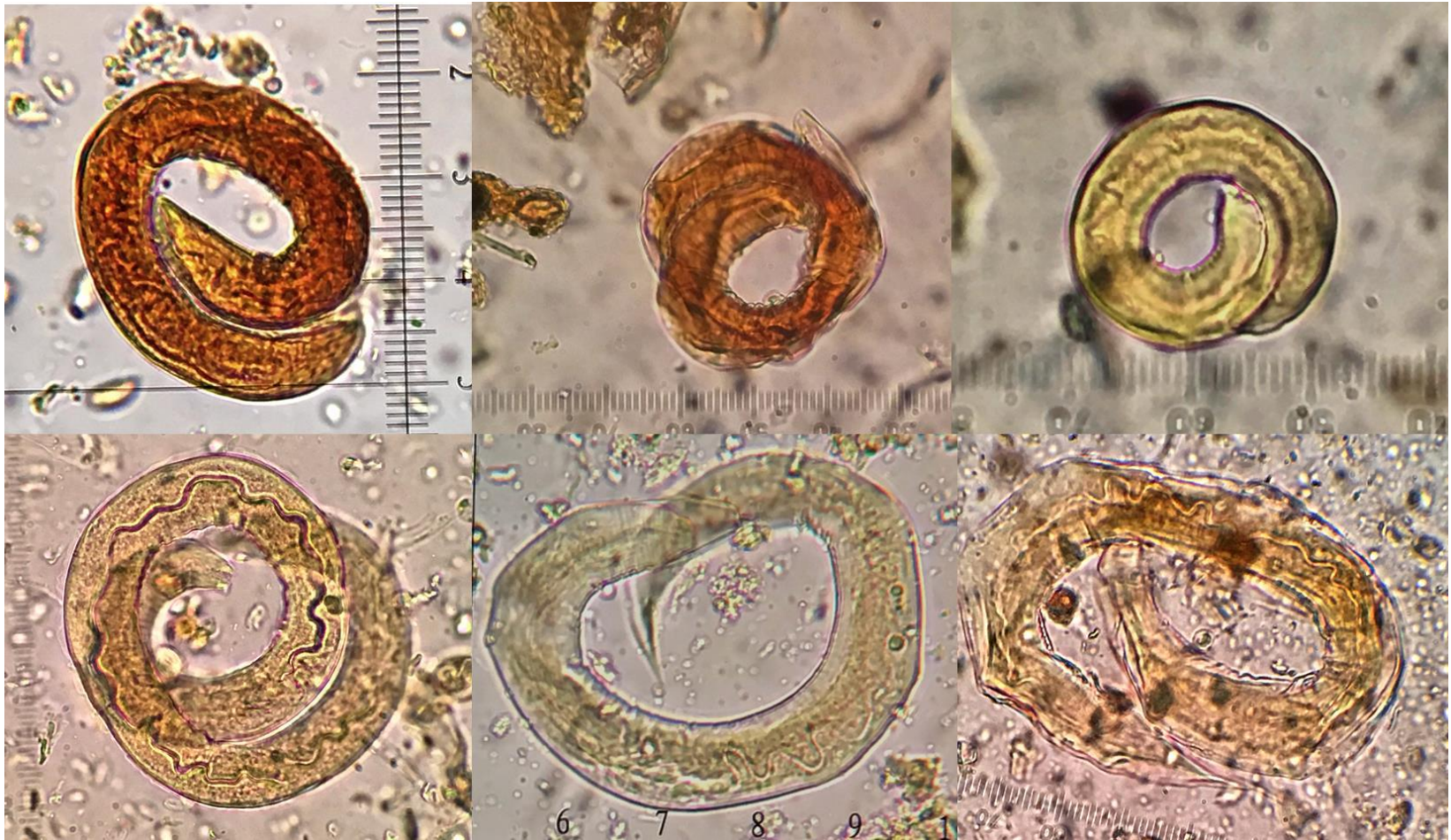


Figure 7– Larvae found in the coprolites analyzed from all sites.

Table 1 – Results of egg, mite and larvae per gram of coprolite from Salmon Ruins samples.

Sample Identification	EPG	MPG	LPG
1	168,77	0,00	0,00
2	53,35	53,35	106,70
3	1963,98	374,09	0,00
4	112,87	338,62	0,00
5	0,00	464,58	0,00
6	0,00	286,19	57,24
7	79,45	436,99	39,73
8	0,00	1717,62	0,00
9	0,00	364,08	0,00
10	0,00	112,85	112,85
11	0,00	334,11	0,00
12	0,00	784,02	0,00
13	242,79	776,94	0,00
14	0,00	96,79	0,00
15	336,72	673,44	0,00
16	164,00	765,33	0,00
17	53,58	160,73	0,00
18	2097,67	524,42	0,00
19	0,00	1725,72	0,00
20	0,00	435,32	0,00
21	7345,25	100,62	0,00
22	0,00	1379,54	0,00
23	0,00	60,97	0,00
24	54,55	981,93	0,00
25	0,00	673,84	0,00
26	0,00	124,38	0,00

27	0,00	275,08	0,00
28	0,00	530,22	0,00
29	0,00	2339,79	0,00
30	0,00	2216,64	0,00
31	371,29	1670,79	0,00
32	0,00	175,97	0,00
33	0,00	236,91	0,00
34	60,10	1442,31	0,00
35	759,35	2978,97	0,00
36	121,34	364,03	0,00
37	0,00	174,20	0,00
38	58,64	938,17	0,00
39	0,00	121,94	0,00
40	0,00	1125,59	0,00
41	0,00	857,78	0,00
43	0,00	1062,50	0,00
44	0,00	645,54	0,00
45	0,00	307,88	0,00
46	0,00	2647,78	0,00
47	0,00	2373,42	0,00
48	0,00	172,55	0,00
49	262,40	1259,53	0,00
50	0,00	375,00	0,00
51	0,00	892,86	0,00
52	0,00	1610,25	0,00
53	0,00	0,00	0,00
54	0,00	369,46	0,00
55	0,00	475,91	0,00
56	586,30	820,83	0,00

57	296,01	532,82	0,00
58	109,91	164,86	0,00
59	0,00	846,88	0,00
60	0,00	693,82	0,00
61	0,00	1147,34	0,00
62	123,76	61,88	0,00
63	0,00	229,27	0,00
64	0,00	777,78	0,00
65	0,00	56,31	0,00

OBS: Samples 42, 66 and 67 presented zero values for EPG, MPG and LPG.

Table 2 - Results of egg, mite and larvae per gram of coprolite from Aztec Ruins Room 219 samples.

Sample Identification	EPG	MPG	LPG
1	294,81	3183,96	0,00
2	61,27	1593,14	0,00
4	0,00	1573,30	58,27
5	0,00	254,07	0,00
6	0,00	117,92	0,00
7	0,00	1611,40	0,00
8	0,00	1010,64	53,19
9	0,00	1562,50	0,00
10	0,00	918,60	0,00
11	60,68	1881,07	0,00
12	0,00	163,21	0,00
13	0,00	183,21	0,00
14	0,00	430,30	0,00
15	0,00	1973,68	0,00

16	0,00	1111,32	0,00
17	0,00	1710,62	53,46
18	0,00	56,63	0,00
19	0,00	1494,71	0,00
20	0,00	633,60	0,00
21	0,00	1701,16	0,00

OBS: Sample 3 presented zero values for EPG, MPG and LPG.

Table 3 – Results of egg, mite and larvae per gram of coprolite from Aztec Ruins Room 225 samples.

Sample Identification	EPG	MPG	LPG
1	117,53	2115,51	0,00
2	0,00	0,00	1334,60
3	199,47	49,87	50,20
4	0,00	60,67	1838,24
5	0,00	486,17	3047,26
6	60,57	0,00	975,61
7	0,00	362,27	0,00
8	0,00	0,00	52,08
9	1639,19	93,67	0,00
10	1335,47	44,52	1620,37
11	783,76	663,18	62,50
12	842,64	105,33	0,00
13	0,00	0,00	509,05
14	56,89	455,15	175,23
15	72,52	0,00	61,88
16	89,24	2275,65	223,10
17	52,72	105,43	0,00

18	98,52	0,00	0,00
19	403,99	101,00	0,00
20	116,43	174,65	0,00
21	415,74	0,00	6463,41
22	171,89	114,59	925,93

4. Discussion

Enterobius vermicularis eggs were the only parasitological finding in the samples analyzed. Pinworm eggs are considered to be fragile and are not usually found in ancient samples analyses (Jaeger and Iñiguez, 2014; Reinhard et al., 2016). Despite that, we found high prevalences of pinworm infection in the sites studied. Pinworm females deposit eggs in the host's perianal region and for this reason, eggs are not usually found in the fecal matter (Rey, 2008; Roberts et al., 2013b). When the feces pass through the perianal area, some of the eggs attach to it and this is what it can be recovered. According to Rey (2008) and Roberts et al. (2013), only 5-10% of fecal samples present eggs. This makes the fecal analysis not the suitable method to diagnose pinworm infection. However, in these Ancestral Pueblo sites, we were able to recover the highest prevalences of infection and to apply quantification methods to estimate EPG of coprolite.

There are other helminths that produce more resistant eggs, such as *Ascaris* sp. and *Trichuris trichiura*, which exhibit at least three layers of eggshell (Roberts et al., 2013c, 2013d). Pinworm eggs have a thin eggshell (Roberts et al., 2013b) and its presence in the absence of both more resistant eggs or fragile eggs, like those from ancylostomids, indicates that possibly this was the only helminth infection in these populations (Reinhard and Pucu, 2014).

Considering the Morrow et al. (2016) taphonomy approach, only two categories are applicable to Ancestral Pueblo sites, related to parasite egg degradation. Actually, the abiotic, contextual and anthropogenic factors from these sites probably contributed to the preservation of the parasitological evidence. These sites are located in dry environments, considered as one of the most favorable conditions to preserve parasite remains (Reinhard et al., 1986). The dry climate favored the preservation of coprolites, which are the context of the parasitological findings. Coprolites are feces preserved by desiccation or mineralization and provide

protection to the parasite remain (Bryant and Reinhard, 2012). One might consider that pinworm eggs attach to the feces exterior, as explained before and for this reason, coprolites could not provide such protection. However, to explain this, we can mention the construction of a latrine to deposit fecal matter in Ancestral Pueblo sites. The latrines were isolated rooms, built with thick walls and pine wood ceilings, used only for this purpose, where the feces were deposited and humans did not have any posterior contact (Gwinn Vivian and Hilpert, 2012). Besides this fact, the room architecture did not allow that water, wind or any other abiotic factor could get in contact with the fecal matter, thus protecting it. This explains for example, why Aztec Ruins Room 225 pinworm eggs are so well preserved. The latrine presents, until today, the same conditions that it had when constructed, including the preserved original ceiling (Figure 8) (Lister and Lister, 1996).



Figure 8 – Detail of one of Aztec Ruins room ceiling showing the complex organization of the wood that probably resulted in the protection of the coprolites and hampered the parasite egg degradation in room 225. Photo: Morgana Camacho.

According to the data collected in this study, ecological factors seem to be the main taphonomic problem, when egg degradation is considered. The results from Aztec Ruins Room 225 show that samples had great amounts of LPG and also considerable amounts of MPG. An excellent preservation of pinworm eggs was observed (Figure 5 A-F). Both MPG and LPG did not have a statistically significant correlation with egg degradation. In some studies, mites are shown to have preference for nematode larvae predation (Epsky et al., 1988; Godoy et al., 1983; Muraoka and Ishibashi, 1976; Rockett, 1980; Santos et al., 1981; Walter et al., 1986). Perhaps the presence of larvae and no signs of egg degradation indicate that mites preferred to consume the larvae, instead of the eggs. Many more larvae were present in this room's coprolites which attracted mites that consumed a portion of the larvae. In this room, both structural and environmental conditions are unique in Ancestral Pueblo sites, as mentioned before for the preserved ceiling and consequent isolation of the room. The prevalence of 72.7% is the highest found considering all Ancestral Pueblo sites studied (Reinhard et al., 2016), due to the great amounts of rooms and elevated populational density (700 to 1000 people) (Lister and Lister, 1996). Egg preservation for this room allowed estimating it.

In Salmon Ruins there were a small number of larvae positive samples, but a considerable number of samples that had mites. However, no statistically significant correlation between MPG and egg degradation was found. EPG compared to the Aztec Ruins' Room 225 exhibit lower results, which are reflected by the not so good preservation in Salmon Ruins. The amounts of MPG indicate that mites probably acted as a taphonomic ecological factor, but it was not the only one. In Figure 3 (D-F) we can observe that the eggshells are degraded and that it looks like there is some mycelial growth that probably contributed to this degradation. This is supported by Reinhard et al. (1986). Maybe fungal action was more expressed in these samples, as previously suggested (Camacho et al., 2013; Leles et al., 2010; Rácz et al., 2015). Despite this observation, more analyses are required in order to understand the taphonomic issues concerning egg preservation in Salmon Ruins.

In Aztec Ruins Room 219 the results were opposite to it was seen in Aztec Ruins Room 225. Both latrines are not too far from each other (Figure 9), but exhibit different prevalences and preservation conditions. They represent the highest and the lowest prevalences from Ancestral Pueblo sites (Reinhard, 2008). Contrary to Aztec Ruins 225, room 219's ceiling is not conserved. Abiotic factors such as water and wind can easily get into this

latrine and interfere with egg preservation (Rácz et al., 2015). Despite the dry environment, the site was built right next to the Animas River and the elevated humidity from the river could have contributed to degradation. Also, this was the only room in which MPG had a statistically significant correlation with egg degradation. This result indicates that mites intensely impacted egg preservation at this latrine. There is a visual clue that egg predation by mites probably happened. In Figure 4 (A), half of an egg is observed, which seems to have been abraded by mite's chelicerae. The organismal taphonomic agents that are correlated to parasite egg degradation are generally hypothesized, however, the factors and mechanisms that influence on egg degradation are still not fully comprehended (Camacho et al., 2016; Leles, 2010; Morrow, 2016). In this study, mite infestation is considered as a possible factor that interferes on egg preservation, since it is experimentally correlated to nematode larvae degradation (Martikainen and Huhta, 1990; Muraoka and Ishibashi, 1976; Santos et al., 1981).

Larvae were not present in great amounts in room 219 and all references point out that it probably favored egg predation by mites (Epsky et al., 1988; Godoy et al., 1983; Muraoka and Ishibashi, 1976; Rockett, 1980; Santos et al., 1981; Walter et al., 1986). This is the first study that correlated the presence of mites with egg degradation in ancient samples. However, experimental studies are mandatory to verify this biological correlation. Egg preservation in this latrine had probably influenced in the prevalence achieved, since both latrines are dated from the same period and were probably used by the same population.

In Aztec Ruins room 219, both prevalence and taphonomic interferences demonstrate that there are different and particular conditions at this latrine. This means that this room needs to be carefully studied and that the prevalence detected probably does not represent the reality. Considering this, it is not possible to strictly compare parasite data from room 219 with other Ancestral Pueblo sites, even with room 225, located at the same site. Taphonomy shows that we are dealing with different processes, despite the latrines closely location. Moreover, we will further investigate if the correlation observed could be translated as mites interfered in an intense way over egg preservation and why in room 219, and not in other Ancestral Puebloan sites.

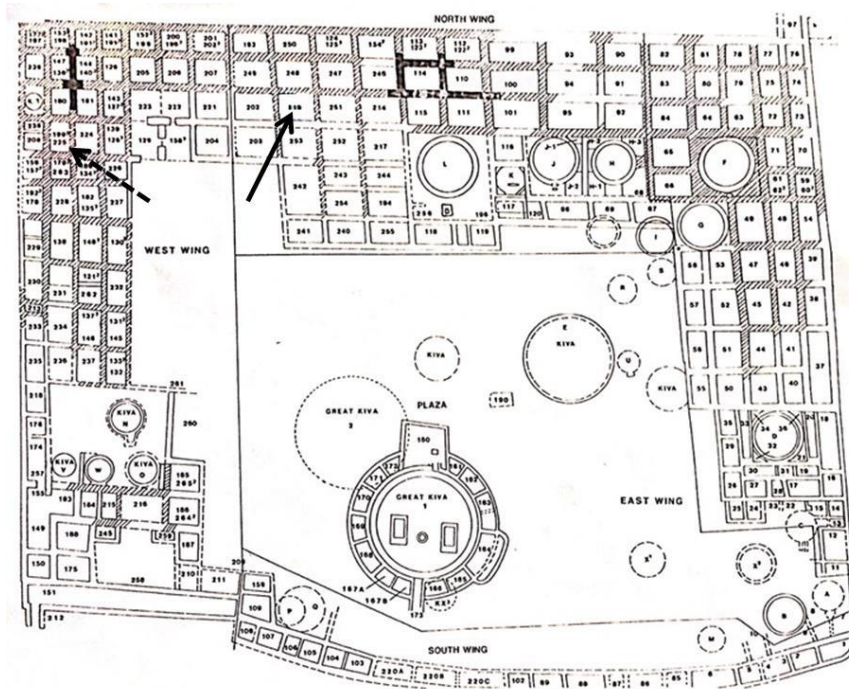


Figure 9 – Schematic drawing of Aztec Ruins site. The complete arrow indicates Room 219 and the dotted arrow indicates room 225. Source: National Park Service U.S. Department of the Interior, 2016.

5. Acknowledgements

To the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (AMI, grant number 307932/2014-1); Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro, FAPERJ (AMI, grant number CNE 2/2016).

6. References

- Bryant, V., Reinhard, K., 2012. Coprolites and archaeology: the missing links in understanding human health. *Vertebr. Coprolites N. M. Mus. Nat. Hist. Sci. Bull.* 51, 379-387.
- Callen, E.O., Cameron, T.W.M., 1960. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Sci.* 8, 35-40.
- Camacho, M., Leles, D., Santiago, J.D., Ramos, R.R.C., Uchôa, C., Bastos, O.M.P., Nunes, V.H.B., Mendonça de Souza, S., Araújo, A., 2016. Investigation of biodegradation in three different sediment cores from a shellmound (*sambaqui*) of Brazil, using *Ascaris lumbricoides*

eggs as a model. *J. Archaeol. Sci. Rep.* 9,358-365.

<https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2016.08.021>

Camacho, M., Pessanha, T., Leles, D., Dutra, J.M., Silva, R., Souza, S.M. de, Araújo, A., 2013. Lutz's spontaneous sedimentation technique and the paleoparasitological analysis of *sambaqui* (shell mound) sediments. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108, 155-159.

<https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013005>

Efremov, E., 1940. Taphonomy: new branch of paleontology. *Pan Am. Geol.* 74, 81-93.

Epsky, N., Walter, D., Capinera, J., 1988. Potential role of nematophagous microarthropods as biotic mortality factors of entomogenous nematodes (Rhabditida: Steinernmatidae, Heterorhabditidae). *J. Econ. Entomol.* 81, 821-825. <https://doi.org/10.1093/jee/81.3.821>

Fugassa, M.H., Sardella, N.H., Guichón, R.A., Denegri, G.M., Araújo, A., 2008.

Paleoparasitological analysis applied to museum-curated sacra from Meridional Patagonian collections. *J. Archaeol. Sci.* 35, 1408-1411. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2007.10.006>

Georgieva, S., Christensen, S., Petersen, H., Gjelstrup, P., Thorup-Kristensen, K., 2005. Early decomposer assemblages of soil organisms in litterbags with vetch and rye roots. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1145-1155. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.11.012>

Godoy, G., Rodriguez-Kábana, R., Shelby, R., Morgan-Jones, G., 1983. Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. II. Effects on microbial population. *Nematropica* 13, 63-74.

Gwinn Vivian, R., Hilpert, B., 2012. *The Chaco handbook: an encyclopedic guide*. University of Utah Press, Salt Lake City.

Gwinn Vivian, R., 1990. The Puebloan Period: A. D. 1120 - 1220, in: Gwinn Vivian, R. (Ed.), *The Chacoan Prehistory of the San Juan Basin*. Academic Press, San Diego, California, pp. 331-383.

Jaeger, L.H., Iñiguez, A.M., 2014. Molecular paleoparasitological hybridization approach as effective tool for diagnosing human intestinal parasites from scarce archaeological remains. *PLoS ONE* 9, e105910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105910>

Leles, D., 2010. Paleogenética e paleoepidemiologia de *Ascaris* sp. (Linnaeus, 1758) e *Trichuris* sp. (Roederer, 1761). (PhD Thesis). Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

Leles, D., Reinhard, K.J., Fugassa, M., Ferreira, L.F., Iñiguez, A.M., Araújo, A., 2010. A parasitological paradox: why is ascarid infection so rare in prehistoric Americas? *J. Archaeol. Sci.* 37, 1510-1520. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2010.01.011>

Lister, R., Lister, F., 1996. Aztec Ruins on the Animas: excavated, preserved, and interpreted. Southwest Parks and Monuments Association, Tucson, Arizona.

Lyman, R.L., 2010. What taphonomy is, what isn't, and why taphonomists should care about the difference. *J. Taphon.* 8, 1-16.

Martikainen, E., Huhta, V., 1990. Interactions between nematodes and predatory mites in raw humus soil: a microcosm experiment. *Rev. D'écologie Biol. Sol* 27, 13-20.

Morrow, J.J., 2016. Exploring parasitism in antiquity through the analysis of coprolites and quids from La Cueva de Los Muertos Chiquitos, Rio Zape, Durango, Mexico. (PhD Thesis). University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, USA.

Morrow, J.J., Lasen, A.S., Piombino-Mascalì, D., Jankauskas, R., Kozakaitė, J., Araújo, A., Reinhard, K.J., 2014. Taphonomic considerations of a whipworm infection in a mummy from the Dominican church of the Holy Spirit, Vilnius, Lithuania. *Int. J. Paleopathol.* 13, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2014.08.001>

Morrow, J.J., Newby, J., Piombino-Mascalì, D., Reinhard, K.J., 2016. Taphonomic considerations for the analysis of parasites in archaeological materials. *Int. J. Paleopathol.* 13, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2016.01.005>

Muraoka, M., Ishibashi, N., 1976. Nematode-feeding mites and their feeding behavior. *Appl. Entomol. Zool.* 11, 1-7.

Paseka, R., 2010. Archaeoparasitology of Chaco Canyon. (Undergraduate Thesis Environmental Studies Program). University of Nebraska, Lincoln, Nebraska, USA.

Pearsall, D.M., 2016. Pollen Analysis, in: *Paleoethnobotany, Third Edition: A Handbook of Procedures*. Routledge Taylor and Francis Group, New York, USA, pp. 214-225.

- Rácz, S.E., de Araújo, E.P., Jensen, E., Mostek, C., Morrow, J.J., Van Hove, M.L., Bianucci, R., Willems, D., Heller, F., Araújo, A., Reinhard, K.J., 2015. Parasitology in an archaeological context: analysis of medieval burials in Nivelles, Belgium. *J. Archaeol. Sci.* 53, 304-315. <https://doi.org/10.1016/j.jas.2014.10.023>
- Read, D., Sheppard, S., Bruford, M., Glen, D., Symondson, W., 2006. Molecular detection of predation by soil micro-arthropods on nematodes: soil micro-arthropod predation. *Mol. Ecol.* 15, 1963-1972. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02901.x>
- Reinhard, K.J., 2008. Parasite pathoecology of Chacoan Great Houses: the healthiest and wormiest Ancestral Puebloans, in: Reed, P.F. (Ed), *Chaco's Northern Prodigies Salmon, Aztec, and the Ascendancy of the Middle San Juan Region after AD 1100*. University of Utah Press, Salt Lake City, pp. 86–95.
- Reinhard, K.J., 1992. Patterns of diet, parasitism and anemia in prehistoric west North America, in: Stuart-Macadam, P., Kent, S. (Eds.), *Diet, Demography and Disease: Changing Perspectives on Anemia*. Aldine de Gruyter, New York, pp. 219–258.
- Reinhard, K.J., 1991. Dietary and parasitological study of Turkey Pen Cave, a Basketmaker II Village in the Grand Gulch of Utah, in: Rhine, S., Steinbock, R. (Eds.), *Health and Disease in the Prehistoric Southwest II*. The Maxwell Museum, University of New Mexico, Albuquerque.
- Reinhard, K.J., Araújo, A., Morrow, J., 2016. Temporal and spatial distribution of *Enterobius vermicularis* (Nematoda: Oxyuridae) in the Prehistoric Americas. *Korean J. Parasitol.* 54, 591-603. <http://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.5.591>
- Reinhard, K.J., Bryant, V.M., 2008. Pathoecology and the Future of Coprolite Studies in Bioarchaeology. *Pap. Nat. Resour.* 205–224.
- Reinhard, K.J., Clary, K., 1986. Parasite analysis of prehistoric coprolites from Chaco Canyon, New Mexico, in: Akins, N.J. (Ed.), *A Bioarchaeological Approach to Human Burials from Chaco Canyon, New Mexico*. Branch of Cultural Research, U.S. Dept. of the Interior, National Park Service, Santa Fe, New Mexico, pp. 177–186.
- Reinhard, K.J., Confalonieri, U., Herrmann, B., Ferreira, L., Araújo, A., 1986. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo* 37, 217–239.

- Reinhard, K.J., Pucu, E., 2014. Comparative parasitological perspectives on paleoepemiological transitions: Americas and Europe, in: Zuckerman, M. (Ed.), *Moving the Middle to the Foreground: Interdisciplinary Approaches to Examining the Second Epidemiological Transition*. John Wiley & Sons, Inc, pp. 311–326.
- Reinhard, K.J, Urban, O., 2003. Diagnosing ancient Diphyllbothriasis from Chinchorro mummies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 191–193. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000900028>
- Reinhard, K.J., Araújo, A., Sianto, L. Costello, J.G., Swope, K., 2008. Chinese liver flukes in latrine sediments from Wong Nim’s property, San Bernardino, California: Archaeoparasitology of Caltrans District Headquarters. *J. Parasitol.* 94, 300-303. <https://doi.org/10.1645/GE-1049.1>
- Reinhard, K.J., Ferreira, LF., Bouchet, F., Sianto, L., Dutra, J.M.F., Iñiguez, A., Leles, D., Le Bailly, M., Fugassa, M., Pucu, E., Araújo, A., 2013. Food, parasites, and epidemiological transitions: a broad perspective. *Int. J. Paleopathol.* 3, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2013.05.003>
- Reinhard, K.J., Johnson, K.L., LeRoy-Toren, S., Wieseman, K., Teixeira-Santos, I., Vieira, M., 2012. Understanding the Pathoecological Relationship between Ancient Diet and Modern Diabetes through Coprolite Analysis: A Case Example from Antelope Cave, Mojave County, Arizona. *Curr. Anthropol.* 53, 506–512. <https://doi.org/10.1086/665923>
- Rey, L., 2008. *Enterobius vermicularis* e Enterobíase, in: *Parasitologia*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 598–603.
- Roberts, L., Janovy Jr, J., Nadler, S., 2013a. Parasitic Arachnids Subclass Acari, Ticks and Mites, in: Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts’ *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill International, New York, USA, pp. 611–630.
- Roberts, L., Janovy Jr, J., Nadler, S., 2013b. Nematodes: Oxyuridomorpha, Pinworms., in: Gerald D. Schmidt & Larry S Roberts’ *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill International, United States of America, pp. 425–430.
- Roberts, L., Janovy Jr, J., Nadler, S., 2013c. Nematodes: Trichinellida and Dioctophymatida, Enoplean Parasites, in: Gerald D. Schmidt & Larry S Roberts’ *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill International, New York, USA, pp. 377–390.

Roberts, L., Janovy Jr, J., Nadler, S., 2013d. Nematodes: Ascaridomorpha, intestinal large roundworms, in: Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology. McGraw-Hill International, New York, USA, pp. 411–423.

Rocket, C.L., 1980. Nematode predation by oribatid mites (Acari: Oribatida). *Int. J. Acarol.* 6, 219–224. <https://doi.org/10.1080/01647958008683222>

Santos, P., Phillips, J., Whitford, W., 1981. The role of mites and nematodes in early stages of buried litter decomposition in a desert. *Ecology* 62, 664–669. <https://doi.org/10.2307/1937734>

Schillaci, M., Stojanowski, C., 2002. Investigating social organization at Aztec Ruins using determinant ratio analysis, in: Wiseman, R.N., Snow, C.T. (Eds.), *Forward into the Past: Papers in Honor of Teddy Lou and Francis Stickney*. Archaeological Society of New Mexico, Albuquerque, New México, pp. 93–104.

Sorg, M., Haglund, W., 2002. Advancing forensic taphonomy: purpose, theory, and process, in: Haglund, W.D., Sorg, M.H. (Eds.), *Advances in Forensic Taphonomy - Method, Theory, and Archaeological Perspectives*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 3–30.

Walter, D.E., Hudgens, R.A., Freckman, D.W., 1986. Consumption of nematodes by fungivorous mites, *Tyrophagus* spp. (Acarina: Astigmata: Acaridae). *Oecologia* 70, 357–361. <https://doi.org/10.1007/BF00379497>

11 CONCLUSÃO

Sítios arqueológicos de populações da cultura *Pueblo* oferecem condições ideais de preservação que permitem avaliar o cenário epidemiológico de infecções. *Enterobius vermicularis* é o parasito mais frequente e em alguns sítios parece ser o único helminto a causar infecções em populações dessa cultura em diferentes períodos de ocupação. Apesar da preservação evidente em grande parte dos sítios, é notória a degradação de ovos do parasito em outros sítios dessa cultura. Fatores ecológicos constituem o principal problema tafonômico relacionado à degradação de ovos de *E. vermicularis*. No entanto, a sensibilidade diagnóstica do método utilizado possibilitou a recuperação de maior quantidade de ovos desse parasito em maior número de amostras resultando na alteração da interpretação do cenário epidemiológico evidenciado em estudos anteriores.

Foram observadas frequências de infecção maiores do que as estimadas inicialmente para *Turkey Pen Cave* e *Salmon Ruins* o que sugere que a metodologia aplicada em estudos anteriores subestimou a quantificação de amostras positivas e negativas e conseqüentemente o cálculo de frequência de infecção. Considerando o resultado obtido no presente estudo, considera-se reanalisar quantitativamente amostras de todos os sítios da cultura *Pueblo*, de modo a estimar frequências de infecção que correspondem à realidade do cenário epidemiológico. Anteriormente, a baixa frequência observada em *Salmon Ruins* também foi atribuída à higienização dos indivíduos com “sabonetes” produzidos com raiz de *Yucca*. Entretanto, a elevada frequência observada no presente estudo sugere que os hábitos de higiene dessa população provavelmente não correspondem a essa interpretação.

Com base nas elevadas frequências observadas tanto em *Turkey Pen Cave*, sítio *Basketmaker II* (100 – 400 AD), quanto em *Salmon Ruins* e *Aztec Ruins* latrina 225, sítios *Pueblo III* (1020 – 1350 AD), refuta-se a hipótese de Hugot e colaboradores (1999) sobre a correlação direta entre a frequência de infecção por *E. vermicularis* e o estilo de moradia adotado por populações da cultura *Pueblo*, visto que as frequências de infecção estavam igualmente elevadas.

As elevadas frequências observadas para esses sítios também levantaram questões acerca da dinâmica de transmissão, visto que larvas presentes nos ovos de *E. vermicularis* não sobreviveriam por mais de 5 dias ao ambiente árido dos sítios. Entretanto, a humidade presenciada em recintos com a cobertura original preservada em *Aztec Ruins* sugere que

dentro do ambiente das *Great Houses* a sobrevivência dos ovos pode ter sido maior, o que aumentaria o tempo de sobrevivência das larvas nos ovos. Recintos com função de habitação e ritualística provavelmente favoreceram a transmissão de *E. vermicularis* em *Salmon Ruins* e *Aztec Ruins* devido a elevada humidade e agregação de indivíduos por determinado período de tempo. A elevada frequência de *Turkey Pen Cave* provavelmente se deve ao uso de *pithouses*, habitações cuja circulação do ar pode ter sido dificultada quando utilizada pelos grupos, especialmente no inverno. A intensa degradação evidenciada nos ovos encontrados em *Aztec Ruins* latrina 219 e a sua correlação estatisticamente significativa com a presença de ácaros sugere que a frequência observada não representa o real cenário epidemiológico da infecção por *E. vermicularis* nesse sítio.

O cálculo da razão entre a variância e a média indica que a distribuição de *E. vermicularis* nessas populações era agregada, assim como é evidenciada na maioria dos estudos epidemiológicos em populações atuais. Esse resultado indica que dados epidemiológicos de infecções em populações antigas podem ser comparados a dados de populações atuais.

REFERÊNCIAS

- AASEN, D. **Pollen, Macrofossil and Charcoal Analyses of Basketmaker Coprolites from Turkey Pen Ruin, Cedar Mesa, Utah.** [s.l.] Department of Anthropology, Washington State University, 1984.
- ANDERSON, R.; MAY, R. Helminth infections of humans: mathematical models, population dynamics, and control. **Advances in Parasitology**, v. 24, p. 1–101, 1985.
- ARAÚJO, A. et al. Parasites as probes for prehistoric human migrations? **Trends in Parasitology**, v. 24, n. 3, p. 112–115, mar. 2008a.
- ARAÚJO, A.; REINHARD, K.; FERREIRA, L. Parasites in Ancient Material. **Advances in Parasitology**, v. in press, 2015.
- ARAÚJO, J. V. et al. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium sinense*, and *Pochonia chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitology Research**, v. 102, n. 4, p. 787–790, mar. 2008b.
- ARRIAZA, B. T. et al. Possible influence of the ENSO phenomenon on the pathoecology of diphyllbothriasis and anisakiasis in ancient Chinchorro populations. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 1, p. 66–72, 2010.
- BOHRER, V.; DOEBLY, J. Cultivated Plants from Salmon Ruin. In: REED, P. (Ed.). . **Thirty-Five Years of Research at Salmon Ruins, New Mexico.** Bloomfield, USA: Center for Desert Archaeology and Salmon Ruins Museum, 2006. p. 721–739.
- BRYANT, V.; REINHARD, K. Coprolites and Archaeology: The Missing Links in Understanding Human Health. **Vertebrate Coprolites. New Mexico Museum of Natural History and Science Bulletin**, v. 51, p. 379–387, 2012.
- BUSH, A. et al. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisited. **The Journal of Parasitology**, v. 83, n. 4, p. 575–583, 1997.
- CALLEN, E. O.; CAMERON, T. W. M. A Prehistoric Diet as Revealed in Coprolites. **New Scientist**, v. 8, p. 35–40, 1960a.
- CALLEN, E. O.; CAMERON, T. W. M. A prehistoric diet as revealed in coprolites. **New Scientist**, v. 8, p. 35–40, 1960b.
- CAMACHO, M. et al. Lutz's spontaneous sedimentation technique and the paleoparasitological analysis of sambaqui (shell mound) sediments. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 155–159, 2013.
- CAMACHO, M. et al. Recovering Parasites from Mummies and Coprolites: An Epidemiological Approach. **International Journal of Paleopathology**, v. In press, 2017.
- CROFTON, H. A quantitative approach to parasitism. **Parasitology**, v. 62, n. 02, p. 179–193, 1971.

- CROLL, N.; GHADIRIAN, E. Wormy persons: contributions to the nature and patterns of overdispersion with *Ascaris lumbricoides*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* and *Trichuris trichiura*. **Tropical and Geographical Medicine**, v. 33, n. 3, p. 241–248, 1981.
- CROMPTON, D.; KEYMER, A.; ARNOLD, S. Investigating over-dispersion; *Moniliformis* (*Acanthocephala*) and rats. **Parasitology**, v. 88, n. 2, p. 317–331, 1984.
- DOYEL, D. E. Exploring Chaco. In: DOYEL, D. E. (Ed.). . **Anasazi Regional Organization and the Chaco System**. Albuquerque, New México: Maxwell Museum of Anthropology University of New Mexico, 1992. v. Anthropological Papers NO. 5p. 3–14.
- EFREMOV, E. Taphonomy: new branch of paleontology. **Pan American Geology**, v. 74, p. 81–93, 1940.
- EPSKY, N.; WALTER, D.; CAPINERA, J. Potential Role of Nematophagous Microarthropods as Biotic Mortality Factors of Entomogenous Nematodes (*Rhabditida*: *Steinernematidae*, *Heterorhabditidae*). **Journal of Economic Entomology**, v. 81, n. 3, p. 821–825, 1988.
- FERREIRA, L. A Conservação do Material Orgânico Através dos Tempos. In: **Fundamentos da Paleoparasitologia**. 1. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Eitora Fiocruz, 2011. p. 43–52.
- FRY, G. F. Analysis of Prehistoric Coprolites from Utah. **University of Utah, University of Utah Press, Salt Lake City.**, p. Anthropological Papers No. 97, 1977.
- FUGASSA, M. H. et al. Parasitism of Prehistoric Humans and Companion Animals from Antelope Cave, Mojave County, Northwest Arizona. **Journal of Parasitology**, v. 97, n. 5, p. 862–867, 2011.
- GODOY, G. et al. Chitin amendments for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. II. Effects on microbial population [Biological control, root-knot nematode, Florida]. **Nematropica**, v. 13, n. 1, p. 63–74, 1983.
- GRZYWINSK, L. Analysis of feces from the Middle Age period. **Zoologica Poloniae**, v. 10, p. 195–199, 1960.
- HAGLUND, W.; SORG, M. (EDS.). **Advances in forensic taphonomy: method, theory, and archaeological perspectives**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2002.
- HOFSTÄTTER, B. D. M. et al. Effect of *Paecilomyces lilacinus* , *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungal extracts on the hatchability of *Ancylostoma* eggs. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 34, n. 1, p. 28–31, jan. 2017.
- HORNE, P. A review of the evidence of human endoparasitism in the pre-Columbian new world through the study of coprolites. **Journal of Archaeological Science**, v. 12, n. 4, p. 299–310, 1985.
- HUGOT, J. P. et al. Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. **Parasite**, v. 6, n. 3, p. 201–208, set. 1999.
- IMILAN, W. Performing national identity through Peruvian food migration in Santiago de Chile. **Fennia**, v. 193, n. 2, p. 227–241, 2015.

- IQBAL, Z. et al. In Vitro Anthelmintic Activity of *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Curcubita mexicana* and *Ficus religiosa*. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 3, n. 4, p. 454–457, 2001.
- JIMÉNEZ, F. A. et al. Zoonotic and Human Parasites of Inhabitants of Cueva de Los Muertos Chiquitos, Rio Zape Valley, Durango, Mexico. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 2, p. 304–309, 2012.
- JOHNSON, K. L. et al. A Tick From a Prehistoric Arizona Coprolite. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 296–298, 2008.
- KUCHTA, R.; SERRANO-MARTÍNEZ, M. E.; SCHOLZ, T. Pacific Broad Tapeworm *Adenocephalus pacificus* as a Causative Agent of Globally Reemerging Diphyllbothriosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1697–1703, 2015.
- LELES, D. et al. A parasitological paradox: Why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas? **Journal of Archaeological Science**, v. 37, n. 7, p. 1510–1520, 2010.
- LEŠTINOVÁ, K. et al. Eggs as a Suitable Tool for Species Diagnosis of Causative Agents of Human Diphyllbothriosis (Cestoda). **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004721, 2016.
- LYMAN, R. L. What Taphonomy Is, What it Isn't, and Why Taphonomists Should Care about the Difference. **Journal of Taphonomy**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2010.
- MAHER, L. Statistics for microfossil concentration measurements employing samples spiked with marker grains. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 32, n. 2–3, p. 153–191, 1981.
- MARTINSON, E. et al. Pathoecology of Chiribaya parasitism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 195–205, 2003.
- MATSON, R.; CHISHOLM, B. Basketmaker II Subsistence: Carbon Isotopes and Other Dietary Indicators from Cedar Mesa, Utah. **American Antiquity**, v. 56, n. 3, p. 444–459, 1991.
- MATSON, R.; CHISHOLM, B. **Basketmaker II Subsistence**. Poster apresentado em 72nd Annual Meeting, Society for American Archaeology. Austin, Texas, 26 abr. 2007.
- MENDONÇA DE SOUZA, A. **Dicionário de Arqueologia**. 1. ed. [s.l.] ADESA, 1997.
- MILNER, G. R.; BOLDSSEN, J. L. Life not death: Epidemiology from skeletons. **International Journal of Paleopathology**, v. 17, p. 26–39, 2017.
- MITCHELL, P. D. Human parasites in the Roman World: health consequences of conquering an empire. **Parasitology**, v. 144, n. 01, p. 48–58, jan. 2017.
- MORROW, J. **Exploring Parasitism in Antiquity Through the Analysis of Coprolites and Quids from La Cueva de Los Muertos Chiquitos, Rio Zape, Durango, Mexico**. Lincoln, Nebraska, USA: University of Nebraska, 2016.

MORROW, J. J. et al. Taphonomic considerations for the analysis of parasites in archaeological materials. **International Journal of Paleopathology**, v. 13, p. 56–64, jun. 2016.

MORROW, J. J.; REINHARD, K. The Paleoepidemiology of *Enterobius vermicularis* (Nemata: Oxyuridae) among the Loma San Gabriel at La Cueva de los Muertos Chiquitos (600-800CE), Rio Zape Valley, Durango, Mexico. **American Journal of Epidemiology**, v. in press, 2017.

MURAOKA, M.; ISHIBASHI, N. Nematode-Feeding Mites and Their Feeding Behavior. **Applied Entomology and Zoology**, v. 11, p. 1–7, 1976.

NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR. **Aztec Ruins** National Monument New Mexico, , 2016a.

NATIONAL PARK SERVICE U.S. DEPARTMENT OF THE INTERIOR. **Mesa Verde** Mesa Verde National Park Colorado, , 2016b.

PAKSOY, M.; AYDIN, C. Some physical properties of edible squash (*Cucurbita pepo* L.) seeds. **Journal of Food Engineering**, v. 65, n. 2, p. 225–231, nov. 2004.

PAVLOVSKY, E. **The Natural Nidality of Transmissible Diseases**. [s.l.] Urbana, University of Illinois Press, 1966.

PEARSALL, D. M. Pollen Analysis. In: **Paleoethnobotany, third edition: a handbook of procedures**. 3. ed. New York, USA: Routledge Taylor and Francis Group, 2016. p. 214–225.

PLOG, S. From Village to Town: Hohokan, Mongolon, and Anasazi AD 700 to 1130. In: **Ancient Peoples of the American Southwest**. 2. ed. New York, USA: Thames & Hudson, 2008a. p. 71–117.

PLOG, S. Introduction: People and Landscape. In: **Ancient People of the American Southwest**. 2. ed. New York, USA: Thames & Hudson, 2008b. p. 13–36.

PLOG, S. The Archaic: Questions of Continuity and Change 7000 BC to AD 200. In: PLOG, S. (Ed.). **Ancient Peoples of the American Southwest**. 2. ed. New York, USA: Thames & Hudson, 2008c. p. 46–55.

PLOG, S. The Rise of Village Life AD 200 to 700. In: **Ancient peoples of the American Southwest**. 2. ed. New York, USA: Thames & Hudson, 2008d. p. 56–70.

RÁCZ, S. E. et al. Parasitology in an archaeological context: analysis of medieval burials in Nivelles, Belgium. **Journal of Archaeological Science**, v. 53, p. 304–315, jan. 2015.

REICZIGEL, J.; RÓZSA, L. **Quantitative Parasitology 3.0**. Budapest: [s.n.].

REINHARD, K. Relation of climate to epidemiology of infectious disease among Arctic populations. **Alaska Medicine**, v. 16, p. 25–30, 1974a.

REINHARD, K. Bionomic disruptions and the health of Arctic people - an adventure in retrospective pathoecology. **American Journal of Public Health**, v. 64, p. 13, 1974b.

REINHARD, K. **Dietary and Parasitological Study of Feces from Turkey Pen Alcove.** Farmington, New Mexico, USA: San Juan County Museum Association, 1985.

REINHARD, K. et al. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. **Homo**, v. 37, p. 217–239, 1986.

REINHARD, K. Patterns of diet, parasitism and anemia in prehistoric west North America. In: STUART-MACADAM, P.; KENT, S. (Eds.). . **Diet, Demography and Disease: Changing Perspectives on Anemia.** New York: Aldine de Gruyter, 1992a. p. 219–258.

REINHARD, K. Parasitology as an Interpretive Tool in Archaeology. **American Antiquity**, v. 57, n. 02, p. 231–245, 1992b.

REINHARD, K. Parasite Pathoecology of Chacoan Great Houses: The Healthiest and Wormiest Ancestral Puebloans. In: REED, P. (Ed.). . **Chaco's Northern Prodigies Salmon, Aztec, and the Ascendancy of the Middle San Juan Region after AD 1100.** Salt Lake City: University of Utah Press, 2008. p. 86–95.

REINHARD, K.; ARAÚJO, A.; MORROW, J. Temporal and Spatial Distribution of *Enterobius vermicularis* (Nemata: Oxyuridae) in the Prehistoric Americas. **Korean Journal of Parasitology**, v. in press, 2016.

REINHARD, K.; BRYANT, V. Pathoecology and the Future of Coprolite Studies in Bioarchaeology. **Papers in Natural Resources**, p. 205–224, 2008.

REINHARD, K. J. et al. Chinese Liver Flukes in Latrine Sediments From Wong Nim's Property, San Bernardino, California: Archaeoparasitology of the Caltrans District Headquarters. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 1, p. 300–303, fev. 2008.

REINHARD, K. J. et al. Understanding the Pathoecological Relationship between Ancient Diet and Modern Diabetes through Coprolite Analysis: A Case Example from Antelope Cave, Mojave County, Arizona. **Current Anthropology**, v. 53, n. 4, p. 506–512, 2012.

REINHARD, K. J.; ARAÚJO, A. Synthesizing parasitology with archaeology in paleopathology. In: BUIKSTRA, J.; ROBERTS, C. (Eds.). . **The Global history of paleopathology pioneers and prospects.** 1. ed. New York, USA: Oxford University Press, 2012. p. 751–764.

REINHARD, K. J.; BUIKSTRA, J. Louse infestation of the Chiribaya Culture, Southern Peru: variation in prevalence by age and sex. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 173–179, 2003.

REINHARD, K.; PUCU, E. Comparative parasitological perspectives on paleoepemiological transitions: Americas and Europe. In: ZUCKERMAN, M. (Ed.). . **Moving the Middle to the Foreground: Interdisciplinary Approaches to Examining the Second Epidemiological Transition.** [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2014. p. 311–326.

REY, L. Himenolepiases, Difilobotríase e outras Cestoidíases. In: REY, L. (Ed.). . **Parasitologia.** 4. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2008a. p. 558–568.

REY, L. Ancilostomídeos e ancilostomíase: II. A doença. In: **Parasitologia.** 4. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2008b. p. 622–636.

REY, L. Ancilostomídeos e Ancilostomíase: I Os Parasitos. In: **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2008c. p. 614–621.

REY, L. *Ascaris Lumbricoides* e ascaríase. In: **Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais**. 4. ed. [s.l.] Guanabara Koogan, 2008d. p. 585–597.

REY, L. Nematóides parasitos do homem. In: REY, L. (Ed.). . **Parasitologia**. 4. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, 2008e. p. 570–584.

ROBERTS, L.; JANOBY JR, J.; NADLER, S. Tapeworms. In: **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. 9. ed. New York, USA: McGraw-Hill International, 2013a. p. 325–348.

ROBERTS, L.; JANOBY JR, J.; NADLER, S. Nematodes: Rhabditomorpha, Bursate Roundworms. In: **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. 9. ed. New York, USA: McGraw-Hill International, 2013b. p. 397–410.

ROBERTS, L.; JANOBY JR, J.; NADLER, S. Nematodes: Ascaridomorpha, intestinal large roundworms. In: **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. 9. ed. New York, USA: McGraw-Hill International, 2013c. p. 411–423.

ROBERTS, L.; JANOBY JR, J.; NADLER, S. Nematodes: Trichinellida and Dioctophymatida, Enoplean Parasites. In: **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. 9. ed. New York, USA: McGraw-Hill International, 2013d. p. 377–390.

ROBERTS, L.; JANOBY JR, J.; NADLER, S. Parasitic Arachnids Subclass Acari, Ticks and Mites. In: **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. 9. ed. New York, USA: McGraw-Hill International, 2013e. p. 611–630.

ROBERTS, L.; JANOBY JR, J.; NADLER, S. Phylum Acanthocephala: Thorny-Headed Worms. In: **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. 9. ed. New York, USA: McGraw-Hill International, 2013f. p. 473–487.

ROBERTS, L.; JANOBY JR, J.; NADLER, S. Nematodes: Oxyuridomorpha, Pinworms. In: **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' Foundations of Parasitology**. 9. ed. New York, USA: McGraw-Hill International, 2013g. p. 425–430.

ROCKETT, C. L. Nematode predation by oribatid mites (Acari: Oribatida). **International Journal of Acarology**, v. 6, n. 3, p. 219–224, 1980.

RÓZSA, L.; REICZIGEL, J.; MAJOROS, G. Quantifying Parasites in Samples of Hosts. **Journal of Parasitology**, v. 86, n. 2, p. 228–232, 2000.

SAMUELS, R. Parasitological Study of Long-Dried Fecal Samples. **Memoirs of the Society for American Archaeology**, v. 19, n. Contributions of the Wetherill Mesa Archeological Project, p. 175–179, 1965.

SANTORO, C.; VINTON, S. D.; REINHARD, K. J. Inca expansion and parasitism in the Lluta Valley: preliminary data. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 161–163, jan. 2003.

SANTOS, P.; PHILLIPS, J.; WHITFORD, W. The Role of Mites and Nematodes in Early Stages of Buried Litter Decomposition in a Desert. **Ecology**, v. 62, n. 3, p. 664–669, 1981.

SCHILLACI, M.; STOJANOWSKI, C. Investigating Social Organization at Aztec Ruins Using Determinant Ratio Analysis. In: WISEMAN, R.; O’LAUGHLIN, T.; SNOW, C. (Eds.). **. Forward into the past: papers in honor of Teddy Lou and Francis Stickney**. Albuquerque, New México: Archaeological Society of New Mexico, 2002. p. 93–104.

SEARCEY, N. et al. Parasitism of the Zweeloo Woman: Dicrocoeliasis evidenced in a Roman period bog mummy. **International Journal of Paleopathology**, v. 3, n. 3, p. 224–228, set. 2013.

SERRANO-MARTÍNEZ, E. et al. Detección de Parásitos en Peces Marinos Destinados al Consumo Humano en Lima Metropolitana. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 28, n. 1, p. 160, 7 maio 2017.

SHAW, D.; GRENFELL, B.; DOBSON, A. Patterns of macroparasite aggregation in wildlife host populations. **Parasitology**, v. 117, n. 6, p. 597–610, 1998.

SHIELDS, J. D. The infestation and dispersion patterns of Carcinonemertes spp. (Nemertea) on their crab hosts. **Hydrobiologia**, v. 266, n. 1–3, p. 45–56, 1993.

SHIN, D. H. et al. Scanning Electron Microscope Study of Ancient Parasite Eggs Recovered From Korean Mummies of the Joseon Dynasty. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 137–145, 2009.

SILVA, A. R. et al. In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. **Veterinary Parasitology**, v. 172, n. 1–2, p. 76–79, ago. 2010.

SORG, M.; HAGLUND, W. Advancing Forensic Taphonomy: Purpose, Theory, and Process. In: HAGLUND, W.; SORG, M. (Eds.). **. Advances in Forensic Taphonomy - Method, Theory, and Archaeological Perspectives**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2002. p. 3–30.

TEIXEIRA-SANTOS, I. et al. The evidence of medicinal plants in human sediments from Furna do Estrago prehistoric site, Pernambuco State, Brazil. **Quaternary International**, mar. 2015.

UKWUBILE, C. A. Anti-Helminthic Properties of Some Nigerian Medicinal Plants on Selected Intestinal Worms in Children (Age 5-13) in Ogurugu, South East Nigeria. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 03, n. 09, 2012.

VIEITES, R. G. Os estudos de Samuel Pessoa e Luiz Jacintho da Silva e a geografia médica no Brasil. **HYGEIA, Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v. 10, n. 18, p. 140–148, 2014.

VIVIAN, R. G. The Archaic Period. In: VIVIAN, R. G. (Ed.). **. The Chacoan Prehistory of the San Juan Basin**. 1. ed. San Diego, California: Academic Press, 1990a. v. Volume in the New World Archaeological Record Series.

VIVIAN, R. G. The Puebloan Period: A. D. 1120 - 1220. In: **The Chacoan Prehistory of the San Juan Basin**. 1. ed. San Diego, California: Academic Press, 1990b. v. Volume in the New World Archaeological Record Seriesp. 331–383.

VIVIAN, R. G. **The Chacoan prehistory of the San Juan Basin**. San Diego: Academic Press, 1990c.

VIVIAN, R. G. The Puebloan Period: A.D. 400 - 700. In: **The Chacoan Prehistory of the San Juan Basin**. 1. ed. San Diego, California: Academic Press, 1990d. v. Volume in the New World Archaeological Record Seriesp. 111–132.

VIVIAN, R. G. The Puebloan Period: A.D. 700 - 920. In: **The Chacoan Prehistory of the San Juan Basin**. 1. ed. San Diego, California: Academic Press, 1990e. v. Volume in the New World Archaeological Record Seriesp. 135–164.

VIVIAN, R. G. The Puebloan Period: A.D. 920 - 1020. In: **The Chacoan Prehistory of the San Juan Basin**. 1. ed. San Diego, California: Academic Press, 1990f. v. Volume in the New World Archaeological Record Seriesp. 167–220.

VIVIAN, R. G.; HILPERT, B. The Rise of Chaco: A Brief Story. In: VIVIAN, R. G.; HILPERT, B. (Eds.). **The Chaco Handbook: An Encyclopedic Guide**. 2. ed. Salt Lake City: The University of Utah Press, 2012a. p. 9–16.

VIVIAN, R.; HILPERT, B. **The Chaco handbook: an encyclopedic guide**. Salt Lake City: University of Utah Press, 2012b.

WALTER, D. E.; HUDGENS, R. A.; FRECKMAN, D. W. Consumption of nematodes by fungivorous mites, *Tyrophagus* spp. (Acarina: Astigmata: Acaridae). **Oecologia**, v. 70, n. 3, p. 357–361, 1986.