



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública
Departamento de Endemias Samuel Pessoa



Helmintos, protozoários e algumas idéias: novas perspectivas na paleoparasitologia

Marcelo Luiz Carvalho Gonçalves

Rio de Janeiro

2002

Helmintos, protozoários e algumas idéias: novas perspectivas na paleoparasitologia

Marcelo Luiz Carvalho Gonçalves

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

Orientador: Dr. Adauto Araújo,
Pesquisador Titular, Dept^o de Endemias,
ENSP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro

2002

aos meus pais, Luiz e Lourdes

à tia Wlady

à Ana Luiza, com carinho

**" A cada dia Deus nos dá uma tela nova,
quem escolhe as cores somos nós"**

Frei Clemente Kesselmeier

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra possibilitaram a conclusão do meu doutorado. Em especial, gostaria de expressar a minha gratidão

ao Dr. Adauto Araújo, mais que orientador, amigo e conselheiro, pelos momentos agradáveis de convívio, pelo entusiasmo e por tudo que tem me ensinado, com paciência e competência.

ao Dr. Luiz Fernando Ferreira, patrono e referência, pela amizade, convívio, pragmatismo, estímulo e conselhos.

À Natalina Jordão de Oliveira, Paulo Cezar Martins e Marcus Vinícius da Costa, do Laboratório de Paleoparasitologia, pelo companheirismo, disponibilidade e ajuda permanentes.

à Dra. Lais Clark de Lima, Gino Rocha e Fernanda Rick, pela amizade e incentivo constante.

À Rosemere Duarte, pela amizade e auxílio nas reações de imunodiagnóstico.

À Dra. Sheila Mendonça de Souza, Dra. Márcia Chame, Dr. Otílio Machado Bastos e Dr. Antônio Nascimento Duarte, pela sugestões metodológicas e incentivo recebidos.

Aos amigos e colaboradores da Secretaria do Departamento de Endemias da Escola Nacional de Saúde Pública, Jussara, Carla, Nair, Leni, Cristiano e Amâncio, pela acolhida generosa.

Ao fraterno amigo Dr. Alberto Novaes Ramos Jr., pelo incentivo desde a primeira hora, com companheirismo e apoio irrestritos.

Aos queridos amigos Dr. Plínio Resende do Carmo Jr. e Dra. Maria Chiara Chindamo, pela imensa amizade, incentivo e presença constante nos momentos difíceis.

À Dra. Diana Maul de Carvalho, pelo incentivo e conselhos.

Aos demais professores e colegas do curso de pós-graduação da ENSP, pelo convívio agradável.

À Secretaria e à Coordenação da Pós-Graduação da ENSP.

À ENSP.

Ao CNPq.

A todos, minha sincera gratidão.

RESUMO

A pesquisa de parasitos em vestígios humanos pode trazer informações sobre questões tais como a origem e antiguidade da relação parasito-hospedeiro, distribuição de parasitos através do tempo, hábitos e migrações humanas pré-históricas. Parasitos encontrados em sítios arqueológicos e paleontológicos constituem uma importante fonte de informação para estudos filogenéticos e de coevolução parasito-hospedeiro. A análise de ácidos nucleicos de tais parasitos abre novas perspectivas para estudos sobre evolução ao nível molecular.

Nessa tese nós avaliamos a utilização de um teste imunológico (ELISA) para a detecção de *Giardia duodenalis* em vestígios fecais humanos, provenientes de sítios arqueológicos. O *kit* utilizado, disponível comercialmente, utiliza anticorpos monoclonais para detectar a presença de antígeno específico de *Giardia* (GSA 65) em fezes humanas. Foram analisadas 83 amostras, previamente examinadas através de microscopia óptica. O teste imunológico foi mais sensível que o exame microscópico, detectando 3 amostras positivas, sendo a mais antiga com 800 anos. Não houve reações cruzadas com outros helmintos. O emprego da técnica de ELISA em material arqueológico vai ampliar o quadro com a distribuição desta parasitose no passado.

Apresentamos ainda uma revisão dos achados paleoparasitológicos de helmintos e protozoários intestinais disponíveis na literatura. Relatamos também novos achados de ancilostomídeos, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Trichostrongylus* spp., *Diphyllobothrium latum*, *Hymenolepis nana* e acantocéfalos, decorrentes do exame parasitológico das amostras do acervo do Laboratório de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.

De acordo com os resultados, pode-se afirmar que *A. lumbricoides*, originalmente um parasito humano, se adaptou ao porco após sua domiciliação. Discutimos também rotas alternativas para a introdução de geo-helmintos humanos nas Américas. Tais helmintos, encontrados no Novo Mundo já em épocas pré-colombianas, não podem ter sido introduzidos nas Américas por via terrestre pela Beríngia.

Palavras-Chave: paleoparasitologia; coprólitos; coproantígenos; parasitos; povoamento do Novo Mundo.

ABSTRACT

The search of parasites in ancient human remains can throw light on such questions as origin and antiquity of parasite-host relationship, general distribution of parasites through time and prehistoric human migrations. It can be a tool in the interpretation of habits and migrations of prehistoric populations. Parasites found in archaeological and paleontological sites can reveal much information about phylogenetic and co-evolution of parasites. The nucleic acid based techniques of parasites found in archaeological material open a new perspective to evolution at a molecular level.

We assessed the utility of a commercially available enzyme immunoassay (ELISA) kit for diagnosis of giardiasis in archaeological human remains. The kit is based on a monoclonal antibody to detect the presence of *Giardia* Specific Antigen 65 in human feces. A total of 83 specimens, previously examined microscopically for parasites were examined. The ELISA detected 3 positive samples, one of the samples as old as 800 years. The immunoassay was superior to direct observation. The results did not show cross reactivity between this protozoa and helminths. The use of ELISA to detect *G. duodenalis* coproantigen could help the diagnosis of giardiasis in ancient human remains.

A review of the paleoparasitological helminth and intestinal protozoa findings available in the literature is also presented. We report the new paleoparasitologic findings from the examination we performed in samples collected in New and Old World archaeological sites. New finds of ancylostomid, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Trichostrongylus* spp., *Diphyllobothrium latum*, *Hymenolepis nana* and Acantocephala eggs are reported.

According to the results, *A. lumbricoides* was originally a human parasite, adapting to pigs after pig domestication. We also discussed alternative routes for human parasite introduction into the Americas. Human ancylostomids, *A. lumbricoides* and *T. trichiura*, found in the New World in pre-Columbian times, have not been introduced into the Americas by land via Beringia.

Key Words: paleoparasitology; coprolites; coproantigens; parasites; New World peopling

SUMÁRIO

Introdução	página 01
Parasitos, parasitismo e paleoparasitologia molecular	página 04
Paleoparasitologia no Brasil	página 13
Detection of <i>Giardia duodenalis</i> antigen in coprolites using a commercially available enzyme immunoassay	página 20
Human intestinal parasites in the past: new findings and a review	página 38
Considerações finais	página 86
Bibliografia	página 89

INTRODUÇÃO

Em janeiro de 2000 iniciei o doutorado em Saúde Pública no Laboratório de Paleoparasitologia do Departamento de Endemias da Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ). Dentro das linhas de pesquisa do laboratório, acolhi a sugestão de fazer uma avaliação crítica da principal via migratória humana pré-histórica para as Américas, a partir do exame parasitológicos dos coprólitos do laboratório. Apesar de grande parte dos coprólitos já ter sido examinada em ocasiões anteriores, com várias publicações a respeito pela equipe do laboratório, encontrei muitos achados novos.

Optamos por apresentar a tese na forma de três artigos científicos. A nosso ver, essa modalidade é muito mais prática e objetiva que o modelo de tese tradicional, uma vez que propicia uma divulgação mais prática e rápida dos resultados obtidos. Na realidade foram quatro artigos, sendo que em três fui o autor principal, como determinam as normas do Curso de Pós-Graduação da ENSP.

Iniciei nosso trabalho fazendo uma revisão da paleoparasitologia, desde os seus primeiros momentos com a microscopia óptica até os tempos da biologia molecular e das reações em cadeia da polimerase. Revisamos suas potencialidades e limitações, tanto no estudo dos parasitos propriamente ditos como nas inferências epidemiológicas, nos estudos das relações parasito-hospedeiro e nas análises de migrações humanas no passado. Discutimos ainda alguns conceitos do fenômeno parasitismo. Esta revisão foi apresentada nos dois primeiros artigos da série de quatro. O primeiro foi publicado nos **Anais da Academia Nacional de Medicina**, volume 160, de 2000 e o segundo em **Ciência & Saúde Coletiva**, volume 7, de 2002.

Durante o exame dos coprólitos e do material orgânico proveniente de fossas antigas, sempre nos causou algum grau de frustração a quase total ausência de protozoários nas amostras. Os cistos de protozoários não têm tanta resistência à dessecação como os ovos e mesmo as larvas de helmintos, não mantendo assim sua integridade ao longo do tempo (Gonçalves et al., 2002). Resolvemos tentar a utilização, no material arqueológico, de uma técnica utilizada na prática clínica para o diagnóstico de giardíase. Utilizamos um kit comercialmente disponível para a detecção do antígeno GSA65, específico de *Giardia duodenalis*, através de ensaio imunoenzimático (ELISA) com anticorpos monoclonais.

Obtivemos resultados muito promissores, tendo sido possível fazer a detecção de *G. duodenalis* em coprólitos humanos provenientes de sítios arqueológicos de Antelope House, Arizona, EUA e em fossas medievais das cidades de Lübeck, na Alemanha, e de Namur, na Bélgica. O diagnóstico por ELISA mostrou-se mais sensível que o exame direto, positivo em apenas uma das três amostras. Os resultados estão descritos no terceiro artigo da série. Esse trabalho foi aceito para publicação no periódico **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. Com custo relativamente elevado, não foi nossa intenção realizar esse exame em todas as nossas amostras, apenas testar sua aplicabilidade e confiabilidade em material antigo.

Apesar do uso de técnicas imunológicas para o diagnóstico de enteroprotzoários já ter sido empregado em coprólitos (Allison et al., 1999; Faulkner et al., 1989; Fouant et al., 1982), a utilização de anticorpos monoclonais, com muito maior sensibilidade e especificidade, ainda não tinha sido empregada com essa finalidade. Igualmente foi a primeira vez em que se fez o diagnóstico de giardíase na Europa Medieval.

No quarto trabalho fizemos uma revisão de todos os achados paleoparasitológicos disponíveis na literatura especializada. A confecção de tabelas por parasito, com local de origem do material arqueológico e com sua datação fornece uma visão mais clara e completa dos dados parasitológicos do passado. Os dados resultantes da revisão do material do nosso laboratório, 894 amostras de coprólitos e sedimento de fossas antigas considerados de origem humana, foram igualmente lançados nas tabelas. Muitas das amostras foram examinadas pela primeira vez, enquanto que a maioria foi re-examinada. Os achados novos e os provenientes de exames antigos não previamente publicados foram lançados nas tabelas como novos achados

Foi possível identificar casos novos de ancilostomídeos, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Trichostrongylus* spp., *Diphyllobothrium latum*, *Hymenolepis nana* e acantocéfalos, ampliando o conhecimento sobre a ocorrência dessas parasitoses no espaço e no tempo. Discutimos neste artigo algumas peculiaridades dos parasitos encontrados, bem como as dificuldades metodológicas do exame paleoparasitológico. Questões clássicas como a identificação da origem zoológica do material fecal e a questão do encontro de parasitos não humanos em coprólitos humanos, os falsos parasitismos, foram abordadas.

Novas teorias sobre o deslocamento humano para o Novo Mundo podem ser apoiadas ou refutadas em função de algumas evidências paleoparasitológicas. Através

do achado de geohelmintos, nesse quarto artigo discutimos o modelo clássico de povoamento pré-histórico das Américas através do Estreito de Bering, durante a última era glacial. Esse artigo foi aceito para publicação em um número dedicado à paleoparasitologia das **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.

Os artigos estão compilados dentro da formatação exigida por cada um dos periódicos científicos em que foram publicados ou aceitos para publicação.

Parasitos, parasitismo e paleoparasitologia molecular

Este artigo foi escrito com o objetivo de discutir alguns conceitos sobre o fenômeno parasitismo a partir das idéias do artigo original do Prof. Luiz Fernando Ferreira, de 1973. Fazemos um histórico da paleoparasitologia, com algumas considerações sobre suas potencialidades. Fazemos ainda uma breve revisão das principais técnicas de biologia molecular já aplicadas em estudos paleoparasitológicos.

Paleoparasitologia no Brasil

Este artigo foi escrito a pedido do Prof. Francisco Salzano para compor um número especial da revista dedicado à aplicação da genética à saúde pública. Aspectos relacionados à filogenia de parasitos, técnicas de biologia molecular e povoamento das Américas sob a ótica paleoparasitológica são apresentados.

Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme immunoassay

Este artigo foi escrito a partir dos resultados que obtivemos com o emprego da técnica de detecção de antígenos específicos de *G. duodenalis* em material arqueológico, através de ensaio imunoenzimático com anticorpos monoclonais. O objetivo foi testar a aplicabilidade do método em coprólitos e no sedimento de fossas antigas.

Human intestinal parasites in the past: new findings and a review

Este artigo foi fruto do exame paleoparasitológico do acervo de coprólitos e sedimentos orgânicos, considerados como de origem humana, do Laboratório de Paleoparasitologia da ENSP. Os dados da revisão dos achados paleoparasitológicos disponíveis na literatura especializada são apresentados na forma de tabelas. Discutimos também migrações pré-históricas para as Américas sob o ponto de vista dos achados paleoparasitológicos.

PARASITOS, PARASITISMO E PALEOPARASITOLOGIA MOLECULAR

Adauto Araújo¹

Luiz Fernando Ferreira¹

Léa Camillo-Coura¹

Marcelo Gonçalves²

¹Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública
Rua Leopoldo Bulhões, 1480
21041-210, Rio de Janeiro, Brasil
adauto@ensp.fiocruz.br
tel.: 21 598-2587

²Universidade Federal do Rio de Janeiro
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

Agradecimentos: aos colegas Marcia Chame e Sérgio Chaves pelas sugestões e críticas.

Financiamento: CNPq/PRONEX; PAPES/FIOCRUZ

RESUMO:

A associação parasito-hospedeiro é muito mais ampla do que a simples presença do primeiro no organismo do outro. O enfoque ecológico do fenômeno parasitismo procura entender as relações entre estes dois organismos como um processo evolutivo cuja origem remonta à própria origem da vida. Ao se rever conceitos sobre o fenômeno parasitismo, procura-se dar ênfase aos recentes avanços das técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico de infecções parasitárias em material arqueológico. O isolamento e replicação de material genético, com datações de alguns milhares de anos, possibilita estudos evolutivos da relação parasito-hospedeiro, com implicações possíveis sobre virulência de parasitos e origem e evolução de doenças infecciosas.

Unitermos: paleoparasitologia; origem do parasitismo; evolução; infecções parasitárias; doenças infecciosas; aDNA

SUMMARY:

Host-parasite association extends beyond the simple presence of a parasite in a host organism. The ecological approach of the parasitism phenomenon tries to understand host-parasite relationships as an evolutionary process, which origins are related to the origin of life itself. As parasitism phenomenon concepts are reviewed, emphasis is directed to the recent advances in molecular biology techniques, applied to infectious diseases diagnosis in archaeological material. Thousand year old genetic material recovered and replicated may allow evolutive studies of host-parasite relationships, with possible involvement on parasite virulence, and in the origin and evolution of infectious diseases studies.

Keywords: paleoparasitology; origin of parasitism; evolution; parasitic infections; infectious diseases; aDNA

INTRODUÇÃO

O emprego de técnicas da biologia molecular para recuperar material genético em vestígios orgânicos arqueológicos está a esboçar uma nova perspectiva para estudos filogenéticos. A possibilidade de se comparar genomas de parasitos, separados por intervalos de tempo de alguns milhares de anos, abre um campo fértil para estudos sobre origem e evolução das doenças parasitárias, seus agentes etiológicos e hospedeiros.

Nos últimos quinze anos tem-se visto uma variedade de infecções parasitárias diagnosticadas em populações pré-históricas através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR – *polymerase chain reaction*). Como antes já se consolidara na paleoparasitologia, através do encontro de formas parasitárias em material arqueológico, o que se chama aqui de paleoparasitologia molecular é o estudo das relações parasito-hospedeiro a nível molecular, abrindo perspectivas inéditas para abordagem evolutiva das associações biológicas ao longo do tempo, real e recuperado do passado.

Sobre este mesmo caminho interpõem-se novas teorias sobre as relações parasito-hospedeiro, voltadas, sobretudo, para coevolução e modelos de virulência, e o próprio conceito de parasitismo.

Neste artigo faz-se um resumo das atuais discussões sobre parasitismo e virulência parasitária e suas correlações com os achados de parasitos em material arqueológico, dos tempos clássicos à paleoparasitologia molecular.

PARASITISMO

A parasitologia é um ramo da ecologia. Parasitos são organismos que encontram em outro organismo de espécie diferente, chamado hospedeiro, o seu nicho ecológico.

Os estudos sobre ecologia de parasitos vêm contribuindo para novas análises, uma vez que constituem uma grande fração de espécies existentes, ocupam níveis distintos na cadeia trófica e, sem dúvida, têm influência pronunciada na evolução de seus hospedeiros⁵⁹.

O conceito ecológico do fenômeno parasitismo amplia a definição do organismo hospedeiro como hábitat²⁵ ou mesmo como ambiente⁵⁸. Ao entender-se nicho ecológico não apenas como o local onde se encontra o parasito, mas o conjunto de fatores ou variáveis que possibilitam a sobrevivência e a reprodução das

espécies^{53,37}, podem-se compreender melhor as interações e interdependências que comprometem as funções vitais entre parasitos e hospedeiros.

O conceito de nicho ecológico no parasitismo implica nas interfaces parasito-hospedeiro, como acontece em qualquer biocenose onde o nicho é representado por um hipervolume de n-dimensões, circundado pelos limites de tolerância das espécies^{53,9}.

A origem do parasitismo confunde-se com a origem da vida. A necessidade de obter energia para persistir como espécie e manter-se frente aos processos seletivos, levou os organismos a diferentes formas de relacionamento com o ambiente, uma delas chamada parasitismo.

Sob o enfoque ecológico o fenômeno parasitismo é visto como sinônimo de simbiose. Embora utilizem os termos parasitos e endossimbiontes intracelulares, alguns autores consideram o simbiote como um patógeno atenuado, enquanto organelas de células eucariotas são consideradas como derivadas de simbiontes²⁰. Por exemplo, mitocôndrias e plastídios de eucariotas são considerados de origem bacteriana, correspondem a um relacionamento parasitário ancestral que, de tão estreito e dependente, tornou-se imprescindível a ambos, parasito – mitocôndria, plastídio – e hospedeiro – célula eucariota - exercendo papel fundamental na história evolutiva dos organismos.

Uma classe especial de seqüências de ADN, relacionadas aos vírus e chamadas de transposons, encontram-se inseridas no genoma do hospedeiro. Nele se replicam, copiando-se a si mesmas e inserindo a cópia em outra parte do genoma³⁵. Possuem mecanismos regulatórios que aumentam ou diminuem sua ação sobre a célula hospedeira²¹.

Transposons, bem como mitocôndrias e plastídios significam resquícios de parasitismos cujo sucesso coevolutivo com o hospedeiro mede-se pelo surgimento e diversidade de células procariotas e eucariotas. Pode-se propor, portanto, que a origem celular tenha como ponto de partida o parasitismo, através da dependência metabólica inicial até a dependência genética estabelecida no material hereditário.

O parasitismo surgiu de modo independente, por diversas vezes na história biológica, em diferentes linhagens de organismos⁷⁴. O fenômeno parasitismo é observável em toda a natureza, em todos os seres vivos, como hospedeiros ou parasitos, e pode tornar-se parte do próprio sucesso evolutivo ou extinção de ambos.

Infecção parasitária refere-se à presença de parasitos no organismo hospedeiro, sejam eles, em amplo senso, vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos, vegetais, artrópodos ou vertebrados. Mas doença parasitária implica o conceito

médico de um conjunto de sinais e sintomas que caracterizam determinada parasitose, diagnosticada pela presença ou vestígios do parasito em questão. A simples presença do parasito em determinado hospedeiro não significa, necessariamente, doença parasitária²⁵.

Por muito tempo os livros de parasitologia viram o parasitismo sob o enfoque da parasitologia médica. Havia uma distinção clássica entre parasitos inócuos, ditos comensais ou mesmo simbioses, e aqueles que sempre provocam lesões no hospedeiro, chamados então de parasitos verdadeiros, com graus variáveis de virulência. Entretanto, à medida que a parasitologia cresceu sob o enfoque biológico, onde os limites entre agressão, equilíbrio e inocuidade na relação parasito-hospedeiro-ambiente, tornaram-se de difícil contorno, tais conceitos foram e estão sendo revistos^{65,17,35}.

Ewald²³ propõe uma epidemiologia evolutiva, que busca entender como as características, que a epidemiologia tradicional identifica como importantes – mortalidade, morbidade, taxas de transmissão, prevalência –, mudaram com o tempo à medida que hospedeiros e parasitos evoluíram em resposta um ao outro, e em relação ao ambiente.

Conceitos clássicos dizem que quanto menor a virulência, mais adaptado encontra-se o parasito em seu hospedeiro, sendo o inverso reflexo de uma invasão recente ou de desequilíbrio da relação. Giorgio³⁸ comenta, entretanto, que o grau de virulência é determinado pela seleção natural com o intuito de maximizar a transmissão do parasito, e pode não ser, necessariamente, um indicativo da antigüidade da relação parasito-hospedeiro. Neste aspecto, o trabalho de Frank³⁵ faz uma ampla discussão sobre virulência, sob enfoque evolutivo, classificando parasitos em aqueles que exploram o hospedeiro de forma prudente, tirando recursos sem causar dano notável, e outros que o fazem rápida e vigorosamente. Ambas as formas apresentam vantagens e desvantagens evolutivas.

Existem outros pontos sobre parasitismo que estão sendo revistos. Um deles refere-se à redução da complexidade estrutural e tendência à diminuição da massa corporal. Por definição, parasitos são menores do que seus hospedeiros, causando a impressão generalizada de que seu caminho evolutivo tende à redução de tamanho. Entretanto, faltam comparações entre as espécies de vida livre com ancestrais de espécies de atuais parasitos. Assim também diz-se que a tendência evolutiva entre parasitos é para uma alta taxa de fecundidade. Poulin⁷⁴ discute estes dois aspectos tidos como adaptações ao parasitismo com argumentação contrária a eles, exemplificando com as características morfológicas dos nematódeos parasitos de mamíferos que fazem ciclo pulmonar, cestódeos, e comparações entre taxas de fecundidade de ectoparasitos e artrópodos de vida livre. Morand & Sorci⁶³ discutem estes aspectos entre nematódeos parasitos e de

vida livre, enfatizando estratégias evolutivas e sua dependência em relação ao hospedeiro.

O conceito de especificidade parasitária é importante para se entender relações filogenéticas entre hospedeiros. Alguns parasitos são muito específicos para determinadas espécies de hospedeiros. Sua origem no grupo filético de hospedeiros remonta a ancestrais e, assim, pode-se estudar filogenia de hospedeiros de acordo com parasitos que se encontram em espécies relacionadas entre si. Um exemplo característico é a espécie de oxiurídeo que parasita o hospedeiro humano e seus parentes mais próximos. O nematódeo *Enterobius vermicularis* é um parasito de Antropoidea, encontrado em humanos, gorilas e chimpanzés, mas não em outros macacos africanos ou sul-americanos^{12,52}.

Por outro lado, outros parasitos foram adquiridos por espécies de hospedeiros ao longo de sua evolução sem que os tenham herdado de ancestrais. Isto pode acontecer através do próprio ambiente, em que espécies de vida-livre, ditas pré-adaptadas ao parasitismo, entram em contacto com o potencial hospedeiro e passam a infectá-lo. Outros são os casos em que determinada espécie de parasito de um grupo de hospedeiros se adapta a outra espécie distante filogeneticamente da anterior, quando estes hospedeiros passam a ocupar ou dividir ecossistemas ou habitats próximos. Um exemplo do primeiro caso são algumas espécies de amebas de vida livre, pré-adaptadas ao parasitismo que, ao entrarem em contacto com o possível hospedeiro são capazes de infectá-lo e manterem-se nele. Outros são os casos de parasitos de animais que se adaptaram à espécie humana ao se tornarem domesticados, ou vice-versa. Em algumas situações a adaptação não se completa, como por exemplo no caso de *Toxocara canis*, em que as larvas infectantes circulam no hospedeiro humano mas não se tornam vermes adultos no intestino, isto é, não chegam a completar seu ciclo evolutivo.

Têm-se, portanto, duas grandes vias de origem de parasitos nas espécies atuais de hospedeiros: a via filogenética, em que os parasitos foram herdados de ancestrais e a outra, chamada via ecológica, em que os parasitos foram adquiridos do ambiente ou de outros hospedeiros não relacionados filogeneticamente.

Uma importante linha de pesquisa é a que estuda a filogenia e coevolução de parasitos e seus hospedeiros. Esta metodologia foi empregada por pioneiros, como von Ihering em fins do século passado no Brasil^{32,55}, pouco tempo depois da publicação da teoria de evolução natural de Charles Darwin. Baseia-se na chamada regra de Farenholz, segundo a qual os parasitos e seus hospedeiros evoluem em sincronia. Recentemente, esta teoria foi testada através de estudos de química de proteínas elaborados com parasitos e hospedeiros relacionados filogeneticamente, mostrando similaridades entre as espécies do grupo estudado⁴².

Alguns especialistas, entretanto, vêm esta metodologia com cautela, pois, como foi dito, determinadas espécies de parasitos foram adquiridas do ambiente em que circula o hospedeiro. Portanto, a confiabilidade do método pressupõe o conhecimento da origem filogenética ou ecológica da espécie de parasito para que os resultados reflitam a coevolução das espécies.

Embora tenha-se dito que parasitos não deixam fósseis⁶⁰, ou raramente o fazem e assim a evolução de parasitos pode ser somente reconstruída através de uma análise de relações entre espécies vivas⁷⁴, há muito a paleoparasitologia desmentiu esta afirmação. Tanto as lesões características de doenças infecto-parasitárias diagnosticadas em ossos ou corpos mumificados, como o encontro de parasitos em material arqueológico e paleontológico, trouxeram novos dados para esta linha de investigação. A seguir se fazem breves comentários sobre o histórico e achados da paleoparasitologia e as possibilidades de estudos filogenéticos com a introdução das técnicas de biologia molecular neste novo campo da ciência.

PALEOPARASITOLOGIA E AS TÉCNICAS DA BIOLOGIA MOLECULAR

Os trabalhos publicados em paleoparasitologia foram revistos por Ferreira et al.²⁷ e Reinhard et al.⁷⁹. Desde então, a pesquisa de parasitos em material arqueológico expandiu-se e introduziram-se novas técnicas. A mais importante delas foi a aplicação das técnicas da biologia molecular para recuperação de material genético de parasitos. Também o uso de técnicas adaptadas da análise de pólen foram aplicadas em sedimentos arqueológicos e coprólitos mineralizados para recuperar ovos de parasitos, ampliando-se o espectro de análise. Revê-se aqui o desenvolvimento destas técnicas e perspectivas de estudo por elas proporcionadas.

Pode-se dividir a história da paleoparasitologia em períodos, como o Período dos Pioneiros, em que se iniciavam os trabalhos e se implantavam as técnicas básicas. Este período é importante, pois marca o início da associação entre parasitologistas e arqueólogos.

Paleoparasitologia é o estudo de parasitos em material arqueológico. O primeiro a registrar a presença de ovos de parasitos em material antigo foi Sir Marc Armand Ruffer⁸², diagnosticando ovos de *Schistosoma haematobium* em tecido renal de múmias egípcias. Conseguiu preparações histológicas após desenvolver técnica de reidratação para cortar e corar tecidos mumificados, possibilitando o diagnóstico de diversas doenças em populações do antigo Egito⁸³. Embora tenham sido publicados alguns outros trabalhos^{91,73,92,47}, foi somente a partir de 1960, como se verá adiante, que se multiplicaram os encontros de parasitos em material antigo e, finalmente, em 1979, esta nova ciência foi chamada de Paleoparasitologia, em 1979, por Ferreira et al.²⁶.

Inicialmente os parasitologistas que analisaram coprólitos (fezes dessecadas ou mineralizadas) tentaram diferentes técnicas de concentração de ovos de parasitos, apenas efetivas quando o material não estava completamente consolidado e se hidratava em água destilada ou hidróxido de sódio e potássio^{92,88}. Entretanto, não se conseguia aplicar as técnicas de rotina de análise parasitológica, nem se obtinham preparações em lâminas duradouras. Somente com a introdução da técnica de reidratação de coprólitos em solução aquosa de fosfato trissódico¹⁴, uma adaptação da técnica usada para recuperar espécimens dessecados em coleções de museu⁹³, multiplicaram-se os achados em coprólitos e outros tipos de material arqueológico, como os coletados diretamente de corpos mumificados, em fossas e latrinas medievais^{10,11}. Assim, esta técnica permitiu o encontro de parasitos e seu diagnóstico em populações do passado.

A partir de 1960 e durante a década seguinte, multiplicaram-se os achados de parasitos em populações pré-históricas, sobretudo em sítios arqueológicos nos estados do Arizona, Utah, Colorado e Nevada, nos Estados Unidos. Estes estudos mostraram que o parasitismo tem uma grande antiguidade em populações humanas. Esta pode ser considerada uma fase de descobertas. Em 1967, Aidan Cockburn, fundador da Paleopathology Association em Detroit, Estados Unidos, disse que o estudo de coprólitos tinha um grande potencial para definir a evolução das doenças infecciosas em relação à evolução cultural, exortando os parasitologistas a interpretar seus dados numa perspectiva epidemiológica¹⁸. Esta mensagem alcançou parasitologistas nas Américas do Norte e do Sul e também na Europa. Estes trabalhos podem ser encontrados nas revisões de Fry³⁶, Araújo et al.², Horne⁵¹ e Nozais⁶⁶.

Na década seguinte, os trabalhos puderam-se voltar para interpretações paleoepidemiológicas. Este período caracteriza-se por discussões sobre novas questões metodológicas. Um dos pontos importantes para a epidemiologia de infecções no passado está centrado no diagnóstico da origem zoológica dos coprólitos encontrados nas camadas arqueológicas, e no próprio diagnóstico das formas de parasitos observadas. Chame et al.¹⁶ prepararam uma coleção de referência de fezes dessecadas de animais atuais para comparação com coprólitos da mesma região dos sítios arqueológicos. Este método mostrou ser eficiente quando se trata da mesma fauna, isto é, quando não há alteração da fauna da época pré-histórica para a atual.

Alguns procedimentos semelhantes se fizeram em relação aos parasitos, como o uso de listas de referência de hospedeiros, baseadas em comparações morfométricas, como propõe a paleoparasitologia experimental^{56,19}. Entretanto, deve-se considerar a extinção e modificação eventual da composição faunística.

Outra questão refere-se à presença de parasitos não habitualmente encontrados em populações humanas atuais. Na primeira parte deste artigo discutiu-se a especificidade parasitária e as vias filogenética e ecológica pelas quais a espécie humana adquiriu seus parasitos. Mas há casos em que se devem fazer interpretações cuidadosas dos achados para evitar erros de diagnóstico. Um exemplo pode ser encontrado em Moore et al.⁶², cujo diagnóstico de ovos de acantocéfalos parasitos de animais em coprólitos supostamente humanos ainda é controverso. Uma análise cuidadosa pode identificar casos de falso parasitismo em humanos, como eventualmente em populações indígenas em cujas fezes se encontram ovos de *Capillaria*, nematódeo parasito de animais.

Durante estas duas décadas a paleoparasitologia avançou baseada no diagnóstico por parâmetros morfométricos, sendo o microscópio óptico o instrumento dos cientistas dedicados à ela.

Outras técnicas de diagnóstico incluíram a imunologia e o uso da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão³. Estes trabalhos voltaram-se principalmente para o diagnóstico diferencial entre helmintos, fungos e pólen⁷⁹. O diagnóstico sorológico foi usado para identificar a infecção por protozoários em coprólitos^{34,24}.

Uma visão de um quadro de infecções parasitárias em populações pré-históricas começa hoje a ser esboçado, com distribuição pela maioria das regiões ocupadas pela espécie humana, em tempos determinados por datações e localizadas no espaço pelo registro arqueológico. Esta distribuição permite que se levantem questões sobre migrações pré-históricas de seus hospedeiros humanos. Pode ser dito que a paleoparasitologia passou de um período descritivo para um enfoque de contribuições à patocenose, conceito criado por Grmek³⁹ referente a condições ambientes, às relações parasito-hospedeiro e ao conjunto de situações que permitem determinada infecção se instalar em determinada população, no passado.

Estudos quantitativos também mostraram interessantes padrões epidemiológicos. Em regiões semi-áridas dos Estados Unidos, os antigos caçadores-coletores mostraram uma pequena prevalência de infecções parasitárias intestinais em relação a populações de agricultores. Os resultados mostraram também uma dominância de parasitos de origem zoonótica em caçadores-coletores, enquanto os agricultores eram parasitados por parasitos específicos humanos, isto é, de origem filogenética⁷⁶. Estudos de infecções em agricultores pré-históricos mostraram que a prevalência de parasitos era dependente de padrões sanitários, tipos de moradia e ambiente local^{77,78}. Um estudo detalhado do tipo de moradia através de 10.000 anos de ocupação no sudoeste dos Estados Unidos mostrou que a infecção por *Enterobius vermicularis* estava relacionada a diversas condições de moradia presentes nas diferentes populações⁸⁰.

Reinhard⁷⁷ desenvolveu técnica de recuperação de ovos de parasitos em solo e sedimento arqueológico, com solução ácida e adicionando esporos de fungos em número conhecido para quantificação dos parasitos encontrados. Estes trabalhos foram feitos principalmente em sítios da América do Norte e em Israel^{75,87}.

Quanto a coprólitos mineralizados, utilizam-se soluções ácidas, como ácido clorídrico a 10% para separação de partículas e visualização microscópica. Em alguns casos foi possível o diagnóstico de larvas de nematódeos em coprólitos de uma espécie extinta de hiena, datados de até 1.500.000 anos, na Itália²⁹. Recentemente descreveram-se ovos de cestódeos em coprólitos fossilizados de felídeos, na América do Sul, datados de 43.000 anos²², e Jouy-Avantin et al.⁵⁷ diagnosticaram ovos de *Dicrocoelium sp* em coprólitos de animais do pleistoceno europeu, datados de até 500.000 anos.

Dentre os parasitos, os helmintos constituem o achado mais comum em material arqueológico. Ovos e larvas podem ficar muito bem preservados pela dessecação ou, em alguns casos, pela mineralização. Quanto aos protozoários, sua presença em material antigo tem sido assinalada com menor frequência^{73,96,28}. Os protozoários teciduais são ainda mais raramente diagnosticados. Algumas lesões paleopatológicas foram descritas em corpos mumificados, relacionadas a protozoários. Rothhammer et al.⁸¹, em cortes histológicos, formas teciduais identificadas como de *Trypanosoma cruzi*, em populações pré-históricas andinas. Fornaciari et al.³³ usaram a microscopia eletrônica e técnicas histoquímicas, confirmando o diagnóstico de infecção chagásica em múmias peruanas. Allison et al.¹ usaram anticorpos fluorescentes para identificar a infecção por *Cryptosporidium sp* e *Giardia sp* em coprólitos coletados de corpos mumificados.

Uma importante contribuição da paleoparasitologia refere-se às migrações pré-históricas humanas e povoamento das Américas. Como já foi dito, parasitos podem apresentar alta especificidade em relação ao hospedeiro possibilitando estudos filogenéticos⁷ e, por isso, é possível buscar indícios sobre a origem de determinadas populações humanas através de sua fauna parasitária.

Desde o início do século parasitologistas voltaram-se para a linha de estudo de migrações pré-históricas humanas e parasitismo, onde se destacam as contribuições de Olímpio da Fonseca. Seus estudos sobre populações indígenas isoladas e seus parasitos trouxeram contribuições para as teorias de povoamento das Américas, introduzindo um novo marcador, neste caso biológico, às argumentações de ordem cultural sobre origem e caminhos migratórios de populações pré-históricas³².

Mas sempre se questionam dados baseados em populações supostamente isoladas pois, através de qualquer contato com outra população, em passado recente,

haveria possibilidade de se introduzirem infecções e assim confundir dados de análise.

A partir do desenvolvimento da paleoparasitologia, retomou-se esta linha que trouxe como dado novo o encontro do parasito em material arqueológico, afastando fatores de confundimento epidemiológico. Os achados de ancilostomídeos, *Trichuris trichiura*, e *Enterobius vermicularis* em coprólitos humanos do período pré-colombiano, por exemplo, permitiram novas discussões sobre a origem de determinadas populações humanas e seus hospedeiros nos continentes^{4,5,30}. A construção do quadro da distribuição passada de infecções parasitárias, através do encontro de parasitos em material arqueológico, possibilita especulações sobre origem de populações e seu relacionamento com outras, de outras regiões, e pode auxiliar na questão de migrações internas em diferentes espaços ocupados pela espécie humana.

Esta é uma linha cujos resultados se acumulam, criando dados consistentes para discussões sobre origem de populações de hospedeiros em territórios conquistados no passado, através da reconstrução de caminhos possíveis para os parasitos encontrados, em rotas migratórias seguidas pelos hospedeiros.

Hoje, novas perspectivas de diagnóstico de parasitos em material arqueológico estão abertas com a introdução da biologia molecular e algumas aplicações são revistas aqui.

Durante os últimos dez anos começou-se a usar a tecnologia baseada no ácido nucleico para o diagnóstico de doenças infecciosas. Abriu-se um campo imenso de interpretações de resultados para a epidemiologia, prevenção e controle de doenças parasitárias.

A técnica baseia-se na detecção de seqüências específicas e conhecidas de ADN ou ARN de parasitos. O uso da reação em cadeia da polimerase (PCR) fundamenta-se na replicação *in vitro* da dupla hélice da molécula de ADN, usada para amplificar o ADN situado entre regiões de uma seqüência conhecida. Oligonucleotídeos são usados como sondas para uma série de reações catalisadas por uma enzima, chamada ADNpolimerase. A PCR é a síntese de milhões de cópias de um segmento específico de ADN.

O ADN antigo, ou *ancient DNA* (aDNA), significa o ácido nucleico recuperado de espécimens arqueológicos, paleontológicos ou de museus. Num senso amplo pode ser aplicado para qualquer ácido nucleico recuperado depois da morte, quando se inicia o processo de autólise⁴⁸.

A hibridização foi a primeira técnica a ser usada para recuperar material genético de material arqueológico. Higuchi et al.⁴⁹ conseguiram o primeiro clone molecular

usando restos de pele de uma espécie de zebra extinta. Pääbo⁶⁷ e Wilson et al.⁹⁵ trabalharam com ADN humano de origem arqueológica. Entretanto, para hibridização, necessita-se de grande quantidade de ADN. Em 1985 incorporou-se a técnica da reação em cadeia da polimerase, que apresenta grande sensibilidade e facilidade de operação. Tornou possível a aplicação em pequenas quantidades de ácido nucleico de origem humana, de outros animais e de vegetais.

A técnica da PCR foi descrita por Mullis et al.⁶⁴ e Saiki et al.^{84,85}. Pääbo^{68,69} adaptou-a para material arqueológico. O ADN antigo foi então amplificado de ossos humanos e tecidos mumificados^{43,50,46,44,70}. Brown & Brown¹³ e Pääbo^{70,71} fizeram revisões sobre a importância desta técnica para a arqueologia mostrando suas perspectivas e limites. Stone et al.⁹⁰ e Monsalve et al.⁶¹ mostraram suas possibilidades para estudos de determinação de sexo em esqueletos e relações filogenéticas entre populações pré-históricas.

A técnica da PCR tem sido aplicada para diagnóstico de várias doenças infecto-parasitárias em diversas populações pré-históricas. Entre elas, a infecção por *Borrelia burgdorferi* em carrapatos de coleção de museu⁷², *Mycobacterium tuberculosis* em corpos mumificados humanos^{89,86} e nematódeos parasitos de humanos⁵⁴. Ainda que apresente dificuldades metodológicas, sobretudo referentes a inibição de reação e ou contaminação ambiente por ADN do próprio laboratório ou durante a escavação, a reação tem alta sensibilidade e confiabilidade.

O diagnóstico de infecção por *Leishmania amazonensis* foi feito em peles de roedores conservadas em coleção do Museu Nacional, UFRJ, por mais de quarenta anos¹⁵. Em coprólitos humanos de Minas Gerais, datados de até 4000 anos, identificou-se material genético de bactérias⁶.

O diagnóstico de Doença de Chagas e outras infecções parasitárias através de técnicas da biologia molecular em populações pré-históricas, vem se desenvolvendo em nosso laboratório, na Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz, desde 1995, em trabalho conjunto com pesquisadores dos Departamentos de Medicina Tropical e de Bioquímica e Biologia Molecular, do Instituto Oswaldo Cruz. Inicialmente testou-se e foi preparado um protocolo experimental, antes de se usar o material antigo. Somente após o ajuste da técnica aplicável em material arqueológico, procederam-se às análises em tecidos mumificados provenientes do deserto de Atacama, no Chile, diagnosticando-se a infecção por *Trypanosoma cruzi* há pelo menos 2000 anos nesta região^{8,6,1}. Recentemente, Guhl et al.^{40,41} e Ferreira et al.³¹ encontraram múmias chilenas datadas de 4000 a 2000 anos do presente, positivas para Doença de Chagas pela reação da polimerase em cadeia (PCR) e hibridização.

Os primeiros resultados com a técnica da PCR e suas variantes se acumulam, fazendo-se diagnósticos de infecções parasitárias em material antigo até há pouco tempo impossíveis com a microscopia óptica. Além dos resultados obtidos em material mumificado, já se iniciam as pesquisas em remanescentes ósseos⁴⁵, ampliando sobremaneira as possibilidades de diagnóstico em níveis populacionais, permitindo então maior consistência para análises paleoepidemiológicas. Maior ainda é a perspectiva de se trabalhar com análise de genética populacional e infecções parasitárias, através de dados obtidos pela biologia molecular em populações pré-históricas^{95,94}. Este enfoque poderá trazer respostas sobre variações na virulência de patógenos que, conjuntamente com os estudos de paleoecologia de parasitos em diferentes patocenoses, possibilitará maior entendimento sobre emergência e reemergência de doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS

1. ALLISON, MJ; BERGMAN, T & GERSZTEN, E – Further studies on fecal parasites in antiquity. **Am J Clin Pathol** **112**: 605-609, 1999.
2. ARAÚJO, A; FERREIRA, LF & CONFALONIERI, U - A contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. **Rev Bras Biol** **41**: 873-881, 1981.
3. ARAÚJO, A; FERREIRA, LF; CONFALONIERI, U & MEIRELLES, MN – Microscopia de varredura de larvas de ancilostomídeos encontradas em coprólitos humanos datados de 3490±120 a 430±70 anos. **An Simp Tec Esp Micr Eletr**, Caxambu, MG, 1986. P.66.
4. ARAÚJO, A & FERREIRA, LF – Oxiuríase e migrações pré-históricas. **Manguinhos** **1 (II)**: 99-109, 1995.
5. ARAÚJO, A & FERREIRA, LF – Homens e parasitos: a contribuição da paleoparasitologia para a questão da origem do homem na América. **Rev da USP** **34**: 58-70, 1997.
6. ARAÚJO, A; REINHARD, K; BASTOS, OM; CANTARINO, L; PIRMEZ, C; IÑIGUEZ, A; VICENTE, AC; MOREL, CM & FERREIRA, LF – Paleoparasitology: perspectives with new techniques. **Rev Inst Med Trop São Paulo** **40**: 371-376, 1998.
7. ARAÚJO, A; FERREIRA, LF & REINHARD, K - Dos caçadores de micróbios à paleoparasitologia molecular. **Ciência Hoje** **152**: 32-38, 1999.
8. BASTOS, OM; ARAÚJO, A; FERREIRA, LF; SANTORO, A; WINKER, P & MOREL, CM – Experimental paleoparasitology: identification of *Trypanosoma cruzi* DNA in desiccated mice tissue. **Paleopathol News** **94**: 5-8, 1996.
9. BEGON, M; HARPER, JL & TOWNSEND, CR – Ecology: individual populations and communities. Blackwell Sci Publ, 1987. P. 72-74
10. BOUCHET, F & PAICHELER, JC – Paleoparasitologie: presumption of Bilharziose on an archaeological site from XVth century of Montbeliard (Doubs, France). **C R Acad Sci** **318**: 811-814, 1995.
11. BOUCHET, F; LEFEVRE, C; WEST, D & CORBETT, D – First paleoparasitological analysis of a mummy in the Aleutian islands (Alaska): results and limits. **J Parasitol** **85**: 369-372, 1999.

12. BROOKS, G – Pinworms and primates: a case study in coevolution. **Proc Helminthol Soc Washington** **49**: 76-85, 1982.
13. BROWN, TA & BROWN, KA – Ancient DNA and the archaeologist. **Antiquity** **66**: 10-23, 1992.
14. CALLEN, EO & CAMERON, TWM - A prehistoric diet as revealed in coprolites. **New Sci** **8**: 35-40, 1960.
15. CANTARINO, L; ARAÚJO, A; SABROZA, P; FERREIRA, LF; FERNANDES, O & PIRMEZ, C - *Leishmania amazonensis* in taxidermized rodents. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **93**: 182-183, 1998.
16. CHAME, M; FERREIRA, LF; ARAÚJO, A & CONFALONIERI, U – Experimental paleoparasitology: an approach to the diagnosis of animal coprolites. **Paleopathol News** **76**: 7-9, 1991.
17. CHENG, TC - General Parasitology. Acad. Press, New York, San Francisco, London. 965pp., 1973.
18. COCKBURN, A – Infectious Diseases: their evolution and eradication. Charles C. Thomas Publ., USA, 1967.
19. CONFALONIERI, U; RIBEIRO, BM; FERREIRA, LF & ARAÚJO, A – The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. **Paleopathol News** **51**: 9-11, 1985.
20. CORSARO, D; VENDITTI, D; PADULA, M & VALASSINA, M Intracellular life. **Crit Rev Microbiol** **25**: 39-79, 1999.
21. DOOLITTLE, WF; KIRKWOOD, TBL & DEMPSTER, MAH Selfish DNAs with self-restraint. **Nature** **307**: 501-502, 1984.
22. DUARTE, AN; VERDE, M; UBILLA, M; ARAÚJO, A; MARTINS, PC; REINHARD, KJ & FERREIRA, LF – Note on parasite eggs in mineralized carnivora coprolites from the upper pleistocene Sopas Formation, Uruguay. **Paleopathol News** **107**: 6-8, 1999.
23. EWALD, PW Evolution of infectious diseases. Oxford University Press. pp. 3-13, 1994.
24. FAULKNER, CT – Prehistoric diet and parasitic infection in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated human paleofeces. **Am Antiquity** **56**: 687-700, 1991.

25. FERREIRA, LF – O Fenômeno Parasitismo. **Rev Soc Bras Med Trop** **4**: 261-277, 1973.
26. FERREIRA, LF; ARAÚJO, A & CONFALONIERI, U – Subsídios para a paleoparasitologia do Brasil: parasitos encontrados em coprólitos no município de Unaí, MG. **An V Congr Soc Bras Parasitol**: 66, 1979.
27. FERREIRA, LF; ARAÚJO, A & CAMILLO-COURA, L- Paleoparasitologia. **An Acad Nac Med** **152**: 22-25, 1992.
28. FERREIRA, LF; ARAÚJO, A; CONFALONIERI, U; CHAME, M & RIBEIRO, BM – *Eimeria* oocysts in deer coprolites dated from 9,000 years B.P. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **87**: 105-106, 1992.
29. FERREIRA, LF; ARAÚJO, A & DUARTE. AN – Nematode larvae in fossilized animal coprolites from lower and middle pleistocene sites, central Italy. **J Parasitol** **79**: 440-442, 1993.
30. FERREIRA, LF; REINHARD, KL; ARAÚJO, A & CAMILLO-COURA, L – Paleoparasitology of oxyuriasis. **An Acad Nac Med** **157**: 20-24, 1997.
31. FERREIRA, LF; BRITTO, C; CARDOSO, MA; FERNANDES, O; REINHARD, K & ARAÚJO, A – Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. **Acta Tropica**, 2000 (in press).
32. FONSECA filho, O - Parasitismo e Migrações Humanas Pré-Históricas. Mauro Familiar, Ed., Rio de Janeiro, 446pp. 1972.
33. FORNACIARI, G; CASTAGNA, M; VIACAVA, P; TOGNETI, A; BEVILACQUA, G & SEGURA, EL – Chagas' disease in Peruvian Inca mummy. **Lancet** **339**: 128-1129, 1992.
34. FOUANT, MM; ALLISON, MJ & GERSZTEN, E – Intestinal parasitic infestations among pre-Columbian Indians. **Lab Invest** **46**: 26 A, 1982.
35. FRANK, SA. Models of parasite virulence. **Quater Rev Biol** **71**: 37-78, 1996.
36. FRY, GF - Analysis of prehistoric coprolites from Utah. **Anthropol Papers, Univ Utah**, **97**, 1976. 45pp.
37. FUTUYMA, DJ – Evolutionary Biology. 2nd Ed., Sinauer Ass.Inc., Sunderland, Massachusetts, 1986. 600pp.

38. GIORGIO, S - Moderna visão da evolução da virulência. **Rev Saúd Públ 29:** 398-402,1995.
39. GRMEK, MD – Les maladies à l’aube de la civilisation occidentale. Paris, Payot, 1983.
40. GUHL, F; JARAMILLO, C; YOCKTENG, R; VALLEJO, GA & ARROYO, FC – *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. **Lancet 349:** 1370, 1997.
41. GUHL, F; JARAMILLO, C; VALLEJO, GA; YOCKTENG, R; CÁRDENAS-ARROYO, F; FORNACIARI, G; ARRIAZA, B & AUFDERHEIDE, AC - Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000-Year-old mummified human tissue from Northern Chile. **Am J phys Anthropol 108:** 401-407, 1999.
42. HAFNER, MS & NADLER, SA - Phylogenetic trees support coevolution of parasites and their hosts. **Nature 332:** 258-259, 1988.
43. HAGELBERG, E; SKYES, B & HEDGES, R – Ancient bone DNA amplified. **Nature 342:** 485, 1989.
44. HAGELBERG, E & CLEGG, JB – Isolation and characterization of DNA archaeological bone. **Proc R Soc London 244:** 45-50, 1991.
45. HAGELBERG, E; BELL, LS; ALLEN, T; BYDE, A; JONES, SJ & CLEGG, JB – Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. **Phil Trans R Soc London 333:** 399-407, 1991.
46. HANNI, C; LAUDET, A; SAKKA, M; BEGUE, A & STEHELIN, D – Amplification of mitochondrial DNA from ancient human teeth bones. **C Rend Acad Sci Paris (series III) 310:** 365-370, 1990.
47. HELBAEK, H – Studying the diet of ancient man. **Archaeol 14:** 95-101, 1958.
48. HERRMANN, B & HUMMEL, S – Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. New York Springer Verlag, 1994.
49. HIGUCHI, R; BOWMAN, B; FREIBERGER, B; RYDER, OA & WILSON, AC – DNA sequence from the quagga, na extinct member of the horse family. **Nature 312:** 282-284, 1984.
50. HORAY, S; HAYASAKA, K; MURAYAMA, K; WATE, N; KOIKE, J & NAKAI, N – DNA amplification from ancient human skeletal remain and their sequence analysis. **Proc Japan Acad 65:** 229-233, 1989.

51. HORNE, PD – A review of the evidence of human endoparasitism in the pre-Columbian New World through the study of coprolites. **J Archaeol Sci** **12**: 299-310, 1985.
52. HUGOT, JP; REINHARD, KJ; GARDNER, SL & MORAND, S – Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. **Parasite** **6**: 201-208, 1999.
53. HUTCHINSON, GE – An introduction to population ecology. New Haven and London, Yale Univ Press, 1980. P.152-212.
54. IÑIGUEZ, AM; FERREIRA, LF; ARAÚJO, A & VICENTE, ACP – Diagnóstico paleoparasitológico molecular em populações pré-históricas: análise da região do gene ribossomal 5S de nematódeos. **Gen Mol Biol** **22**:322, 1999.
55. von IHERING, H – On the ancient relations between New Zeland and South America. **Trans Proc New Zeland Inst** **24**, 1891.
56. JONES, AKG – Human parasite remains: prospects for a quantitative approach. In: A.R. Hall & H.K. Kenwards (Eds.) – Environmental archaeology in the urban context. Res. Report n. 43, Council for British Archaeology, 1982. p. 66-70.
57. JOUY-AVANTIN, F; COMBES, C; de LUMLEY, H; MISKOVSKI, JC & MONÉ, H - Helminth eggs in animal coprolites from a Middle Pleistocene Site in Europe. **J Parasitol** **85**: 376-379, 1999.
58. LEVINE, N – Infectious blood diseases of man and animals. Acad. Press, 1968.
59. MAY, RM & ANDERSON, RM – Parasite-host coevolution. In: DJ Futuyma & M Slatkin – Coevolution. Sinauer Ass Inc., Sunderland, Massachusetts, 1983. Pp 186-206.
60. MANTER, HM – Some aspects of the geographical distribution of parasites. **J Parasitol** **53**: 1-9, 1967.
61. MONSALVE, MV; CARDENAS, F; GUHL, F; DELANEY, AD & DEVINE, DV – Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. **Ann Hum Gen** **60**: 293-303, 1996.
62. MOORE, JG; FRY, GF & ENGLERT Jr, E – Thorny-headed worm infection in North American prehistoric man. **Science** **163**: 1324-1325, 1969.
63. MORAND, S & SORCI, G - Determinants of life-history evolution in Nematodes. **Parasitol Today** **14**: 193-196, 1998.

64. MULLIS, KB; FALOONA, FA; SCHARF, S; SAIKI, R; HORN, G & ERLICH, H – Specific enzymatic amplifications of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp Quant Biol** **14**: 263-273, 1986.
65. NOBLE, ER & NOBLE, G A – Parasitology: The biology of animal parasites. 3rd ed., Philadelphia, Lea & Febiger, Ed., 1971.
66. NOZAIS, JP – Hypothèses sur l'origine de certains parasites du continent latino-américain. – **Bull Soc Pathol Ex** **78**: 401-412, 1985.
67. PÄÄBO, S – Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. **Nature** **314**: 644-645, 1985.
68. PÄÄBO, S - Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. **Proc Nat Acad Sci** **86**: 1939-1943, 1989.
69. PÄÄBO, S – Amplifying ancient DNA. In: J. Innis (Ed.) – PCR protocols: a guide to methods and applications. San diego Academic Press, 1990. p.159-166.
70. PÄÄBO, S - Amplifying DNA from archaeological remains: a meeting report. **PCR Met Applic** **1**: 107-110, 1991.
71. PÄÄBO, S – Ancient DNA. **Sci Amer** Nov., 60-66, 1993.
72. PERSING, DH; TELFORD, SR; RYS, PN; DODGE, DE; WHITE, SE & SPIELMAN, - A. Detection of *Borrelia burgdoferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. **Science** **249**: 1420-1423, 1990.
73. PIZZI, T & SCHENONE, H – Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. **Bol Chil Parasitol** **9**: 73-75, 1954.
74. POULIN, R - Evolution of parasite life history traits: myths and reality. **Parasitol Today** **11**: 342-345, 1995.
75. REINHARD, KJ; HEVLY, RH & ANDERSON, GA – Helminth remains from prehistoric Indian coprolites from the Colorado Plateau. **J Parasitol** **70**: 630-639, 1987.
76. REINHARD, KJ – The impact of diet, and parasitism on anemia in the prehistoric West. In: P Stuart-McAdam & S Kent (Eds) – Demography and Disease: changing perspectives of anemia. Aldine de Gruyter, New York, 1992. p. 219-258.

77. REINHARD, KJ – Parasite ecology of two Anasazi villages. In: EJ Reitz; LA, Newson & SJ Scudder (Eds.) – Case studies in environmental archaeology. New York: Plenum Press, 1996.
78. REINHARD, KJ – Parasitology. In: Mummies, disease, and ancient cultures. A Cockburn; E Cockburn & TA Reyman (Eds.), Cambridge, Cambridge Univ Press, 1998.
79. REINHARD, KJ; CONFALONIERI, U; HERRMANN, B; FERREIRA, LF & ARAÚJO, A – A recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological techniques. **Homo 37**: 2117-239, 1988.
80. REINHARD, KJ; GARDNER, SL & HUGOT, JP – Evolutionary history of enterobiasis. **An Meet Paleopathol Ass**, 1997.
81. ROTHHAMMER, F; ALLISON, MJ; NUÑEZ, L; STANDEN, V & ARRIZA, B – Chagas' disease in pre-Columbian South America. **Am J Phys Anthropol 68**: 495-498, 1985.
82. RUFFER, MA – Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the Twentieth Dynasty (1250-1000 BC). **Brit Med J 1**: 16, 1910.
83. RUFFER, MA - Studies in Paleopathology of Egypt. R Moodie, Ed, New York, 1921.
84. SAIKI, RK; SCHARF, SJ & JALOONA, F – Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science 230**: 1350-1354, 1985.
85. SAIKI, RK ; GELFAND, DH & STOFELL, F – Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science 239**: 487-491, 1989.
86. SALO, WL; AUFDERHEIDE, AC; BUIKSTRA, J & HOLCOMB, T - Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. **Proc Natl Acad Sci 91**: 2091-2094, 1994.
87. SAMUELS, R – Parasitological study of long-dried fecal samples. In: D. Osborne & B.S. Katz (Eds) – Contributions to the Wetherill Mesa archaeological project. **Mem Soc Amer Archaeol 19**: 175-179, 1965.
88. SANDISON, AT – Parasitic diseases. In: D. Brothwell & A.T. Sandison (Eds.) – Diseases in antiquity. C.C. Thomas, Springfield, 1967. p. 178-183.

89. SPIGELMAN, J & LEMMA, E - The use of polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. **Int J Osteoarchaeol** **3**: 137-143, 1993.
90. STONE, AC; MILNER, GR; PÄÄBO, S & STONEKING, M – Sex determination of ancient human skeletons using DNA. **Am J phys Anthropol** **99**: 231-238, 1996.
91. SZIDAT, L - Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor-und frühgeschichtlichen Moorleichen. **Zeitschr für Parasit** **13**: 265-274, 1944.
92. TAYLOR, EL – Parasitic helminths in mediaeval remains. **Vet Rec** **67**: 216-218, 1955.
93. VAN-CLEAVE, HJ & ROSS, JA – A method for reclaiming dried zoological specimens. **Science** **105**: 318, 1947.
94. WILSON, SM – Application of nucleic acid-based technologies to the diagnosis and detection of disease. **Trans R Soc Trop Med & Hyg** **87**: 609-611, 1993.
95. WILSON, AC; CANN, RL; CARR, SM; GEORGE, M; GYLLENSTEN, UB; HELM-BYCHOWSKI, KM; HIGHUCHI, RG; PALUMBI, SR; PRAGER, EM; SAGE, RM & STONEKING, M - Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol J Linn Soc** **26**: 375-400, 1985.
96. WITEMBERG, G - Human parasites in archaeological findings. **Bull Israel Expl Soc** **25**: 86, 1961.

ARTIGO

Paleoparasitologia no Brasil

Paleoparasitology in Brasil

Marcelo L. C. Gonçalves¹
Adauto Araújo¹
Luiz Fernando Ferreira¹

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

Key-words: *paleoparasitology, coprolites, ancient feces, mummies, ancient diseases*

Resumo

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

Palavras-chave: paleoparasitologia, coprólitos, fezes antigas, múmias, doenças no passado

Introdução

Paleoparasitologia é o ramo da Paleopatologia que estuda os parasitos em material arqueológico ou paleontológico. No início do século XX, os estudos pioneiros de Sir Marc Armand Ruffer, quando descreve ovos de *Schistosoma haematobium* nos rins de múmias egípcias, lançam a pedra fundamental da nova ciência. Ruffer desenvolveu técnicas de reidratação de tecidos

¹ Departamento de Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo

mumificados, possibilitando preparações histológicas e conseqüentemente o diagnóstico de doenças em populações do antigo Egito. O intercâmbio com egiptólogos ampliou as perspectivas de estudo dos parasitos do passado (Ruffer, 1921).

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

O uso de solução aquosa de fosfato trissódico como reidratante, uma adaptação da técnica usada para recuperar espécimens dessecados em coleções de museu, impulsionou a paleoparasitologia a partir da década de 60. Este método, utilizado em coprólitos preservados por dessecação, permitiu o uso de técnicas parasitológicas comumente aplicadas nos laboratórios clínicos (Callen & Cameron, 1960; Reinhard et al., 1988). Os achados de ovos e larvas de parasitos tornaram-se mais freqüentes e começou-se a perceber as potencialidades desta nova ciência, com todas as suas implicações no estudo da evolução das relações parasito-hospedeiro e nos estudos de dispersão das espécies. A Paleoparasitologia mostrou desde logo sua vocação para a interdisciplinaridade.

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

A técnica clássica

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

A técnica consiste na retirada de um fragmento do coprólito. Caso o coprólito esteja preservado por dessecação, a reidratação é feita com solução aquosa de fosfato trissódico (Na_3PO_4) a 0,5% por 72 horas (Callen & Cameron, 1960). Em caso de coprólito mineralizado, utiliza-se ácido clorídrico 10% até sua desagregação, conforme a técnica de Jones (1983).

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

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

Os coprólitos e a paleoepidemiologia

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

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

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

A paleoparasitologia e as migrações pré-históricas

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

A análise da distribuição de infecções parasitárias no passado possibilita especulações quanto às migrações humanas em diferentes regiões ao longo do tempo assim como contatos inter-populacionais, uma vez que, sob a ótica evolucionista, uma determinada espécie biológica não surge em mais de um ponto geográfico. Com isso, pode-se confirmar ou refutar teorias de povoamento e propor alternativas com base em achados paleoparasitológicos (Horne, 1985; Nozais, 1985; Araújo & Ferreira, 1997).

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

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

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

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

Os novos horizontes: biologia molecular e *ancient DNA*

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

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

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

O diagnóstico de infecção chagásica em múmias sul-americanas datadas em até 4.000 anos através da técnica de *PCR*, com a amplificação de mini-círculos do cinetoplasto do *Trypanosoma cruzi*, confirmou a antiguidade da infecção humana por este parasito (Guhl et al., 1997, 1999; Ferreira et al., 2000). Entretanto, a hipótese de que tenha sido conseqüente à domiciliação do *Triatoma infestans* em regiões andinas e posteriormente se distribuído pelo continente poderá ser confrontada com novos dados paleoparasitológicos. A possibilidade do encontro de *DNA* de *T. cruzi* em esqueletos humanos de sítios arqueológicos, como os da Serra da Capivara, Piauí, onde se localizam alguns dos mais antigos sítios arqueológicos das Américas, descortina uma nova hipótese, a de que a doença de Chagas seja tão antiga no continente quanto os humanos. Os

vestígios arqueológicos mostraram a presença de animais reservatórios e vetores em áreas ocupadas pelos primeiros habitantes da região.

A paleoparasitologia molecular e a filogenia

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

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

Referências

- Allison MJ, Pezzia A, Hasegawa, I & Gerszten E 1974. A case of hookworm infection in a pre-Columbian American. *American Journal of Physical Anthropology* 41: 103-106.
- Araújo A & Ferreira LF 1995. Oxiuríase e migrações pré-históricas. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos* 1: 99-109.
- Araújo A & Ferreira LF 1996. Paleoparasitology and the peopling of the Americas. *Fundamentos* 1:106-114.
- Araújo A & Ferreira LF 1997. Homens e parasitos: a contribuição da paleoparasitologia para a questão da origem do homem na América. *Revista da Universidade de São Paulo* 34: 58-70.
- Araújo A & Ferreira LF 2000. Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationships. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 89-93.
- Araújo A, Ferreira LF & Confalonieri U 1981. A contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. *Revista Brasileira de Biologia* 41: 873-881.

- Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U & Chame M 1988. Hookworms and the peopling of America. *Cadernos de Saúde Pública* 2: 226-233.
- Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U, Nuñez L & Ribeiro BM 1985. The finding of *Enterobius vermicularis* eggs in pre-Columbian human coprolites. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 80: 141-143.
- Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC & Holcomb TA 1995. Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *American Journal of Physical Anthropology* 98: 37-45.
- Baer JG 1969. *Diphyllobothrium pacificum*, a tapeworm from sea lions endemic in along the coastal area of Peru. *Journal Fisheries Research Board of Canada* 26: 717-723.
- Bastos OM, Araújo A, Ferreira LF, Santoro A, Wincker P & Morel LC 1996. Experimental paleoparasitology: identification of *Trypanosoma cruzi* DNA in desiccated mouse tissues. *Paleopathology Newsletter* 94: 5-8.
- Bellocq JG, Ferté H, Depaquit J, Justine JL, Tillier A & Desset MCD 2001. Phylogeny of the Trichostrongylina (Nematoda) inferred from 28S rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19: 430-442.
- Callen EO & Cameron TWM 1960. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Scientist* 8: 35-40.
- Chame M, Ferreira LF, Araújo A & Confalonieri U 1991. Experimental paleoparasitology: an approach to the diagnosis of animal coprolites. *Paleopathology Newsletter* 76: 7-9.
- Chilton NB & Gasser RB 1999. Sequence differences in the internal transcribed spacers of DNA among four species of hookworm (Ancylostomatoidea: Ancylostoma). *International Journal for Parasitology* 29: 1971-1977.
- Confalonieri U, Ferreira LF, Araújo A & Ribeiro BM 1988. The use of a statistical test for the identification of helminth eggs in coprolites. *Paleopathology Newsletter* 62: 7-8.

- Ferreira LF & Araújo A 1996. On hookworm in the Americas and trans-pacific contact. *Parasitology Today* 12: 454.
- Ferreira LF, Araújo A & Confalonieri UEC 1979. Subsídios para a paleoparasitologia do Brasil. I. Parasitos encontrados em coprólitos no município de Unaí, MG. *Resumos de IV Congresso Brasileiro de Parasitologia*, Campinas, p.56.
- Ferreira LF, Araújo A & Confalonieri UEC 1980. Finding of helminth eggs in human coprolites from Unaí, MG. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 798-800.
- Ferreira LF, Araújo A & Confalonieri UEC 1983. The finding of helminth eggs in a Brazilian mummy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77: 65-67.
- Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri UEC, Chame M & Ribeiro BM 1987. Encontro de ovos de ancilostomídeos em coprólitos humanos datados de 7230 ± 80 anos, Piauí, Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 59: 280-281.
- Ferreira LF, Araújo, A, Confalonieri UEC & Nuñez L 1984. The finding of eggs of *Diphyllbothrium* in human coprolites (4,100 – 1,950 B.C.) from Northern Chile. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 79: 175-180.
- Ferreira LF, Britto C, Cardoso A, Fernandes O, Reinhard K & Araújo A 2000. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues of Chilean mummies. *Acta Tropica* 75: 79-84.
- Fladmark KR 1979. Routes: Alternate migration corridors for early man in North America. *American Antiquity* 44: 55-69.
- Fonseca O 1972. *Parasitismo e migrações humanas pré-históricas*. Rio de Janeiro: Mauro Familiar, Editor.
- Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B & Aufderheide AC 1999. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000-year-old mummified human tissue from Northern Chile. *American Journal of Physical Anthropology* 108: 401-407.

- Guhl F, Jaramillo C, Yockteng R, Vallejo GA & Arroyo FC 1997. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *Lancet* 349: 1370.
- Hänni C, Laudet V & Stehelin D 1991. Paléontologie et biologie moléculaire: la rencontre de deux mondes. *Biofutur* 98: 55-58.
- Horne PD 1985. A review of the evidence of human endoparasitism in the pre-columbian New World through the study of coprolites. *Journal of Archaeological Sciences* 12: 299-310.
- Hugot JP, Reinhard KJ, Gardner SL & Morand S 1999. Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. *Parasite* 6: 201-208.
- Jones AKG 1983. A coprolite from 6-8 pavement. In: *Environment and living conditions at two Anglo-Scandinavian sites*, pp. 225-229 York: University of York.
- Le TH, Blair D & McManus DP 2000. Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny. *Acta Tropica* 77: 243-246.
- Loreille O, Roumat E, Verneau O, Bouchet F & Hänni C 2001. Ancient DNA from *Ascaris*: extraction amplification and sequences from eggs collected in coprolites. *International Journal of Parasitology* 31: 1101-1106.
- Manter HW 1967. Some aspects of the geographical distribution of parasites. *Journal of Parasitology* 53: 1-9.
- Nozais JP 1985. Hypothèses sur l'origine de certains parasites du continent latino-américain. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique* 78: 401-412.
- Patrucco R, Tello R & Bonavia D 1983. Parasitological studies of coprolites of prehispanic peruvian populations. *Current Anthropology* 24: 393-394.
- Persing DH, Telford SR, Rys PN, Dodge DE, White SE & Spielman A 1990. Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. *Science* 249: 1420-1423.

- Pizzi T & Schenone H 1954. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. *Boletín Chileno de Parasitología* 9: 73-75.
- Reinhard KJ 1992. The impact of diet and parasitism on anemia in the prehistoric West. In: Diet, demography and disease: changing perspectives of anemia (P. Stuart-McAdam & S. Kent, org.), pp. 219-258, New York: Aldine deGryeter.
- Reinhard KJ, Confalonieri U, Ferreira LF, Herrmann B & Araújo A 1988. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo* 37: 217-239.
- Reinhard KJ, Hevly RH & Anderson GA 1987. Helminth remains from prehistoric Indian coprolites from the Colorado Plateau. *Journal of Parasitology* 70: 630-639.
- Ruffer MA 1921. *Studies in Paleopathology of Egypt*. New York: R Moodie, Ed., University of Chicago Press.
- Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J & Holcomb T 1994. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-columbian peruvian mummy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 2091-2094.
- Spigelman J & Lemma E 1993. The use of polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons. *International Journal of Osteoarchaeology* 3: 137-143.
- Szidat L 1944. Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor-und frühgeschichtlichen Moorleichen. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 13: 265-274.
- Taylor EL 1955. Parasitic helminths in mediaeval remains. *Veterinary Record* 67: 216-218.
- Wilke PJ & Hall HJ 1975. *Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography*. Berkeley: University of California, Archaeological Reserch Facility, Department of Anthropology.

Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme immunoassay

Marcelo Luiz Carvalho Gonçalves¹

Adauto Araújo¹

Rosemere Duarte¹

Joaquim Pereira da Silva¹

Karl Reinhard²

Françoise Bouchet³

Luiz Fernando Ferreira¹

¹ *Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil*

² *School of Natural Resources Sciences, University of Nebraska - Lincoln, Lincoln, USA*

³ *Laboratoire de Pâleoparasitologie EA3308, associé CNRS ESA 8045, U. F. R. de Pharmacie,*

Université de Reims, Reims, France

Address for correspondence: Adauto Araújo, Escola Nacional de Saúde Pública -

Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões 1480, CEP 21041-210,

Rio de Janeiro, Brazil; e-mail: adauto@ensp.fiocruz.br

Fax: + 55 21 25982610.

Abstract

The objective of this experiment was to assess the utility of a commercially available enzyme immunoassay (ELISA) kit for diagnosis of giardiasis in archaeological human remains. The kit, a monoclonal antibody assay, is used to detect the presence of *Giardia* Specific Antigen 65 (GSA65) in human feces. We utilized the assay in ancient fecal material. The material included desiccated feces found in mummies or in archaeological sites and sediments from latrines. A total of 83 specimens, previously examined microscopically for parasites were examined. The ELISA detected 3 positive samples, dated to about 1200 *Anno Domini* (AD), 1600 AD and 1700 AD. The ELISA was superior to direct observation. It was possible to identify *Giardia duodenalis* cysts by direct microscopy in only one of these samples. The results did not show cross reactivity between this protozoa and helminths. The use of ELISA to detect *G. duodenalis* coproantigen could help the diagnosis of giardiasis in ancient human remains.

Keywords: paleoparasitology, coprolites, giardiasis, ELISA, ancient faeces

Introduction

Paleoparasitology is the study of parasites in archaeological material. Normally, paleoparasitologists in the Americas analyze coprolites which are desiccated fecal material found in mummies or in archaeological sites. Detection of protozoa in coprolites poses a challenge to paleoparasitology. Unlike helminth eggs and larvae, protozoan cysts are not so resistant to the environmental conditions of archaeological sites. The vulnerability of cysts to decay may result in artificially low estimations of protozoa in paleoparasitology as indicated by the infrequent finding of protozoan cysts in coprolites compared to helminth eggs (REINHARD *et al.*, 1986). Also there is considerable day to day variation in cyst excretion that decreases the sensitivity of conventional coprolite examination. A single microscopic examination of fresh feces from patients infected with *Giardia duodenalis* (syn. *G. lamblia*, *G. intestinalis*) yields false negative results in up to 50% of patients (BURKE, 1977; WOLFE, 1978). Therefore, it is particularly difficult to identify *G. duodenalis* in archaeological sites.

Some *G. duodenalis* antigens appear to remain detectable for long periods of time. FAULKNER *et al.* (1989) succeeded in obtaining positive indirect immunofluorescent antibody test to *G. duodenalis* in a coprolite 2177 years old. ALLISON *et al.* (1999) using fluorescent monoclonal antibody and ELISA obtained positive results in coprolites 500 to 3000 years old.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of *G. duodenalis* antigens in fresh or preserved feces have been useful in the diagnosis of giardiasis. Several studies have found ELISA to be a tool with very high sensitivity and specificity for *G. duodenalis* copro-antigen detection (JANOFF *et al.*, 1989; ROSOFF

et al., 1989; ADDISS *et al.*, 1991; SCHEFFLER & VAN ETTA, 1994; ALDEEN *et al.*, 1998; GARCIA *et al.*, 2000).

We conducted a study to assess the utility of a commercially available ELISA kit for the detection of a *G. duodenalis*-specific stool antigen, the *Giardia* Specific Antigen 65 (GSA65), in archaeological samples. ELISA results were compared with those from conventional coprolite examination. The detection of *G. duodenalis* coproantigen in coprolites could be a method for giardiasis diagnosis in ancient human remains.

Materials and Methods

Specimens

A total of 83 coprolites and sediment samples, previously examined microscopically for helminth eggs and larvae at the paleoparasitology laboratory, National School of Public Health - FIOCRUZ, Brazil, were tested for *G. duodenalis* antigen. Their archaeological origin and dates are listed in Table 1. The samples were dated either by ^{14}C method or by cultural context. A sample of fresh feces, positive for *G. duodenalis* cysts by direct wet mount method, was used as positive control. It was desiccated at 37°C for 2 weeks (an experimental coprolite) and was tested following the same procedures used for coprolite samples. This method of experimental production of coprolites has proven useful in identifying diagnostic criteria for other parasites (CONFALONIERI *et al.*, 1985). All specimens were also reexamined for helminth eggs and larvae, as well as for protozoan cysts.

Conventional examination of coprolites

The specimens were rehydrated by immersion in a 0.5% aqueous solution of trisodium phosphate for 72 hours, following the technique of CALLEN & CAMERON (1960). The rehydrated sample solutions were mixed approximately 10:1 in acetic formalin solution (Raillet Henry solution) to retard fungal and bacterial growth (REINHARD *et al.*, 1986). The material was allowed to sediment following the technique proposed by LUTZ (1919). A portion of each sediment was used for microscopic examination. The material was placed on a slide and covered with a coverslip (22 by 22 mm) and examined for the presence of parasites. Twenty slides for each sample were examined at magnification of X100 and X400.

A portion of each rehydrated sample was also examined by the zinc-sulphate flotation method (FAUST *et al.*, 1938). Five slides for each sample were examined at magnification of X100 and X400. All wet preparations were examined by at least two of the authors.

Enzyme-linked immunosorbent assay

The ProSpecT *Giardia* Microplate assay (Alexon, Inc., Sunnyvale, CA, USA), a monoclonal antibody assay, was performed on each sample (100 µl of rehydrated sample solution, as described above), according to the manufacturer's directions. It detects the GSA65 *G. duodenalis*-specific antigen in stools. Results were interpreted by visual inspection, following the color panels included in the kit. Any detectable color generation was regard as a positive result. Following visual inspection, the absorbance of each specimen was measured at 450 nm wavelenght with a

spectrophotometer. The absorbance values were adjusted by subtracting the optical density (OD) of the negative control from the OD of the samples. Specimens which produced an adjusted OD ≥ 0.050 were considered positive, according to the manufacturer's instructions.

Results

The immunoassay and the conventional examination results are given in Table 2. The microscopic examination was positive for *G. duodenalis* in only 1 of the 3 archaeological samples positive for *G. duodenalis* antigen detection by immunoassay. Two of the 3 positive samples (latrine soils) were re-tested using the same steps and procedures as above and the ELISA was concordant in both samples. Visual and spectrophotometer readings were concordant in all samples.

The feces used for the experimental coprolite had abundant cysts of *G. duodenalis* before desiccation. After desiccation and rehydration, identifiable cysts were very scarce.

Discussion

The observed decline of identifiable cysts in the experimental coprolite is very important. This indicates that the dehydration process, which is the reason coprolites preserve, and the rehydration process used for the analysis of most coprolites, destroys the majority of cysts. Therefore, the near absence of protozoa in coprolite studies is not surprising.

The results show no cross reactivity between *G. duodenalis* and helminths, as can be seen in Table 2. The use of 0.5% aqueous solution of trisodium phosphate and

acetic formalin solution in coprolites did not prevent positive results in the immunologic test.

The ELISA was superior to direct observation. The immunoassay detected *G. duodenalis* in two samples in which the direct examination was negative. In one sample the results were concordant. The finding of human specific parasites in these samples confirms their human origin.

The sensitivity of direct microscopy to detect protozoa in coprolites is poor. There are not many well-documented papers referring to protozoa in coprolites (WITENBERG, 1961; FOUANT *et al.*, 1982; FAULKNER *et al.*, 1989; FERREIRA *et al.*, 1992; ALLISON *et al.*, 1999). Even in fresh feces, in order to obtain a reliable result of giardiasis by direct examination, one should examine at least a series of 3 or more stool samples, as cysts of *G. duodenalis* are shed from the intestinal tract on a periodic basis. Antigens, however, are shed in a more continuous way (ROSOFF & STIBBS, 1986a).

The previous use of ELISA for protozoan detection in coprolites has not been encouraging. FOUANT *et al.* (1982) observed possible *Entamoeba* sp cysts in 4 coprolites from Pre-Colombian Indians from Chile. None were reactive to a ELISA utilized to detect *E. histolytica* antigens. They argued that the cysts found could be from *coli* species rather than *histolytica* species. Alternatively, they argued that the negative ELISA findings could result from decay of cyst antigenicity with time. ALLISON *et al.* (1999) compared a fluorescent antibody kit (Meridian Diagnostics) to an ELISA kit (Meridian Diagnostics) for *G. duodenalis* detection in coprolites from pre-Colombian South American mummies 500 to 3000 years old. The fluorescent antibody kit yielded more positive results than the immunosorbent assay.

It was not stated if the ELISA kit used monoclonal or polyclonal antibodies. The findings from FOUANT *et al.* (1982) and from ALLISON *et al.* (1999) could be explained by the relative low sensitivity of old generation enzyme immunoassays.

The assay evaluated here utilizes monoclonal antibody against GSA65 antigen. The GSA65 *G. duodenalis*-specific stool antigen is a glycoprotein. It is stable and is secreted in large amounts by encysting trophozoites (ROSOFF & STIBBS, 1986b). According to ALDEEN *et al.* (1998), the sensitivity and specificity of the assay is 100% in fresh feces. The immunologic test performed was rapid and simple, although expensive. According to our results, GSA65 survives the destruction of cysts and trophozoites. It was shown to be present for at least 800 years in human remains.

Although many species of *Giardia* parasitize virtually all classes of vertebrates, only *G. duodenalis*, a species complex, is identified from humans and most other mammals (THOMPSON *et al.*, 1993; THOMPSON, 2000). Molecular characterizations indicate that isolates from humans belong to assemblage A (genetically equivalent to “Polish” group or Groups 1/2) or assemblage B (genetically equivalent to “Belgian” group or Group 3). Major assemblages have distinct clusters. These clusters appear to have typical patterns of dispersion and potential for zoonotic transmission (THOMPSON *et al.*, 2000). The use of such molecular markers in coprolites with *G. duodenalis* could raise interesting issues concerning origin and dispersion of this parasite. MAYRHOFER *et al.* (1995) pointed out the relevance of studying the genetic divergence in *Giardia* assemblages concerning the phylogenetic or ecologic route of the giardiasis in *Homo sapiens*.

If further studies confirm our results, the use of immunologic methods for antigen detection can become the “golden standard” for diagnosis of protozoan infection in

coprolites. As more sensitive *G. duodenalis* detection tools arrive, a more comprehensive picture of this infection in ancient populations could be done.

We thank Dr. B. Herrmann from Universität Göttingen for sending us the samples from Germany.

Supported by Pronex/CNPq; CAPES/COFECUB; Fulbright Comission; CNRS

References

- Addiss, D. G., Mathews, H. M., Steward, J. M., Wahlquist, S. P., Williams, R. M., Finton, R. J., Spencer, H. C. & Juranek, D. D. (1991). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for *Giardia lamblia* antigen in stool. *Journal of Clinical Microbiology*, **29**, 1137-1142.
- Aldeen, W. E., Carrol, K., Robinson, A., Morrison, M. & Hale, D. (1998). Comparison of nine commercially available enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Giardia lamblia* in fecal specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**, 1338-1340.
- Allison, M. J., Bergman, T. & Gerszten, E. (1999). Further studies on fecal parasites in Antiquity. *American Journal of Clinical Pathology*, **112**, 605-605.
- Araújo, A., Ferreira, L. F., Confalonieri, U., Nuñez, L. & Ribeiro-Filho, B. M. (1985). *Enterobius vermicularis* eggs in precolumbian human coprolites from Chile. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **80**, 141-143.
- Bouchet, F. & Paicheler, J. C. (1995). Paléoparasitologie: présomption d'un cas de bilharziose au XV^e siècle à Montbéliard (Doubs, France). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Ser III*, **318**, 811-814.
- Burke, J. A. (1977). The clinical and laboratory diagnosis of giardiasis. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **7**, 373-391.
- Callen, E. O. & Cameron, T. W. M. (1960). A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Scientist*, **8**, 35-40.
- Confalonieri, U., Ribeiro-Filho B. M., Ferreira, L. F. & Araújo, A. (1985). The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. *Paleopathology Newsletter*, **51**, 76-77.

- Faulkner, C. T., Sharon, P. & Johnson, S. S. (1989). Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone cave, Van Buren, Tennessee. *The Journal of Parasitology*, **75**, 461-463.
- Faust, E. C., D'antoni, J. S., Odom, V., Miller, M. J., Peres, C., Sawitz, W. & Thomen, L. F. (1938). A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine*, **18**, 169-183.
- Ferreira, L. F., Araújo, A. & Confalonieri, U. (1980). The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**, 798-800.
- Ferreira, L. F., Araújo, A. & Confalonieri, U. (1983). The finding of helminth eggs in a brazilian mummy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**, 65-67.
- Ferreira, L. F., Araújo, A., Confalonieri, U., Chame, M. & Ribeiro, B. (1987). Encontro de ovos de ancilostomídeos em coprólitos humanos datados de 7.230 ± 80 anos, Piauí, Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, **59**, 280-281.
- Ferreira, L. F., Araújo, A., Confalonieri, U., Chame, M. & Ribeiro, B. (1992). *Eimeria* oocysts in deer coprolites dated from 9,000 years BP. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **87**, 105-106.
- Ferreira, L. F., Araújo, A., Confalonieri, U. & Nuñez, L. (1984). The finding of eggs of *Diphyllobothrium* in human coprolites (4,100-1,950 BC) from Northern Chile. *Memórias do Institute Oswaldo Cruz*, **79**, 175-180.

- Fouant, M. M., Allison, M., Gerszten, E. & Focacci, G. (1982). Parasitos intestinales entre los indigenas precolombinos. *Revista Chungará*, **9**, 285-299.
- Garcia, L. S., Shimizu, R. Y. & Bernard, C. N. (2000). Detection of *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar*, and *Cryptosporidium parvum* antigens in human fecal specimens using the triage parasite panel enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**, 3337-3340.
- Herrmann, B. (1985). Parasitologisch Epidemiologische Auswertungen mittelalterlicher Kloaken. *Zeitschrift für Archäologie des Mittelalters*, **13**, 131-161.
- Janoff, E. N., Craft J. C., Pickering, L. K., Novotny, T., Blaser, M. J., Knisley, C. V. & Reller, L. B. (1989). Diagnosis of infections by detection of parasite-specific antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 431-435.
- Lutz, A. (1919). O *Schistosomum mansoni* e a Schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **11**, 121-150.
- Mayrhofer, G., Andrews, R. H., Ey, P. L. & Chilton, N. B. (1995). Division of *Giardia* isolates from humans into two genetically distinct assemblages by eletrophoretic analysis of enzymes encoded at *loci* 27 and comparison with *Giardia muris*. *Parasitology*, **111**, 11-17.
- Reinhard, K. J. (1985). *Recovery of helminths from prehistoric feces: the cultural ecology of ancient parasitism*. M.S.Thesis. University of Northern Arizona, Flagstaff, Arizona, 28 p.
- Reinhard, K. J., Confalonieri, U., Herrmann, B., Ferreira, L. F. & Araújo, A. (1986). Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo*, **37**, 217-239.

- Rosoff, J. D., Sanders, C. A., Sonnad, S. S., De Lay, P. R., Hadley, W. K., Vincenzi F. F., Yajko, D. M. & O'Hanley, P. D. (1989). Stool diagnosis of giardiasis using a commercially available enzyme immunoassay to detect *Giardia*-specific antigen 65 (GSA 65). *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 1997-2002.
- Rosoff, J. D. & Stibbs, H. H. (1986a). Physical and chemical characterization of a *Giardia lamblia*-specific antigen useful in the coprodiagnosis of giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **24**, 1079-1083.
- Rosoff, J. D. & Stibbs, H. H. (1986b). Isolation and identification of a *Giardia lamblia*-specific stool antigen (GSA 65) useful in coprodiagnosis of giardiasis. *Journal of Clinical Microbiology*, **23**, 905-910.
- Scheffler, E. H. & Van Etta, L. L. (1994). Evaluation of rapid commercial enzyme immunoassay for detection of *Giardia lamblia* in formalin-preserved stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**, 1807-1808.
- Thompson, R. C. A. (2000). Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *International Journal for Parasitology*, **30**, 1259-1267.
- Thompson, R. C. A., Hopkins, R. M. & Homan, W. L. (2000). Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitology Today*, **16**, 210-213.
- Thompson, R. C. A., Reynoldson, J. A. & Mendis, A. H. S. (1993). *Giardia* and giardiasis. *Advances in Parasitology*, **32**, 71-160.
- Witenberg, G. (1961). Human parasites in archaeological findings. *Bulletin of the Israel Exploration Society*, **25**, 86.
- Wolfe, M. S. (1978). Giardiasis. *The New England Journal of Medicine*, **298**, 319-321.

Table 1. Country of the archaeological site, type and age of archaeological sample examined for *Giardia duodenalis*

Country	Archaeological samples
Brazil	39 coprolites from archaeological layers and 3 coprolites from colon contents of mummies, dated from 5230 Before Christ (BC) to 1730 AD
Chile	21 coprolites from archaeological layers and 7 coprolites from colon contents of mummies, dated from 4100 BC to 800 AD
USA	5 coprolites from archaeological layers, dated from 1200 AD to 1300 AD
Germany	3 medieval latrine soil samples, dated from 1500 AD to 1600 AD
Argentina	2 coprolites from colon contents of mummies, pre-Colombian time
France	1 coprolite from archaeological layer dated to about 400000 BC and 1 medieval latrine soil sample dated to about 1400 AD
Belgium	1 medieval latrine soil sample, dated to the 18th century

Table 2. Results of microscopic examination and of ELISA for GSA65 *G. duodenalis* antigen in human coprolites from archaeological sites

Country	Microscopic examination	ELISA result (OD) ¹
Brazil	13 samples with <i>Trichuris trichiura</i> eggs + +Ancylostomidae larvae and/or eggs	neg. (<0.050)
	12 samples with <i>T. trichiura</i> eggs	neg. (<0.050)
	8 samples with Ancylostomidae larvae and/or eggs	neg. (<0.050)
	3 samples with free-living larvae	neg. (<0.050)
	6 negative samples	neg. (<0.050)
	(Ferreira <i>et al.</i> , 1980, 1983; Ferreira <i>et al.</i> , 1987)	
Chile	6 samples with <i>Diphyllobothrium pacificum</i> eggs	neg. (<0.050)
	1 sample with <i>Enterobius vermicularis</i> eggs	neg. (<0.050)
	1 sample with <i>T. trichiura</i> eggs	neg. (<0.050)
	20 negative samples	neg. (<0.050)
	(Ferreira <i>et al.</i> , 1984; Araújo <i>et al.</i> , 1985)	
USA	2 samples with <i>E. vermicularis</i> eggs	pos. (1 sample) (0.092) neg. (1 sample) (<0.050)
	3 negative samples	neg. (<0.050)
	(Reinhard, 1985)	
Germany	3 samples with <i>T. trichiura</i> + <i>Ascaris lumbricoides</i> + + <i>D. latum</i> + <i>Fasciola hepatica</i> eggs	pos. (1 sample) (0.237) neg. (2 samples) (<0.050)
	(Herrmann, 1985)	
Argentina	1 sample with Ancylostomidae eggs	neg. (<0.050)

	1 sample with free-living larvae (unpublished data)	neg. (<0.050)
France	1 sample with <i>T. trichiura</i> + <i>A. lumbricoides</i> + <i>D. latum</i> + <i>Schistosoma haematobium</i> eggs	neg. (<0.050)
	1 negative sample (Bouchet & Paicheler, 1995)	neg. (<0.050)
Belgium	1 sample with <i>T. trichiura</i> + <i>A. lumbricoides</i> + + <i>D. latum</i> + Ancylostomidae larvae and eggs + + <i>G. duodenalis</i> cysts (unpublished data)	pos. (0.496)
positive control	1 sample with <i>G. duodenalis</i> cysts (experimental coprolite)	pos. (0.741)

¹ reader blanked on the neg. control (OD = 0.019)

Human intestinal parasites in the past: new findings and a review

Marcelo Luiz Carvalho Gonçalves, Aduino Araújo/+, Luiz Fernando Ferreira

Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Supported by CNPq; CAPES/COFECUB; PAPES/FIOCRUZ

+Corresponding author. e-mail: adauto@ensp.fiocruz.br Fax: + 55 21 25982610

Summary

Almost all known human parasites have been found in ancient feces. A review of the paleoparasitological helminth and intestinal protozoa findings available in the literature is presented. We also report the new paleoparasitologic findings from the examination performed in samples collected in New and Old World archaeological sites. New finds of ancylostomid, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis*, *Trichostrongylus* spp., *Diphyllobothrium latum*, *Hymenolepis nana* and Acantocephala eggs are reported. According to the findings, it is probable that *A. lumbricoides* was originally a human parasite. Human ancylostomids, *A. lumbricoides* and *T. trichiura*, found in the New World in pre-Columbian times, have not been introduced into the Americas by land via Beringia. These parasites could not supported the cold climate of the region. Nomadic prehistoric humans that have crossed the Bering Land Bridge from Asia to the Americas in the last glaciation, probably during generations, would have lost these parasites, which life cycles need warm temperatures in the soil to be transmitted from host to host. Alternative routes are discussed for human parasite introduction into the Americas.

Key Words: paleoparasitology; ancient diseases; helminths; protozoa; coprolites; mummies

Introduction

Parasites are organisms that found their ecological niche living in organisms of distinct species, called hosts. Paleoparasitology is the study of parasites in archaeological material. Paleoparasitologic findings can provide valuable information related to the antiquity of human-parasite relationship, parasite dispersion and human migrations in the past (Wilke & Hall 1975, Horne 1985, Araújo et al. 1988, Araújo & Ferreira 1997, 2000, Reinhard 1990, 1992).

Fecal remains usually are found in archaeological strata during archaeological excavations, in sediment from ancient latrines and cesspits or directly collected from mummies. Specimens are preserved by dry environment or by high concentration of soluble salts (Fry 1985). When feces are desiccated or mineralized, they are called coprolites (Heizer & Napton 1969).

Rehydration of desiccated coprolites is necessary to proceed to paleoparasitological analysis. Water, sodium hydroxide and EDTA solutions have been used to rehydrate specimens, but it was observed that they caused egg distortion and disintegration (Fry 1985). Only after the use of trisodium phosphate solution by Callen and Cameron (1960), rehydration techniques could obtain reliable results. They adapted the technique employed by Van Cleave and Ross (1947) and by Benninghoff (1947) to rehydrate dried zoological and herbarium specimens respectively. Since 1960, rehydration in aqueous 0.5% trisodium phosphate solution has been the standard technique. To disaggregated mineralized coprolites, 5-10% chlorhydric acid solution is used (Jones 1983). Parasite remains, mainly eggs and larvae, can be identified quite easily in ancient fecal material after rehydration.

This paper summarizes the available literature about intestinal parasite findings in archaeological material. We discuss some biological aspects of the parasites found and

we speculate about human dispersion in the past. We also performed the examination of ancient feces belonging to the collection of the Laboratory of Paleoparasitology of the Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil.

Material and methods

Specimens

A total of 894 samples of probable human coprolites and organic material from latrines and cesspits, belonging to the collection of our laboratory, were examined. Their origin are listed in Table I. The samples were dated either by ^{14}C method or by cultural context.

Examination techniques

The specimens were rehydrated by immersion in a 0.5% aqueous solution of trisodium phosphate for 72 hours (Callen & Cameron 1960). The rehydrated sample solutions were mixed approximately 10:1 in acetic formalin solution to avoid fungal and bacterial growth. The material was allowed to sediment following the technique proposed by Lutz (1919). A portion of each sediment was used for microscopic examination. The material was placed on a slide and covered with a coverslip and examined for the presence of parasites. Twenty slides for each sample were examined at magnification of X100 and X400. All wet preparations were examined by at least two of the authors. All eggs and larvae were photographed and the eggs were measured.

Results

Presented below is a summary of the paleoparasitological findings available in the literature as well as the unpublished finding of our material. The data are separated by

parasite and by chronological order. The archaeological site or the source mummy of the coprolite, country and date are given in Table II to Table XIV. Table XV shows non-intestinal human helminths. In Table XVI human paleoparasitological finds in the New and Old World are shown, if pre or post-Columbian.

Discussion

One of the most rich source of information about paleoecology is the analysis of ancient human droplets. The analysis of micro and macro remains like pollen, undigested seeds, fibers, small bones, scales and charcoal can reveal important aspects of diet, paleoclimate, agricultural development and prehistoric human occupation of ancient sites (Heizer & Napton 1969, Wilke & Hall 1975, Fry 1977, 1985, Reinhard & Bryant Jr 1992). Dietary habits can also be inferred when parasites with intermediate host life cycles are found in coprolites and in latrine material (Callen & Camaron 1960, Patrucco et al. 1983, Ferreira et al. 1984). Study of the coprolites in a paleontologic context can reveal interesting epidemiological patterns. Differences in parasitism between prehistorical hunter-gathering from agriculturalist population have been shown, related to sanitary patterns, type of dwelling and diet (Reinhard 1988a).

According to Darwin's theory, species have their origin in only one geographical area. Therefore, the utilization of parasites as biological markers allows a new approach concerning ancient human migrations. The dispersion of parasites in time can be used to trace migrations of their human hosts (Manter 1967, Araújo et al. 1988, Araújo & Ferreira 1997). A better understanding of parasite distribution in ancient world made it also possible to speculate about the antiquity of human-parasite relationship (Araújo & Ferreira 2000).

There are parasites that are specific to a host species and others that are not. Some parasites are found only in phylogenetically related host species. This kind of relationship began with a common ancient host species, early in time. There are species of parasites, however, that do not have such specificity, adapting themselves to several non-related hosts. Such parasites have been acquired by behavioral, social and biological changes, which have propitiated the host-parasite encounter, sometime during evolutionary history (Araújo et al. 2000). *Enterobius vermicularis* is an example of an inherited parasite, which has been present in human ancestors (Hugot et al. 1999), whereas *Diphyllobothrium latum*, for example, although a parasite found in ancient human populations, was acquired by food habits during the conquest of new habitats sometime in the past of mankind.

Helminths such as nematodes, cestodes, trematodes and acantocephalans keep their morphological parameters almost unchanged when 0.5% Na₃PO₄ aqueous solution is employed to rehydrate desiccated organic remains (Confalonieri et al. 1985, Fry 1985). Protozoa cysts are identified too, although cysts suffer a faster decay, resulting in artificially low estimations of protozoa as indicated by the infrequent finding of protozoan cysts in coprolites (Gonçalves et al 2002).

In a review, the correct identification of the origin of the specimens poses special problem in the validity of data. When the coprolites are not get from a mummified body, it can be difficult to ascertain its origin. The same problem arises when analyzing sediment from latrines. It is possible of misdiagnosis between human and wild or domestic animal fecal material (Fry 1977, Reinhard & Bryant Jr 1982, Fry 1985)

But, if there is no absolute test to determinate the zoological fecal origin, there are some well established criteria for differentiation between human and non-human coprolites. It is possible to select human coprolites based in their size, shape, macro and

micro contents, and most important, parasites. The finding of an exclusive human helminth in a sample clearly indicates their origin (Reinhard & Bryant Jr 1982, Fry 1985). When that is not the case, the parasite egg size is a valuable tool to indicate the coprolite origin (Confalonieri et al. 1985).

Interpretation of some parasitic findings can be troublesome. False parasitism should always be considered when eggs from a non-human parasite are recovered in a supposed human coprolite (Taylor 1955). These eggs may have been introduced in human digestive tract by consumption of some definitive parasite host. Zimmerman (1980) reported the finding of eggs from *Cryptocotyle lingua*, a fish trematode, in a 1600 year old frozen Eskimo mummy. Although eggs from this trematode have been recovered from modern Eskimos, the adult helminth has never been found in humans. Similarly, *Eimeria* sp., probably *E. mira*, a protozoa of red squirrel, has been found in the intestine of the Bog Man from Grauballe, dated between 1540 and 1740 years BP (Before Present). It appears to be due to the ingestion of contaminated meat or offal (Hill 1990). The finding of *Capillaria* spp., a rodent parasite, in human coprolites have been reported (Bouchet 1997). Although very rare in humans, the presence of *Capillaria* eggs in feces may actually indicate the ingestion of an infected liver (Roberts & Janovy Jr 2000). Coimbra Jr & Mello (1981) reported the finding of *Capillaria* eggs in feces of two Indians from the Amazonian region, probably resulting from the habit of animal liver ingestion.

Necator americanus and *Ancylostoma duodenale* are the most frequent ancylostomid parasiting humans. The former is more frequent in southern Africa, in the Americas, and in the Pacific Islands. *A. duodenale* is common in northern hemisphere, mainly in southern Europe, northern Africa, in India, in China and in southeastern Asia. But now, as a result of the large human movements throughout the world, their geographic

distribution are quite superposed. The worms mature and mate in the small intestine of the host. Eggs, passed with feces, hatch in environment if adequate moisture, shade and warm soil are found. The newly hatched larvae goes on to develop eventually into the infective filariform larvae. The life-span of *N. americanus* and *A. duodenale* varies from 4 to 5 years and from 6 to 8 years respectively (Roberts & Janovy Jr 2000, Rey 2001). The species can not be diagnosed reliably when the only remains are eggs, as most cases in coprolites or latrine sediment. Differentiation of *Ancylostoma duodenale* from *Necator americanus* larvae is difficult, specially in rehydrated material.

Ancylostomids have been found in archaeological sites from either New and Old World (Table II). Most finds are from the Americas. Human infection has been present in Amerindians far before Columbus. It strongly suggests some kind of transoceanic contact before 7230 ± 80 years ago (the oldest finding by now) (Araújo et al 1988, Araújo & Ferreira 1997). Ancylostomids, as well as other helminths that require warm and moist conditions to complete their life cycles outside their host, could not have survived during human migration by land through Bering Strait during the last ice age. Coastal navigation along the southern coast of the Bering Land Bridge is a more feasible route (Dixon 2001). Paleoparasitological finds from that region could support this alternative pathway of peopling of the New World. Unfortunately, under a paleoparasitological view, most coastal area are now underwater, after the ice melting.

Ascaris is a cosmopolitan helminth. Adult worms live in the small intestine of the host, and, as the ancylostomids, passed eggs need suitable environment to continue development. But *Ascaris* eggs can remain viable in soil for some years, even under tough conditions. The adult life time is estimated to be 2 years (Rey 2001). Table III shows a very wide distribution of *A. lumbricoides* in the Old World, specially in the

Middle Ages. It reflects poor sanitation and high population density in enlarging villages.

A. lumbricoides and *A. suum* are morphologically and physiologically similar. They parasitize humans and pigs respectively. It has been suggested that originally a pig parasite, it became a new species in adapting to humans when pigs were domesticated. But that is still an unsolved question (Roberts & Janovy Jr 2000). The finding of *A. lumbricoides* eggs in France (Table III), much earlier than the time of pig domestication, supposed to be nearly 9000 years ago (Giuffra et al. 2000), suggests that humans were first parasitized than pigs. After pig domestication, the parasite adapted to this new host. Similar findings in the New World in pre-European context also suggest it.

Trichuris trichiura adult worms live in the colon and is also a cosmopolitan parasite. Some 70 species of *Trichuris* have been reported from a wide variety of mammals. *T. trichiura* parasitizes humans, and as ancylostomids and *Ascaris*, warmth and moisture are necessary to fully develop the embryos (Roberts & Janovy Jr 2000). *T. trichiura* lifetime is estimated to be up to 6-8 years (Rey 2001). The egg size sometimes can be a reliable tool for identifying the species of *Trichuris* in coprolites of unknown origin (Confalonieri et al. 1985). Paleoparasitological findings (Table IV) show its wide distribution, including the New World in pre-Columbian times. As *A. lumbricoides*, the wide distribution of *T. trichiura* in the Antiquity and in the Middle Ages, reflects human living conditions. For unknown reasons the findings of *T. trichuris* in the New World are more frequent than the findings of *A. lumbricoides*.

Enterobius vermicularis is an exclusive human parasite. Organic material containing eggs of this parasite should be of human origin. As *A. lumbricoides*, *E. vermicularis* is cosmopolitan. The adults live mostly in the ileocecal region. The eggs are passed by

migrating adult females in the anus and peri-anal area. The eggs can directly infect other host, either by fecal-oral route as through airborne inhaled and swallowed eggs. Its life time is estimated to be up to 2 months (Roberts & Janovy Jr 2000, Rey 2001). For unknown reasons, the finding of *E. vermicularis* in archaeological material outside the New World is scarce (Table V). An hypothetical origin of this parasite in the Americas can be ruled out. *E. vermicularis* has a long history of coevolution with its human host. They have been coexisting together in Africa long time before human dispersion throughout the continents (Ferreira et al. 1997, Hugot et al. 1999).

Strongyloides stercoralis parasitizes humans, other primates, dogs, cats, and some other mammals. It is a parasite of tropical regions, although also found in temperate areas of the world. Having a complex life cycle, with a free-living larvae stage, the female adult worm lives in the small intestine of the host. The eggs usually hatches in the intestinal host lumen. The resulting larvae are passed in feces (Roberts & Janovy Jr 2000, Rey 2001). Table VI shows the findings of *S. stercoralis* in archaeological material. Caution should be exerted in diagnosing this parasite in sediment or coprolites. Free-living and ancylostomid larvae can be misidentified.

Many species of *Trichostrongylus* parasitize the small intestine of many mammals and birds. Some species can infect humans. In some areas in Asia and Africa they are very frequent. In southwest Iran and in a village in Egypt, up to 70% of human population have been found infected (Roberts & Janovy Jr 2000). *Trichostrongylus* eggs are remarkably similar to those of ancylostomids, but usually are larger. Human infection have been detected only in the Americas up to now (Table VI).

Fasciola hepatica is an helminth of cattle and sheep. Human infection occurs occasionally, mainly in certain areas of Europe, Africa and Latin America. The adult worm lives in the bile ducts of the host, passing eggs in feces. The eggs hatch in fresh

water, and the parasite completes its life cycle in a snail. Infection occurs by ingestion of metacercaria in vegetation or in water. Occasionally human infections with other *Fasciola* species occur (Roberts & Janovy Jr 2000, Rey 2001). Human infection with *Fasciola* spp. have been detected in coprolites and ancient latrines sediment after herding begun (Table VII), and until now only in the Old World paleofeces.

Three species of *Schistosoma* have major medical importance: *S. haematobium*, *S. japonicum* and *S. mansoni*. Only *S. mansoni* is found in the New World. *S. haematobium* is found mainly in Africa and Near East. *S. japonicum* is found in southeastern Asia and west Pacific. *S. mansoni* is found mainly in Brazil, Caribbean and Africa. Adult worms of *S. haematobium* live in veins of urinary bladder plexus of the host, so eggs are passed in the urine. Adult worms of *S. japonicum* and *S. mansoni* live in intestinal veins, and their eggs are passed in the feces. The eggs of *Schistosoma* spp. hatch in fresh water and the parasite complete its life cycle in a snail. Infection occurs when the parasite penetrates through the host skin (Roberts & Janovy Jr 2000, Rey 2001). Table VIII shows that the findings of *Schistosoma* spp. reflect in some degree their modern distribution, except the Americas in regard to *S. mansoni*. The findings in medieval Europe latrines reflects imported cases from Africa, since there is no intermediate host in Europe.

Dicrocoelium dendriticum is a frequent parasite of ruminants. Rarely it is found in humans. The cycle is somewhat similar to that of *Fasciola*, but there are two intermediate hosts, a terrestrial snail and an ant. Although cases of true parasitism occur in humans, many reported cases of human infection are actually false parasitism, as eggs can be found in feces resulting from a recent liver repast (Taylor 1955, Roberts & Janovy Jr 2000). It is virtually impossible to distinguish true and false human parasitism when the only ancient host remains are feces.

Clonorchis sinensis is found in southeastern Asia. It is a parasite of human and some other mammals. The adult fluke also lives in the host bile duct. The eggs are passed in the feces and the parasite completes its life cycle in two intermediate hosts, a snail and some species of fish and crustaceans. The definitive host is infected by eating raw or undercooked fish (Roberts & Janovy Jr 2000). Ancient infection by *C. sinensis* has only been found in mummified corpses from China (Table IX).

Two species of *Taenia* are frequent human intestinal parasites. *T. saginata*, the most frequent, is found in almost all countries where beef is eaten. *T. solium* is endemic in Latin America, Africa and some Asian countries. Intermediate hosts of *T. saginata* and *T. solium* are cattle and pigs, respectively. In *T. solium* infection, human can be both intermediate and definite host. Infection occurs when one eats infected beef or pork. Eggs are passed in the human feces (Roberts & Janovy Jr 2000, Rey 2001). In paleoparasitologic analysis, most often the only egg structure found is the oncosphere. In this case it is not possible to distinguish between the two different species of *Taenia* that infect humans. As expected, *Taenia* spp. have not been found in the New World in pre-Columbian time (Table X). Pork and beef were not available.

Diphyllobothrium latum and *D. pacificum* are parasites of fish-eating mammals. The former is mostly found in Europe and North America whereas *D. pacificum* is found mostly in the pacific coast of South America. *Diphyllobothrium* spp. have two intermediate hosts, copepods and fishes. Living in the host intestine, eggs are passed in feces (Roberts & Janovy Jr 2000, Rey 2001). Human infections with *D. pacificum* and *D. latum* result from the ingestion of raw or undercooked marine and fresh water fishes respectively. Table XI shows that eggs found in archaeological material reflects the modern distribution of *Diphyllobothrium* spp. It is related to the habits of fish consumption by humans.

Although rare, seven species of the phylum Acanthocephala have been reported parasiting human hosts. This phylum accomplishes parasites of fishes, birds, amphibians, mammals, and reptiles. At least two hosts are necessary to complete their life cycle. Depending on the species involved, the first host is an insect, crustacean or myriapod. The definite host passes eggs in the feces (Roberts & Janovy Jr 2000). Ancient human infection have been detected only in the Americas, mainly in USA (Table XIII), probably reflecting insect-eating habits.

The intestinal Protozoa usually live inside the host in the intestinal lumen or inside the intestinal epithelial cells. The infective stage are cysts or oocysts They are passed in the host feces. Humans most often are parasitized with *Entamoeba* spp. and *Giardia duodenalis* (Roberts & Janovy Jr 2000, Rey 2001). Cysts are not so resistant to decay as helminth eggs are. So, reliable findings of protozoa in coprolites and cesspit material are very rare (Table XIV). But some protozoa glycoprotein antigen, detectable by immunologic test, can still be found, even centuries after these parasites have been passed in feces. Gonçalves et al. (2002) detected *G. duodenalis* antigen by monoclonal antibody immunosorbant assay in samples dated to about 1200 AD, 1600 AD and 1700 AD, in coprolites and latrine soil from USA and Europe. Only one sample was positive to directed microscopic examination.

Paleoparasitological analysis of human mummies, human coprolites and cesspit material have been demonstrating the diversity and antiquity of human parasitism. In Africa, the following parasites have been detected in ancient human feces: *S. stercoralis*, *S. haematobium*, *Taenia* spp., *Echinococcus granulosus*, *Trichinella spiralis*, *Dracunculus medinensis*, filarial worm, and possibly *A. lumbricoides* and *T. trichiura*. In Europe, ancylostomids, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Fasciola* spp., *F. hepatica*, *S. mansoni*, *S. haematobium*, *Dicrocoelium* spp., *D.*

dendriticum, Opisthorchiformes, *Taenia* spp., *Diphyllobothrium* spp., *D. latum*, *G. duodenalis*, *E. granulosus*, *T. spiralis*, and possibly *S. stercoralis* have been found. In Asia, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *S. japonicum*, *C. sinensis*, *Taenia* spp., *T. solium*, *Diphyllobothrium* spp., *D. latum*, *E. histolytica*, *G. duodenalis*, *Chilomastix mesnili*, and *E. granulosus* have been found. In Oceania, *A. lumbricoides* has been found. In South America, ancylostomids, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Trichostrongylus* spp., *Paragonimus* spp., *Diphyllobothrium* spp., *D. pacificum*, *Hymenolepis nana*, Acanthocephala, *Entamoeba* spp., *G. duodenalis*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli*, *Sarcocystis hominis*, and possibly *E. coli* have been found. In North America, ancylostomids, *A. lumbricoides*, *T. trichiura*, *E. vermicularis*, *Trichostrongylus* spp., Opisthorchiformes, *Taenia* spp., *D. latum*, *D. pacificum*, *Hymenolepsis* spp., Acanthocephala, *G. duodenalis*, *E. granulosus*, *T. spiralis*, and possibly *S. stercoralis*, *Fasciola* spp. and *D. dendriticum* have been found (Tables II-XV).

Ancylostomids, *A. lumbricoides*, *T. trichiura* and *E. vermicularis* have been found in the Americas much earlier than colonial times (Tables II-V). It can be inferred that humans have been infected by some parasites before the peopling of the New World, as already mentioned by Darling (1920) and Soper (1927) regarding ancylostomid infection. For the above-mentioned helminths, except probably for *E. vermicularis*, their main gate to the Americas was not a land route through Beringia (Araújo et al. 1988, Araújo & Ferreira 1995, 1997, Reinhard 1992). To some helminths, such as ancylostomids and *T. trichiura*, soil temperature is crucial to evolve to an infective stage. Therefore, transmission was discontinued when infected prehistoric migrants moved through the cold northern territories, from Siberia to the Americas.

The new findings presented here confirm ancylostomid and *T. trichiura* infection before Columbus arrival. Dixon (2001), based on geological and archaeological data, hypothesizes that the first settlers used a sea-route along the southern coast of the Bering Land Bridge. Human had vessels and were able to navigate near-shore waters prior to 14,000 BP (Dixon 2001). Whether by transoceanic route or coastal navigation, prehistoric settlers brought such soil-transmitted helminths to the New World, in a journey no longer than the life-span of these helminths.

As more sensitive techniques become available, as detection of parasite DNA by polymerase chain reaction (PCR) and immunological antigen detection by monoclonal antibody assays, more parasitic infections will be detected. New paleoparasitological findings are being reported throughout the world, updating continuously the knowledge of parasite distribution in the past. A more complete and accurate parasitic infection understanding in antiquity will improve our knowledge about biological and social aspects of health and disease process during the evolution of human species. Coprolites, in Patrick Horne's words, one of the "least-attractive of man's relics", are helping scientist to disclose some still unclear aspects of parasitism and human dispersion in ancient times (Horne 1985).

We apologize for any data omission in the review. We would appreciate any additional paleoparasitological finding sent by colleagues.

References

- Allison MJ, Bergman T, Gerszten E 1999. Further studies on fecal parasites in antiquity. *Am Soc Clin Pathol* 112: 605-609.
- Allison MJ, Pezzia A, Hasegawa I, Gerszten E 1974. A case of hookworm infestation in a pre-Columbian american. *Am J Phys Anthropol* 41: 103-106.
- Andrews JRH 1976. *Ascaris* egg in coprolite material. *New Zeland Med J* 89: 274.
- Araújo A, Confalonieri U, Ferreira LF 1984. Encontro de ovos de Trichostrongylidae e *Trichuris trichiura* em corpo mumificado do período colonial brasileiro. *Rev Centr Cienc Biol Saude* 1: 11-16.
- Araújo A, Ferreira LF 1995. Oxiuríase e migrações pré-históricas. *Hist Cienc Saude* 2: 99-108.
- Araújo A, Ferreira LF 1997. Homens e parasitos: a contribuição da paleoparasitologia para a questão da origem do homem na América. *Rev USP* 34: 58-70.
- Araújo A, Ferreira LF 2000. Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationship. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95 (supl I): 89-93.
- Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U 1981. A contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. *Rev Bras Biol* 41: 873-881.
- Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U, Chame M 1988. Hookworms and the peopling of America. *Cad Saude Publica* 2: 226- 233.
- Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U, Nuñez L, Ribeiro Filho B 1985. The finding of *Enterobius vermicularis* eggs in pre-Columbian human coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 80: 141-143.
- Araújo A, Ferreira LF, Coura LC, Gonçalves MLC 2000. Parasitos, parasitismo e paleoparasitologia molecular. *An Acad Nac Med* 160: 20-27.

Arieli R 1998. Apud Hanson CL 1999. Annotated Bibliography. *Paleopathol News* 105: 13.

Aspöck H, Auer H, Picher O 1996. *Trichuris trichiura* eggs in the neolithic glacier mummy from the Alps. *Parasitol Today* 12: 255-256.

Aspöck H, Barth FE, Flamm H, Picher O 1974. Apud Aspöck H, Auer H, Picher O 1999. Parasites and parasitic diseases in prehistoric human populations in Central Europe. *Helminthologia* 36: 139-145.

Aspöck H, Flamm H, Picher O 1973. Darmparasiten in menschlichen Exkrementen aus prähistorischen Salzbergwerken der Hallstatt-Kultur (800-350 v. Chr.). *Zbl Bakt Hyg, I Abt Orig A* 223: 549-558.

Baud CA, Kramar C 1991. Apud Reinhard KJ 1992. Parasitology as an interpretative tool in archaeology. *Am Antiq* 57: 231-245.

Bellard FG, Cortés A 1990. Trichinosis in the mummy of a young girl (Toledo, Spain). *Papers on Paleopathology, 8th European Meeting, Cambridge*, p. 11.

Benninghoff WS 1947. Use of trisodium phosphate with herbarium material and microfossils in peat. *Science* 106: 325-326.

Boersema JH, Jansen J 1975. Helminth infections in Medieval Utrecht. *Trop Geo Med* 27: 441.

Bouchet F 1993. Apport de la parasitologie sur les chantiers archéologiques - l'exemple de la ville de Paris. *Mem Group Archeol Seine-et-Marne* 1: 55-61.

Bouchet F 1995. Recovery of helminth eggs from archaeological excavations of the Grand Louvre (Paris, France). *J Parasitol* 81: 785-787.

Bouchet F 1997. Intestinal capillariasis in neolithic inhabitants of Chalais (Jura, France). *Lancet* 349: 256.

Bouchet F, Baffier D, Girard M, Morel P, Paicheler JC, David F 1996. Paléoparasitologie en contexte pléistocène: premières observations à la Grande Grotte d'Arcy-sur-Cure (Yonne), France. C R Acad Sci Paris 319: 147-151.

Bouchet F, Bentrad S, Paicheler JC 1998. Enquête épidémiologique sur les helminthiases à la cour de Louis XIV. Mini-Synthese Med Sci 14: 463-466.

Bouchet F, Harter S, Paicheler JC, Araújo A, Ferreira LF 2002. First recovery of *Schistosoma mansoni* eggs from a latrine in Europe (15-16th centuries). J Parasitol 88: 404-405.

Bouchet F, Lefèvre C, West D, Corbett D 1999. First paleoparasitological analysis of a midden in the Aleutian Island (Alaska): results and limits. J Parasitol 85: 369-372.

Bouchet F, Paicheler JC 1995. Paléoparasitologie: présomption d'un cas de bilharziose au XV^e siècle à Montbéliard (Doubs, France). C R Acad Sci Paris 318: 811-814.

Bouchet F, Petrequin P, Paicheler JC, Dommelier S 1995. Première approche paléoparasitologique du site néolithique de Chalain (Jura, France). Bull Soc Path Ex 88: 265-268.

Bouchet F, West D, Lefèvre C, Corbett D 2001. Identification of parasitoses in a child burial from Adak Island (Central Aleutian Islands, Alaska). C R Acad Sci Paris 324: 123-127.

Brothwell DR 1978. Apud Jones AKG 1982. Human parasite remains: prospects for a quantitative approach. In AR Hall, HK Kenward, Environmental Archaeology in the Urban Context, Research Report no. 43, The Council for British Archaeology, p.66-70.

Cahill J, Reinhard K, Tarler D, Warnock P 1991. Scientists examine remains of ancient bathroom. Bibli Archaeol Rev 27: 64-69.

Callen EO, Camaron TWM 1960. A prehistoric diet revealed in coprolites. New Sci 8: 35-40.

Cheng TO 1984. Glimpses of the past from the recently unearthed ancient corpses in China. *An Int Med* 101: 714-715.

Cockburn A, Barraco RA, Reyman TA, Peck WH 1975. Autopsy of an Egyptian mummy. *Science* 187: 1155-1160.

Coimbra Jr CEA, Mello DA 1981. Enteroparasitas e *Capillaria* sp. entre o grupo Suruí, parque indígena Aripuanã, Rondônia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 76: 299-302.

Confalonieri UE, Araújo A, Ferreira LF 1981. *Trichuris trichiura* infection in Colonial Brazil. *Paleopathol News* 35: 13-14.

Confalonieri UE, Ribeiro Filho B, Ferreira LF, Araújo A 1985. The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. *Paleopathol News* 51: 9-11.

Darling ST 1920. Observations on the geographical and ethnological distribution of hookworms. *Parasitology* 12: 217-233.

De Boni U, Lenczner MM, Scott JW 1977. Autopsy of an Egyptian mummy (Nakht-ROM I). 6. *Trichinella spiralis* cysts. *CMAJ* 117: 461-476.

Deelder AM, Miller RL, De Jonge N, Krijger FW 1990. Detection of schistosome antigen in mummies. *Lancet* 335: 724-725.

Dittmar K, Teegen WR 2000. *Fasciola hepatica* eggs in a 4500 year old soil sample from the pelvic region of a human skeleton from Germany. *Paleopathology Association 27th Annual Meeting, San Antonio, Texas, p. 6.*

Dixon EJ 2001. Human colonization of the Americas: timing, technology and process. *Quat Sci Rev* 20: 277-299.

Dommelier-Espejo S 2001. Contribution à l'étude paléoparasitologique des sites néolithiques en environnement lacustre dans les domaines jurassien et péri-alpin. *Thesis, Université de Reims, Reims, 248 pp.*

Dommelier S, Bentrard S, Paicheler JC, Petrequin P, Bouchet F 1998. Parasitoses liées à l'alimentation chez les populations néolithiques du lac de Chalain (Jura, France). *Anthropozoöl* 27: 41-49.

Dunn FL, Watkins R 1970. Apud Wilke PJ, Hall HJ 1975. Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography. Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, University of California, Berkeley, 47 pp.

Dusseau EM, Porter RJ 1974. Apud Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163.

El-Najjar MY, Benitez J, Fry G, Lynn GE, Ortner DJ, Reyman TA, Small PA 1980. Autopsies on two native american mummies. *Am J Phys Anthropol* 53: 197-202.

Evans AC, Markus MB, Mason RJ, Steel R 1996. Late stone-age coprolite reveals evidence of prehistoric parasitism. *SAMJ* 86: 274-275.

Faulkner CT, Cowie SE, Martin PE, Martin SR, Mayes CS, Patton S 2000. Archeological evidence of parasitic infection from the 19th century company town of Fayette, Michigan. *J Parasitol* 86: 846-849.

Faulkner CT, Patton S 2001. Pre-Columbian hookworm evidence from Tennessee: a response to Fuller (1997). *Med Anthropol* 20: 92-96.

Faulkner CT, Patton S, Johnson SS 1989. Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone Cave, Van Buren County, Tennessee. *J Parasitol* 75: 461-463.

Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U 1980. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74: 798-800.

Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U 1982. Untitled note. *Paleopathol News* 38: 5.

Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U 1983. The finding of helminth eggs in a brazilian mummy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 77: 65-67.

Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Chame M, Ribeiro Filho B 1987. The finding of hookworm eggs in human coprolites from 7230 ± 80 years BP, from Piauí, Brazil. *An Acad Bras Cienc* 59: 280-281.

Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Lima JMD 1989a. *Trichuris* eggs in human coprolites from archeological site of Furna do Estrago, Brejo da Madre de Deus, Pernambuco. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84: 581.

Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Nuñez L 1984. The finding of *Diphyllobothrium pacificum* in human coprolites (4100-1950 BC) from northern Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79: 175-180.

Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U, Nuñez L 1989b. Infecção por *Enterobius vermicularis* em populações agro-pastoris pré-colombianas de San Pedro de Atacama, Chile. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 84 (supl IV): 197-199.

Ferreira LF, Reinhard KJ, Araújo A, Coura LC 1997. Paleoparasitology of oxyuriasis. *An Acad Nac Med* 157: 20-24.

Fouant MM, Allison M, Gerszten E, Focacci G 1982. Parasitos intestinales entre los indigenas precolombinos. *Rev Chungara* 9: 285-299.

Fry G 1970. Preliminary analysis of the Hogup Cave coprolites. In CM Aikens, Hogup Cave, University of Utah Anthropological Papers, n. 93, University of Utah Press, Salt Lake City, p. 247-250.

Fry GF 1974. Apud Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163.

Fry GF 1977. Analysis of prehistoric coprolites from Utah. In JD Jennings, LS Sweeney, University of Utah Anthropological Papers, n. 97, University of Utah Press, Salt Lake City, 45 pp.

Fry GF 1985. Analysis of fecal material. In RI Gilbert Jr, J Mielke, The Analysis of Prehistoric Diets, Academic Press, Orlando, pp. 127-154.

Fry GF, Hall HJ 1969. Parasitological examination of prehistoric human coprolites from Utah. Proc Utah Acad Sci Art Letters, 46, part 2, 102-105.

Fry GF, Hall HJ 1973. Apud Wilke PJ, Hall HJ 1975. Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography. Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, University of California, Berkeley, 47 pp.

Fry G, Hall HJ 1975. Human coprolites from Antelope House: preliminary analysis. Kiva 41: 87-96.

Fry GF, Moore JG 1969. *Enterobius vermicularis*: 10,000-year-old human infection. Science 166: 1620.

Gardner SL, Clary K 1987. Helminth parasites of Anasazi period coprolites from Bighorn Sheep ruin [42SA1563], Canyonlands National Park, Utah. Manuscript.

Giuffra E, Kijas JMH, Amarger V, Carlborg Ö, Jeon JT, Andersson L 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. Genetics 154: 1785-1791.

Gonçalves MLC, Araújo A, Duarte R, Silva JP, Reinhard K, Bouchet F, Ferreira LF 2002. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme immunoassay. Trans R Soc Trop Med Hyg, in press.

Grzywinski L 1960. Analysis of feces from the Middle Age period. Zool Poloniae 10: 195-199.

Gummerman GJ, Westfall D, Weed CS 1972. Apud Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163.

Hall HJ 1972. Apud Wilke PJ, Hall HJ 1975. Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography. Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, University of California, Berkeley, 47 pp.

Hall HJ 1976. Untitled notes. *Paleopathol News* 13: 9.

Hall AR, Jones AKG, Kenward HK 1983. Cereal Bran and Human Faecal Remains from Archaeological Deposits - Some Preliminary Observations. In B Proudfoot, Site, Environment and Economy, BAR International Series 173, Oxford, p. 85-104.

Hansen JPH 1986. Les momies du Groenland. *La Recherche* 183: 1490-1498.

Heizer RF, Napton LK 1969. Biological and cultural evidence from prehistoric human coprolites. *Science* 165: 563-568.

Helbaek H 1958. Grauballemandens sidste måltid. *Kuml* 83-116.

Herrmann B 1985. Parasitologisch-Epidemiologische Auswertungen Mittelalterlicher Kloaken. *Z Archäol Mittelalters* 13: 131-161.

Herrmann B, Schulz U 1986. Parasitologische Untersuchungen eines Spätmittelalterlich-Frühneuzeitlichen Kloakeninhaltes aus der Fronerei auf dem Schragen in Lübeck. *Lübecker Schri Archäol Kultur* 12: 167-172.

Hevly RH, Kelly RE, Anderson GA, Olsen SJ 1979. Apud Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163.

Hill G 1990. Recent finds of parasitic evidence in coprolites. *Paleopathol News* 69: 9-10.

Horne PD 1985. A review of the evidence of human endoparasitism in the pre-Columbian New World through the study of coprolites. *J Archaeol Sci* 12: 299-310.

Horne P, Redford S 1995. Aspergillosis and dracunculiasis in mummies from the tomb of Parannefer. *Paleopathol News* 92: 10-12.

Horne PD, Tuck JA 1996. Archaeoparasitology at a 17th century colonial site in Newfoundland. *J Parasitol* 82: 512-515.

Hugot JP, Reinhard KJ, Gardner SL, Morand S 1999. Human enterobiasis in evolution: origin, specificity and transmission. *Parasite* 6: 201-208.

Jansen J, Boersema JH 1972. Helminth eggs from the latrines of the Olofskapel Gatehouse, Amsterdam. *Paleopathol News* 2: ab7-ab8.

Jansen J, Boersema JH 1982. Helminth infection in medieval Amsterdam and Utrecht. *Papers on Paleopathology, 4th European Members Meeting, Middelburg, Antwerpen*, p. 6-7.

Jansen Jr J, Over HJ 1962. Het voorkomen van parasieten in terpmateriaal uit Noordwest Duitsland. *Tijdschr Diergeneesk* 87: 1377-1379.

Jansen Jr J, Over HJ 1966. Observations on helminth infections in a roman army-camp. *Proc 1st Int Congr Parasitol, Roma, Italy, 1964*, p. 791.

Jones AKG 1982. Recent finds of intestinal parasite ova at York, England. *Papers on Paleopathology, 4th European Members Meeting, Middelburg, Antwerpen*, p. 7.

Jones AKG, 1983. A coprolite from 6-8 pavement. In *Council for British Archaeology, The Archaeology of York: The Past Environment of York, Environment and Living Conditions at Two Anglo-Scandinavian Sites*, Council for British Archaeology, p. 225-229.

Jones AKG 1986. Parasitological investigations on Lindow Man. In IM Stead, JB Bourke, D Brothwell, *Lindow Man - The Body in the Bog*, British Museum Publications, p.136-139.

Jones AKG, Hutchinson AR, Nicholson C 1988. The worms of Roman horses and other finds of intestinal parasite eggs from unpromising deposits. *Antiquity* 62: 275-276.

Jones AKG, Nicholson C 1988. Recent finds of *Trichuris* and *Ascaris* ova from Britain. *Paleopatol News* 62: 5-6.

Liangbiao C, Tao H 1981. Scanning electron microscopic view of parasites worm ova in an ancient corpse. *Acta Acad Sinicae* 3: 64-65.

Lutz A 1919. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações feitas no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 11: 121-150.

Manter HW 1967. Some aspects of the geographical distribution of parasites. *J Parasitol* 53: 3-9.

McClary A 1972. Apud Wilke PJ, Hall HJ 1975. Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography. Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, University of California, Berkeley, 47 pp.

Miller RL, Armelagos GJ, Ikram S, De Jonge N, Krijger FW, Deelder AM 1992. Palaeoepidemiology of schistosoma infection in mummies. *BMJ* 304: 555-556.

Mitchell PD, Stern E 2000. Parasitic intestinal helminth ova from the latrines of the 13th century crusader hospital of St John in Acre, Israel. *Paleopathology Association 13th Biennial European Members Meeting, Chieti*, p. 21-22.

Moore DP 1981. Life seen from a medieval latrine. *Nature* 294: 644.

Moore JG, Fry GF, Englert Jr E 1969. Thorny-headed worm infection in North American prehistoric man. *Science* 163: 1324-1325.

Moore JG, Grundmann AW, Hall HJ, Fry GF 1974. Human fluke infection in Glen Canyon at AD 1250. *Am J Phys Antropol* 41: 115-118.

Nansen P, Jørgensen RJ 1977. Fund af parasitæg i arkæologisk materiale fra det vikingetidige Ribe. *Nord Vet-Med* 29: 263-266.

Ortner DJ, Putschar WGJ 1981. Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163.

Patrucco R, Tello R, Bonavia D 1983. Parasitological studies of coprolites of pre-hispanic peruvian populations. *Curr Anthropol* 24: 393-394.

Pike AW 1967a. The recovery of parasite eggs from ancient cesspit and latrine deposits: an approach to the study of early parasite infections. In D Brothwell, AT Sandison, *Diseases in Antiquity*, CC Thomas, Springfield, p. 184-188.

Pike AW 1967b. Apud Moore JG, Fry GF, Englert Jr E 1969. *Science* 163: 1324-1325.

Pike AW 1968. Recovery of helminth eggs from archaeological excavations, and their possible usefulness in providing evidence for the purpose of an occupation. *Nature* 219: 303-304.

Pike AW 1975. Parasite eggs. In C Platt, R Coleman-Smith, *Excavations in Medieval Southampton*, Leicester University Press, Leicester, p. 347-348.

Pike AW, Biddle M 1966. Parasite eggs in Medieval Winchester. *Antiquity* 40: 293-296.

Pizzi T, Schenone H 1954. Hallazgo de huevos de *Trichuris trichiura* en contenido intestinal de un cuerpo arqueológico incaico. *Bol Chil Parasitol* 9: 73-75.

Prince JL 1975. Apud Wells C, Dallas C 1976. Romano-british pathology. *Antiquity* 50: 53-55.

Rathbun TA, Sexton J, Michie J 1980. Apud Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163.

Reinhard KJ 1988a. Cultural ecology of prehistoric parasitism on the Colorado Plateau as evidenced by coprology. *Am J Phys Anthropol* 77: 355-366.

Reinhard KJ 1988b. Diet, parasitism and anemia in the prehistoric Southwest. Thesis, Department of Anthropology, Texas A & M University, Texas, 120 pp.

Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82:145-163.

Reinhard KJ 1992. Parasitology as an interpretative tool in archaeology. *Am Antiq* 57: 231-245.

Reinhard KJ, Ambler JR, McGuffie M 1985. Diet and parasitism at Dust Devil Cave. *Am Antiq* 50: 819-824.

Reinhard KJ, Aufderheide AC 1990. Diphyllbothriasis in pre-Columbian Chile and Peru: adaptative radiations of a helminth species to native american populations. *Papers on Paleopathology, 8th European Members Meeting, Cambridge*, p.18.

Reinhard KJ, Barnum SV 1991. Apud Reinhard KJ 1992. Parasitology as an interpretative tool in archaeology. *Am Antiq* 57: 231-245.

Reinhard KJ, Brooks RH, Brooks S, Largent Jr FB 1989. Apud Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163.

Reinhard KJ, Bryant Jr VM 1992. Coprolites analysis: a biological perspective on archaeology. In MB Schiffer, *Advances in Archaeological Method and Theory* vol. 4, Academic Press, New York, p. 245-288.

Reinhard KJ, Clary KH 1986. Apud Steinbock RT 1987. Annotated Bibliography. *Paleopathol News* 59: 19.

Reinhard KJ, Hevly RH, Anderson GA 1987. Helminth remains from prehistoric indian coprolites on the Colorado Plateau. *J Parasitol* 73: 630-639.

Reinhard KJ, Mrozowski SA, Orloski KA 1986. Privies, pollen, parasites and seeds: a biological nexus in historic archaeology. *Masca J* 4: 31-36.

Rey L 2001. *Parasitologia*, 3rd ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 856 pp.

Reyman TA, Zimmerman MR, Lewin PK 1977. Autopsy of an Egyptian mummy (Nakht-ROM I). 5. Histopathologic investigation. *CMAJ* 117: 461-476.

Roberts LS, Janovy Jr J 2000. Gerald D Schmidt & Larry S Roberts' foundations of parasitology, 6th ed., McGraw-Hill, Boston, 670 pp.

Roever-Bonnet H, Rijpstra C, van Renesse MA, Peen CH 1979. Helminth eggs and gregarines from coprolites from the excavations at Swifterbant. *Helinium* 19: 7-12.

Rousset JJ, Heron C, Metrot P 1996. Human helminthiasis at the gauls. *Hist Sci Med* 30: 41-46.

Ruffer MA 1910. Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in egyptian mummies of the twentieth dynasty. *Br Med J* 1: 16.

Samuels R 1965. Parasitological study of long-dried fecal samples. *Paleopathol News* 2: ab4.

Schia E 1979. Apud Jones AKG 1982. Human parasite remains: prospects for a quantitative approach. In AR Hall, HK Kenward, *Environmental Archaeology in the Urban Context*, Research Report no. 43, The Council for British Archaeology, p. 66-70.

Šebela L, Vojtková L, Vojtek J 1990. Apud Aspöck H, Auer H, Picher O 1999. Parasites and parasitic diseases in prehistoric human populations in Central Europe. *Helminthologia* 36: 139-145.

Soper FL 1927. The report of nearly pure *Ancylostoma duodenalis* infection in native South American indians and a discussion of its ethnological significance. *Am J Hyg* 7: 174-184.

Specht KW 1963. Eine interessante Erdprobe aus einer Abortgrube im Römerkastell Künzing. *Saalburg-Jahrbuch* 21: 90-94.

Stiger MA 1977. Apud Reinhard KJ 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163.

Szidat L 1944. Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor- und Frühgeschichtlichen Moorleichen. *Z Parasitenkd* 13: 265-274.

Tapp E 1979. Apud Sandinson AT, Tapp E 1998. Disease in ancient Egypt. In A Cockburn, E Cockburn, TA Reyman, Mummies, Disease & Ancient Cultures, 2nd ed., Cambridge University, Cambridge, p. 38-58.

Tapp E 1984. Apud Sandinson AT, Tapp E 1998. Disease in ancient Egypt. In A Cockburn, E Cockburn, TA Reyman, Mummies, Disease & Ancient Cultures, 2nd ed., Cambridge University, Cambridge, p. 38-58.

Tapp E, Wildsmith K 1992. Apud Sandinson AT, Tapp E 1998. Disease in ancient Egypt. In A Cockburn, E Cockburn, TA Reyman, Mummies, Disease & Ancient Cultures, 2nd ed., Cambridge University, Cambridge, p. 38-58.

Taylor EL 1955. Parasitic helminths in medieval remains. *Vet Rec* 67: 218-228.

Van Cleave HJ, Ross JA 1947. A method for reclaiming dried zoological specimens. *Science* 105: 318.

Wei O 1973. Internal organs of a 2100-year-old female corpse. *Lancet* 7839: 1198.

Weiss DL, Moller-Christensen V 1971. Apud Wells C, Dallas C 1976. Romano-British pathology. *Antiquity* 50: 53-55.

Wells C, Dallas C 1976. Romano-british pathology. *Antiquity* 50: 53-55.

Wilke PJ, Hall HJ 1975. Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography. Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, University of California, Berkeley, 47 pp.

Williams JA 1985. Evidence of hydatid cyst disease in a Plains Woodland Burial. *Plains Anthropol* 30: 25-28.

Wilson A, Rackham DJ 1976. Parasite eggs. In Council for British Archaeology, The Archaeology of York: The Past Environment of York, the Environment Evidence from the Church Street Sewer System, Council for British Archaeology, p. 32-33.

Witenberg G, 1961. Human parasites in archaeological findings. Bull Israel Expl Soc 25: 86.

Yang W, Song G, Teng R 1984. Parasitologische Untersuchung einer alten Leiche aus der Chu-Dynastie der Streitenden Reiche aus dem Mazhuan-Grab Nr. 1, Kreis Jiangling, Provinz Hubei. Acta Acad Med Wuhan 4: 23-27.

Zias J, Mumcuoglu KY 1991. Case reports on paleopathology: calcified hydatid cysts. Paleopathol News 73: 7-8.

Zimmerman MR 1980. Apud Sandinson AT, Tapp E 1998. Disease in ancient Egypt. In A Cockburn, E Cockburn, TA Reyman, Mummies, Disease & Ancient Cultures, 2nd ed., Cambridge University, Cambridge, p. 138-153.

Zimmerman MR, Aufderheide C 1984. The frozen family of Utqiagvik: the autopsy findings. Artic Anthropol 21: 53-64.

Zimmerman MR, Morilla RE 1983. Enterobiasis in pre-Columbian America. Paleopathol News 42: 8.

Table I: Origin of the samples examined at the Laboratory of Paleoparasitology of the Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz, from January 2000 to July 2001.

origin of the samples	samples examined	no. of archaeological sites
Brazil	720	27
Chile	126	14
USA	20	1
Argentina	7	4
Venezuela	7	?
France	5	2
Peru	4	1
Germany	3	1
Belgium	1	1
Egypt	1	1

Table II: Ancylostomid finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
Pedra Furada, Piauí	Brazil	7230 ± 80 BP	Ferreira et al. 1987
Tiliviche, Iquique	Chile	4100 - 1950 BC	new finding
Clairvaux, Jura	France	3600 BC	Dommelien-Espejo 2001
Boqueirão Soberbo, Minas Gerais	Brazil	4905 ± 85 - 1325 ± 60 BP	Ferreira et al. 1982
Chalain, Jura	France	2700 - 2440 BC	Dommelien-Espejo 2001
Daws Island, South Carolina ¹	USA	1700 - 1300 BC	Rathbun et al. 1980
Hulin, Central Moravia	Czech Republic	1600 - 1500 BC	Šebela et al. 1990
Gentio Cave, Minas Gerais	Brazil	3490 ± 120 - 430 ± 70 BP	Ferreira et al. 1980, 1983
Toconao Oriente, San Pedro de Atacama	Chile	2500 - 2100 BP	new finding
Big Bone Cave, Tennessee	USA	2177 ± 145 BP	Faulkner et al. 1989, Faulkner & Patton 2001
Upper Salts Cave, Kentucky ¹	USA	1125 - 290 BC	Dusseau & Porter 1974
Valle Encantado, Neuquén	Argentina	1000 - 500 BP	new finding
Tihuanaco	Peru	890 - 950 AD	Allison et al. 1974
Buldir Island, Alaska ²	USA	1400 - 1700 AD	Bouchet et al. 1999
Namur	Belgium	18th century AD	new finding
Newport, Rhode Island	USA	18th century AD	Reinhard et al. 1986
Sítio do Meio, Piauí	Brazil	not available	new finding

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ uncertain diagnosis

² human origin?

Table III: *Ascaris lumbricoides* finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
Grand Grotte, Arcy-sur-Cure, Yonne	France	30,160 ± 140 - 24,660 ± 330 BP	Bouchet et al. 1996
Kruger Cave, Rustenburg ¹	South Africa	10,000 - 7000 BP	Evans et al. 1996
Clairvaux, Jura ¹	France	3600 BC	Dommelier-Espejo 2001
Arbon, Thurgau ¹	Swiss	3384 - 3370 BC	Dommelier-Espejo 2001
Chalain, Jura ¹	France	2700 - 2440 BC	Dommelier-Espejo 2001
Huarmey Valley	Peru	2277 BC ± 181	Patrucco et al. 1983
Somerset	England	4100 - 2600 BP	Jones & Nicholson 1988
Hulin, Central Moravia	Czech Republic	1600 - 1500 BC	Šebela et al. 1990
Gentio Cave, Minas Gerais	Brazil	3490 ± 120 - 430 ± 70 BP	new finding
Upper Salts Cave, Kentucky	USA	1125 - 290 BC	Fry 1974
Drobintz girl	Prussia	600 BC	Szidat 1944
Hallstatt	Austria	2300 years	Aspöck et al. 1973
PUM II mummy	Egypt	200 BC	Cockburn et al. 1975
Big Bone Cave, Tennessee	USA	2177 ± 145 BP	Faulkner et al. 1989
Hallein, Salzburg	Austria	2000 years	Aspöck et al. 1974
Bremerhaven	Germany	100 BC - 500 AD	Jansen Jr & Over 1962
Valkenburg on Rhine	Netherlands	42 - 100 AD	Jansen Jr & Over 1966
Winchester ²	England	Roman Age	Pike 1968
Lindow Man	England	2nd century AD	Jones 1986
Bobigny	France	2nd century AD	Rousset et al. 1996

York ²	England	2nd - 3rd century AD	Wilson & Rackham 1976
Karwinden Man	Prussia	500 AD	Szidat 1944
Ribe	Denmark	750 - 800 AD	Nansen & Jørgensen 1977
York	England	9th - 10th century AD	Jones 1982
Antelope House, Arizona	USA	900 - 1250 AD	new finding
Elden Pueblo, Arizona	USA	1070 - 1250 AD	Hevly et al. 1979, Reinhard et al. 1987
Winchester	England	1000 years	Pike 1967a
Winchester ²	England	1100 AD	Taylor 1955
Adak Island, Alaska	USA	840 ± 40 BP	Bouchet et al. 2001
Acre	Israel	13th century AD	Mitchell & Stern 2000
Utrecht	Netherlands	13th - 14th century AD	Boersema & Jansen 1975, Jansen & Boersema 1982
Southampton	England	13th - 14th century AD	Pike 1975
Amsterdam	Netherlands	1370 - 1425 AD	Jansen & Boersema 1972, Jansen & Boersema 1982
Paris	France	14th - 15th century AD	Bouchet 1993, 1995
York	England	14th - 16th century AD	Jones et al. 1988, Jones & Nicholson 1988
Worcester	England	15th century AD	Moore 1981
Oslo	Norway	15th century AD	Schia, 1979
Lübeck	Germany	15th century AD	Herrmann 1985,

			Herrmann & Schulz 1986
Montbeliard	France	15th - 16th century	new finding
Schleswig	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Berlin	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Braunschweig	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Hameln	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Höxter	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Göttingen	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Marburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Freiburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Breisach	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Regensburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Landshut	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Newfoundland ²	Canada	17th century AD	Horne & Tuck 1996
Marly-le-Roy, Yveline ²	France	17th - 18th century AD	Bouchet et al. 1998
Williamsburg, Virginia	USA	1720 AD	Reinhard 1990
Namur	Belgium	18th century AD	new finding
Newport, Rhode Island	USA	18th century AD	Reinhard et al. 1986
Wellington	New Zealand	150 - 200 years	Andrews 1976

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ uncertain diagnosis

² human origin?

Table IV: *Trichuris trichiura* finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
Kruger Cave, Rustenburg ¹	South Africa	10,000 - 7000 BP	Evans et al. 1996
Lapa Pequena, Minas Gerais	Brazil	8000 - 7000 BP	new finding
Clairvaux, Jura	France	3600 - 3500 BC	Dommelien-Espejo 2001
Swifterbant ¹	Netherlands	5400 ± 40 - 5230 ± 40 BP	Roever-Bonnet et al. 1979
Arbon, Thurgau	Swiss	3384 - 3370 BC	Dommelien-Espejo 2001
Otzal, Tyrol	Austria	3300 - 3200 BC	Aspöck et al. 1996
Chalain, Jura	France	32nd - 25th century BC	Bouchet et al. 1995, Dommelien et al. 1998, Dommelien-Espejo 2001
Boqueirão Soberbo, Minas Gerais	Brazil	4905 ± 85 - 1325 ± 60 BP	Ferreira et al. 1982
Somerset	England	4100 - 2600 BP	Jones & Nicholson 1988
Santa Elina, Mato Grosso	Brazil	4000 - 2000 BP	new finding
Hulin, Central Moravia	Czech Republic	1600 - 1500 BC	Šebela et al. 1990.
Gentio Cave, Minas Gerais	Brazil	3490 ± 120 - 430 ± 70 BP	Ferreira et al. 1980, 1983
Tulán, San Pedro de Atacama	Chile	1080 - 950 BC	new finding
Drobintz girl	Prussia	600 BC	Szidat 1944

Jerusalem	Middle East	7th - 6th century BC	Cahill et al. 1991
Chu Dynasty mummy, Hubei province	China	2300 years	Yang et al. 1984
Hallstatt	Austria	2300 years	Aspöck et al. 1973
Tollund Man, Central Jutland	Denmark	210 BC	Helbaek 1958
Han Dynasty mummy, Hubei province	China	167 BC	Liangbiao & Tao 1981, Cheng 1984
Vilshofen	Germany	150 - 140 BC	Specht 1963
Bremerhaven	Germany	100 BC - 500 AD	Jansen Jr & Over 1962
Han Dynasty mummy, Hunam province	China	2100 BP	Wei 1973
Estrago Cave, Pernambuco	Brazil	2000 BP	Ferreira et al. 1989a
Hallein, Salzburg	Austria	2000 years	Aspöck et al. 1974
Valkenburg on Rhine	Netherlands	42 - 100 AD	Jansen Jr & Over 1966
Winchester ^{1,2}	England	Roman Age	Pike 1968
Lindow Man, Manchester	England	2nd century AD	Jones 1986
Bobigny	France	2nd century AD	Rousset et al. 1996
Nahal-Mishmar Valley	Israel	160 AD	Witenberg 1961
York	England	2nd - 3rd century AD	Wilson & Rackham 1976
Grauballe Man, Silkeborg	Denmark	3rd - 4th century AD	Helbaek 1958
Karwinden Man	Prussia	500 AD	Szidat 1944
Ribe	Denmark	750 - 800 AD	Nansen & Jørgensen 1977
York	England	9th - 11th century AD	Hall et al. 1983, Jones 1982
Huarmey Valley	Peru	1000 AD	Patrucco et al. 1983

Winchester	England	11th century AD	Pike 1967a, Pike & Biddle 1966
Elden Pueblo, Arizona	USA	1070 - 1250 AD	Hevly et al. 1979, Reinhard et al. 1987
Winchester ¹	England	1100 AD	Taylor 1955
Acre	Israel	13th century AD	Mitchell & Stern 2000
Southampton	England	13th - 14th century AD	Pike 1975
Utrecht	Netherlands	13th - 14th century AD	Boersema & Jansen 1975, Jansen & Boersema 1982
Paris	France	14th - 15th century AD	Bouchet 1993, 1995
York	England	14th - 16th century AD	Jones & Nicholson 1988, Hall et al. 1983
Amsterdam	Netherlands	1370 - 1425 AD	Jansen & Boersema 1972, Jansen & Boersema 1982
Worcester	England	15th century AD	Moore 1981
Lübeck	Germany	15th century AD	Herrmann & Schulz 1986
Oslo	Norway	15th century AD	Schia 1979
Schleswig	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Lübeck	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Berlin	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Braunschweig	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Hameln	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Höxter	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985

Göttingen	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Marburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Freiburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Breisach	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Regensburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Landshut	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Cerro El Plomo, Santiago	Chile	pre-Columbian	Pizzi & Schenone 1954
Inca mummy		ca. 1500 AD	Pike 1967b
Montbeliard	France	15th - 16th century AD	new finding
Murga culture	Peru	Colonial period	Fouant et al. 1982
Newfoundland ¹	Canada	17th century AD	Horne & Tuck 1996
Marly-le -Roy, Yveline ¹	France	17th - 18th century AD	Bouchet et al. 1998
Williamsburg, Virginia	USA	1720 AD	Reinhard 1990
Itacambira, Minas Gerais	Brazil	18th century AD	Confalonieri et al. 1981
Newport, Rhode Island	USA	18th century AD	Reinhard et al. 1986
Namur	Belgium	18th century AD	new finding
New York City, New York	USA	19th century AD	Reinhard 1990
Fayette, Michigan	USA	19th century AD	Faulkner et al. 2000
Pedra Furada, Piauí	Brazil	not available	new finding

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ human origin?

² *Capillaria* sp?

Table V: *Enterobius vermicularis* finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
Danger Cave, Utah	USA	7837 BC \pm 630	Fry & Hall 1969, Fry & Moore 1969
Dirty Shame rockshelter, Oregon	USA	6,300 years	Hall 1976
Tiliviche, Iquique	Chile	4100 - 1950 BC	new finding
Hogup Cave, Utah	USA	4010 BC - 1 AD	Fry & Hall 1969, Fry & Moore 1969
Huarney Valley	Peru	2277 BC \pm 181	Patrucco et al. 1983
Hinds Cave, Texas	USA	2100 - 600 BC	Reinhard 1988b
Tulán, San Pedro Atacama	Chile	1080 - 950 BC	Ferreira et al. 1989b
Caserones, Tarapaca Valley	Chile	400 BC - 800 AD	Araujo et al. 1985
Clyde's Cavern, Utah	EUA	2300 years	Hall 1972
Big Bone Cave, Tennessee	EUA	2177 \pm 145 BP	Faulkner et al. 1989
Han Dynasty mummy, Hunam province	China	2100 years	Wei 1973
Turkey Pen Cave, Utah	USA	1600 years	Reinhard et al. 1987
Clyde's Cavern, Utah	USA	460 - 1500 AD	Hall 1972
Canyon del Muerto, Arizona	USA	600 AD \pm 95	El-Najjar et al. 1980
Rio Zape, Durango	Mexico	600 AD	Reinhard et al. 1989
Big Horn Sheep Ruin, Utah	USA	900 - 1250 AD	Gardner & Clary 1987
Mesa Verde, Arizona	USA	900 - 1250 AD	Stiger 1977
Chaco Canyon, New Mexico	USA	920 - 1200 AD	Reinhard et al. 1987, Reinhard & Clary 1986

Wetherill Mesa, Colorado	USA	1000 years	Samuels 1965
Elden Pueblo, Arizona	USA	1070 - 1250 AD	Hevly et al. 1979, Reinhard et al. 1987
Antelope House, Arizona	USA	1075 - 1250 AD	Fry & Hall 1975, Reinhard et al. 1987
Salmon Ruin, New Mexico	USA	1200 - 1275 AD	Reinhard et al. 1987
Inscription House, Arizona	USA	1250 - 1300 AD	Fry & Hall 1973
Göttingen	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Greenland	Denmark	1475 AD ± 50	Hansen 1986
Pie de Palo	Argentina	pre-Columbian	Zimmerman & Morilla 1983

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

Table VI: other Nematode finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
<i>Strongyloides stercoralis</i>			
Asru mummy	Egypt	ca. 1000 BC	Tapp 1979
Clyde's Cavern, Utah ¹	USA	400 - 1200 AD	Hall 1972
Chaco Canyon, New Mexico ¹	USA	920 - 1130 AD	Reinhard & Clary 1986
Antelope House, Arizona ¹	USA	1175 - 1250 AD	Reinhard et al. 1987
Amsterdam ¹	Netherlands	1370 - 1425 AD	Jansen & Boersema 1972
<i>Trichostrongylus</i> spp.			
Dust Devil Cave, Utah ¹	USA	6800 - 4800 BC	Reinhard et al. 1985
Tulán, San Pedro de Atacama	Chile	1080 - 950 BC	new finding
Rio Zape, Durango ¹	Mexico	600 AD	Reinhard et al. 1989
Valle Encantado, Neuquén	Argentina	1000 - 500 BP	new finding
Antelope House, Arizona	USA	1175 - 1250 AD	Reinhard et al. 1987
Catarpe 2, San Pedro de Atacama ¹	Chile	1450 - 1525 AD	new finding
Itacambira, Minas Gerais	Brazil	18th century AD	Araujo et al. 1984

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ uncertain diagnosis

Table VII: *Fasciola* spp. finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
Clairvaux, Jura	France	3600 BC	Dommelien-Espejo 2001
Swifterbant ¹	Netherlands	5400 ± 40 - 5230 ± 40 BP	Roever-Bonnet et al. 1979
Arbon, Thurgau	Swiss	3384 - 3370 BC	Dommelien-Espejo 2001
Chalain, Jura ²	France	32nd - 25th century BC	Bouchet et al. 1995, Dommelien et al. 1998
Saale-Unstrut Valley ²	Germany	2500 BC	Dittmar & Teegen 2000
Lovelock Cave, Nevada ³	USA	500 BC - 1150 AD	Dunn & Watkins 1970
Bremerhaven ²	Germany	100 BC - 500 AD	Jansen Jr & Over 1962
Hallein, Salzburg ²	Austria	2000 years	Aspöck et al. 1974
Ribe ²	Denmark	750 - 800 AD	Nansen & Jørgensen 1977
Odra river ^{2,4}	Poland	10th - 13th century AD	Grzywinski 1960
Paris ²	France	14th - 15th century AD	Bouchet 1993, 1995
Lübeck	Germany	15th century AD	Herrmann 1985, Herrmann & Schulz 1986
Braunschweig	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Hameln	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Freiburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Marly-le -Roy, Yveline ¹	France	17th - 18th	Bouchet et al. 1998

century AD

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ human origin?

² *Fasciola hepatica*

³ uncertain diagnosis

⁴ non-human origin?

Table VIII: *Schistosoma* spp. finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
mummies ¹	Egypt	3200 BC and 1198 - 1150 BC	Deelder et al. 1990
mummy, Tumb of Parannefer ¹	Egypt	1450 BC	Horne & Redford 1995
20th dynasty mummies ¹	Egypt	1250 - 1000 BC	Ruffer 1910
Nakht - ROM I mummy ¹	Egypt	3200 BP	Reyman et al. 1977
Han Dynasty mummy, Hubei province ²	China	167 BC	Liangbiao & Tao 1981, Cheng 1984
Han Dynasty mummy, Hunam province ²	China	2100 BP	Wei 1973
mummies ¹	Sudan	350 - 550 AD	Miller et al. 1992
Montbéliard ¹	France	15th century AD	Bouchet & Paicheler 1995
Montbéliard ³	France	15th - 16th century AD	Bouchet et al. 2002

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ *Schistosoma haematobium*

² *Schistosoma japonicum*

³ *Schistosoma mansoni*

Table IX: other Trematode finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
<i>Dicrocoelium</i> spp.			
Arbon, Thurgau	Swiss	3384 - 3370 BC	Dommelien-Espejo 2001
Chalain, Jura	France	3040 - 3000 BC	Dommelien-Espejo 2001
Hallein, Salzburg	Austria	2000 years	Aspöck et al. 1974
Winchester ¹	England	Roman Age	Pike 1968
Winchester ²	England	11th century AD	Pike & Biddle 1966, Pike 1967a
Winchester ^{2,3}	England	1100 AD	Taylor 1955
Paris ²	France	14th - 15th century AD	Bouchet 1993, 1995
Newfoundland ^{1,2}	Canada	17th century AD	Horne & Tuck 1996
<i>Opisthorchiformes</i>			
Swifterbant ¹	Netherlands	5400 ± 40 - 5230 ± 40 BP	Roever-Bonnet et al. 1979
Arbon, Thurgau	Swiss	3384 - 3370 BC	Dommelien-Espejo 2001
Chu Dynasty mummy, Hubei province ⁴	China	2300 years	Yang et al. 1984
Han Dynasty mummy, Hubei province ⁴	China	167 BC	Liangbiao & Tao 1981, Cheng 1984
Glenn Canyon, Utah ^{3?}	USA	1250 AD	Moore et al. 1974
<i>Paragonimus</i> sp			
Atacama desert	Chile	2500 BC	Hall 1976

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ unknown origin

² *Dicrocoelium dendriticum*

³ false parasitism

⁴ *Clonorchis sinensis*

Table X: *Taenia* spp. finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
Nakht - ROM I mummy	Egypt	3200 BP	Reyman et al. 1977
Chalain, Jura	France	32nd - 25th century BC	Dommelier et al. 1998, Dommelier-Espejo 2001
Jerusalem	Middle East	7th - 6th century BC	Cahill et al. 1991
Han Dynasty mummy, Hubei province ¹	China	167 BC	Liangbiao & Tao 1981, Cheng 1984
Bremerhaven	Germany	100 BC - 500 AD	Jansen Jr & Over 1962
Hallein, Salzburg	Austria	2000 years	Aspöck et al. 1974
Ribe	Denmark	750 - 800 AD	Nansen & Jørgensen 1977
Amsterdam	Netherlands	1370 - 1425 AD	Jansen & Boersema 1972
Göttingen	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Newfoundland	Canada	17th century AD	Horne & Tuck 1996
Marly-le-Roy, Yveline	France	17th - 18th century AD	Bouchet et al. 1998

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ *Taenia solium*

Table XI: *Diphyllbothrium* spp. finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
coast ¹	Peru	10,000 - 4000 BP	Reinhard & Barnum 1991
Tiliviche, Iquique ¹	Chile	4110 - 1950 BC	Ferreira et al. 1984
Clairvaux, Jura	France	5600 BP	Dommelier-Espejo 2001
Arbon, Thurgau	Swiss	3384 - 3370 BC	Dommelier-Espejo 2001
Chalain, Jura ²	France	32nd - 25th century BC	Bouchet et al. 1995, Dommelier et al. 1998
Huaca Prieta	Peru	3000 BC	Callen & Camaron 1960
Huarmey Valley ¹	Peru	2700 - 2850 BC	Patrucco et al. 1983
northern ¹	Chile	4000 BP	Reinhard & Aufderheide 1990
Saginow valey, Michigan ^{2,3}	USA	300 BC - 200 AD	McClary 1972
Bremerhaven ²	Germany	100 BC - 500 AD	Jansen Jr & Over 1962
Karwinden Man ²	Prussia	1500 BP	Szidat 1944
Adak Island, Alaska ¹	USA	840 BP ± 40	Bouchet et al. 2001
Acre ²	Israel	13th century AD	Mitchell & Stern 2000
Oslo ²	Norway	15th century AD	Schia 1979
Lübeck	Germany	15th century AD	Herrmann 1985, Herrmann & Schulz 1986
Schleswig	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Hameln	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Freiburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Regensburg	Germany	Medieval Age	Herrmann 1985
Buildir Island, Alaska	USA	1400 - 1700 AD	Bouchet et al. 1999

Montbéliard ²	France	15th - 16th century	new finding
Namur ²	Belgium	18th century AD	new finding

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ *Diphyllobothrium pacificum*

² *Diphyllobothrium latum*

³ uncertain origin

Table XII: Other Cestode finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
Hogup Cave, Utah	USA	5330 - 1250 BC	Fry 1977
Santa Elina, Mato Grosso ³	Brazil	4000 - 2000 BP	new finding
Danger Cave, Utah	USA	20 AD	Fry 1977
Elden Pueblo, Arizona ¹	USA	1070 - 1250 AD	Reinhard et al. 1987
Antelope House, Arizona ²	USA	1175 - 1250 AD	Reinhard et al. 1987
Glen Canyon, Utah	USA	1250 - 1300 AD	Fry 1977
Newport, Rhode Island	USA	18th century AD	Reinhard et al. 1986

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ *Hymenolepis* sp. + taeniid cestode

² *Hymenolepis* sp.

³ *H. nana*

Table XIII: Acanthocephala finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
Danger Cave, Utah	USA	9500 BC, 8000 BC, 2000 BC and 20 AD	Fry & Hall 1969
Hogup Cave, Utah	USA	8000 BC - 2000 BC	Fry & Hall 1969, Fry 1970
Dirty Shame Rockshelter, Oregon	USA	4850 BC	Hall 1976
Boqueirão Soberbo, Minas Gerais	Brazil	4905 ± 85 - 1325 ± 60 BP	new finding
Danger Cave, Utah	USA	1869 ± 60 BC and 20 ± 240 AD	Moore et al. 1969
Gentio Cave, Minas Gerais ¹	Brazil	3490 ± 120 - 430 ± 70 BP	new finding
Clyde's Cavern, Utah	USA	2300 years and 400 - 1200 AD	Hall 1972
Black Mesa, Arizona	USA	900 - 1100 AD	Gummerman et al. 1972
Glen Canyon, Utah	USA	900 - 1300 AD	Fry 1977, Fry & Hall 1969

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ human origin?

Table XIV: Protozoa finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
<i>Entamoeba</i> spp.			
Nahal-Mishmar ¹	Israel	160 AD	Witenberg 1961
Huari	Peru	pre-Columbian	Fouant et al. 1982
Alto Ramírez	Chile	pre-Columbian	Fouant et al. 1982
Atacamenha	Chile	pre-Columbian	Fouant et al. 1982
Cabuza	Chile	pre-Columbian	Fouant et al. 1982
Tihuanaco	Chile	pre-Columbian	Fouant et al. 1982
El Plomo, Santiago ²	Chile	pre-Columbian	Pizzi & Schenone 1954
inca mummy	?	ca. 1500 AD	Pike 1967b
<i>Giardia duodenalis</i>			
Andes	?	3000 - 500 BP	Allison et al. 1999
Big Bone Cave, Tennessee	USA	2177 BP ± 145	Faulkner et al. 1989
Nahal-Mishmar	Israel	160 AD	Witenberg 1961
Antelope House, Arizona	USA	1200 AD	Gonçalves et al. 2002
Lübeck	Germany	1600 AD	Gonçalves et al. 2002
Namur	Belgium	18th century AD	Gonçalves et al. 2002
<i>Chilomastix mesnili</i>			
Nahal-Mishmar	Israel	160 AD	Witenberg 1961
<i>Cryptosporidium parvum</i>			
Andes	?	3000 - 500 BP	Allison et al. 1999
<i>Cyclospora cayetanensis</i>			
Andes	?	3000 - 500 BP	Allison et al. 1999

Isospora belli

Andes	?	3000 - 500 BP	Allison et al. 1999
-------	---	---------------	---------------------

Sarcocystis hominis

Andes	?	3000 - 500 BP	Allison et al. 1999
-------	---	---------------	---------------------

AD: *Anno Domini*

BP: Before Present

¹ *Entamoeba histolytica*

² *Entamoeba coli?*

Table XV: Non-intestinal human helminth finds, locality, country and date from ancient remains.

archaeological site/mummy	country	date	references
<i>Echinococcus granulosus</i>			
mummies	Egypt	?	Tapp 1984
Mt. Scopus, Jerusalem	Middle East	538 BC - 70 AD	Arieli 1998
Shultz site, Michigan ¹	USA	300 BC - 200 AD	McClary 1972
Jerusalem	Middle East	1st century AD	Zias & Mumcuoglu 1991
Cambridgeshire	England	1st - 2nd century AD	Wells & Dallas 1976
South Dakota	USA	600 AD	Williams 1985
?	Swiss	Medieval Age	Baud & Kramar 1991
Winchester	England	Medieval Age	Prince 1975
Naestved	Denmark	1450 AD	Weiss & Moller-Christensen 1971
Kodiak Island, Alaska	USA	before 1740 AD	Ortner & Putschar 1981
Orkley	Scotland	?	Brothwell 1978
<i>Trichinella spiralis</i>			
Nakht - ROM I mummy	Egypt	3200 BP	De Boni et al. 1977
Utqiagvik, Alaska	USA	440 ± 70 BP	Zimmerman & Aufderheide 1984
Toledo	Spain	19th century AD	Bellard & Cortés 1990
<i>Dracunculus medinensis</i>			
Tumb of Parannefer, Valley	Egypt	1450 BC	Horne & Redford 1995

of the Nobles

Manchester mummy # 1770	Egypt	Greek or Roman periods	Tapp 1979
-------------------------	-------	------------------------	-----------

Filarial worm

Natsef Amun - Leeds mummy, Karnak	Egypt	1100 BC	Tapp & Wildsmith 1992
-----------------------------------	-------	---------	-----------------------

AD: *Anno Domini*

BC: Before Christ

BP: Before Present

¹ uncertain origin

Table XVI: Paleoparasitological finds from human remains, in the New and Old World, pre and post-Columbian.

Human paleoparasitological finds	New World		Old World	
	pre-Columbian parasite finds	post-Columbian parasite finds	pre-Columbian parasite finds	post-Columbian parasite finds
Ancylostomids	Y	Y	Y	Y
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Y	Y	Y	Y
<i>Trichuris trichiura</i>	Y	Y	Y	Y
<i>Enterobius vermicularis</i>	Y	nf	Y	nf
<i>Strongyloides stercoralis</i>	?	nf	Y	nf
<i>Trichostrongylus</i> spp.	Y	Y	nf	nf
<i>Fasciola</i> spp.	?	nf	Y	Y
<i>Schistosoma</i> spp.	nf	nf	Y	Y
<i>Dicrocoelium</i> spp.	nf	?	Y	nf
Opisthorchiformes	Y	nf	Y	nf
<i>Paragonimus</i> spp.	Y	nf	nf	nf
<i>Taenia</i> spp.	nf	Y	Y	Y
<i>Diphyllobothrium</i> spp.	Y	Y	Y	Y
<i>Hymenolepis</i> spp.	Y	nf	nf	nf
Acanthocephala	Y	nf	nf	nf

<i>Entamoeba</i> spp.	Y	nf	Y	nf
<i>Giardia duodenalis</i>	Y	nf	Y	Y
<i>Chilomastix mesnili</i>	nf	nf	Y	nf
<i>Cryptosporidium</i>	Y	nf	nf	nf
<i>parvum</i>				
<i>Cyclospora</i>	Y	nf	nf	nf
<i>cayetanensis</i>				
<i>Isospora belli</i>	Y	nf	nf	nf
<i>Sarcocystis hominis</i>	Y	nf	nf	nf
<i>Echinococcus</i>	Y	Y	Y	?
<i>granulosus</i>				
<i>Trichinella spiralis</i>	nf	Y	Y	Y
<i>Dracunculus</i>	nf	nf	Y	nf
<i>medinensis</i>				
Filarial worm	nf	nf	Y	nf

Y = yes

nf = not found

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Enquanto o dado paleoparasitológico negativo pouco ou nada diz, o dado positivo, se bem diagnosticado, é incontestável. Deste modo, muitas teorias no campo da paleoparasitologia e em áreas afins baseadas na falta do encontro de determinados parasitos devem ser interpretadas com cautela. Muitos fatores podem estar envolvidos no não encontro de determinados parasitos em determinadas áreas.

Poderíamos dividir esses fatores em dois grupos: dados verdadeiramente negativos e os falso negativos. No primeiro grupo enumeramos como exemplo a falta de algum elo na cadeia de transmissão do parasito, tais como a ausência de hospedeiros intermediários na região, determinados hábitos alimentares ou culturais peculiares do hospedeiro humano, condições geo-climáticas desfavoráveis ao ciclo de desenvolvimento do parasito, etc. Como causa de dados falso negativos, poderíamos citar condições físico-químicas desfavoráveis à conservação do ovo do parasito no solo, o grau de parasitismo abaixo da sensibilidade do método paleoparasitológico empregado e escavações arqueológicas em locais fora de contexto para vestígios orgânicos.

Deste modo, muitos dados paleoparasitológicos são, por sua própria natureza, provisórios. À medida em que novos achados de parasitos forem sendo relatados, novas teorias serão formuladas e algumas antigas, refeitas ou descartadas. Com técnicas progressivamente mais sensíveis e com um maior número de centros de pesquisa envolvidos com o estudo paleoparasitológico, muitos novos achados de parasitos do passado vêm sendo relatados, permitindo uma visão mais ampla do fenômeno parasitismo ao longo da história evolutiva do binômio parasito-hospedeiro.

É nosso propósito continuar algumas linhas de investigação que surgiram ao longo do trabalho de tese. Estamos estendendo a detecção de antígenos específicos de *G. duodenalis* em mais amostras da coleção de coprólitos do laboratório. E iniciamos a detecção de antígenos específicos de *Entamoeba histolytica* por ELISA, também com a utilização de kits comercialmente disponíveis para análises clínicas. Embora ainda em andamento, já foi possível fazer o diagnóstico de infecção por *E. histolytica* em material arqueológico da Europa, Estados Unidos e Argentina, sendo que na Europa em sedimento de fossa de uma fortificação galo-romana.

Testamos também ao longo da tese a utilização de ELISA para a detecção de imunoglobulinas humanas em coprólitos. Tal teste poderia permitir a confirmação da origem humana de coprólitos e matéria orgânica de origem zoológica duvidosa. Os teste

preliminares, realizados com imunoglobulinas de coelho anti-imunoglobulinas totais humanas, não mostraram bons resultados, apresentando dados inconsistentes nos controles utilizados. É nosso objetivo retomarmos essa linha de pesquisa. Tentaremos a seguir a realização de ELISA com anticorpos monoclonais contra IgA humana e contra alfa 1 antitripsina, encontrada em quantidade relativamente grande nas fezes, teoricamente ainda presente em material fecal antigo.

A utilização de recursos cartográficos digitais na plotagem dos dados paleoparasitológicos distribuídos no espaço e no tempo permite a confecção de mapas-múndi com os diversos parasitos encontrados. Modelagens computadorizadas desses mapas podem permitir visualizações gráficas de alterações geomorfológicas, como alterações do nível dos oceanos. A partir de dados batimétricos da região do Estreito de Bering, é objetivo do grupo a simulação em computador de um mapa da região com o nível do oceano rebaixado em 100 a 200 metros, tal como ocorreu na última era glacial. O objetivo é a visualização de eventuais acidentes geográficos expostos com o rebaixamento do nível do oceano que possam ter facilitado navegações pré-históricas. Uma modelagem semelhante, em relação a rotas migratórias costeiras pré-históricas entre a África e a Oceania, já foi feita (Coupé & Hombert, 2001).

Algumas considerações podem ser feitas sobre os dados dos quatro artigos:

- A utilização de técnicas paleoparasitológicas mais sensíveis que a microscopia óptica, tais como a detecção de DNA parasitário pelas técnicas de biologia molecular e a detecção de antígenos parasitários específicos por ensaios imunoenzimáticos, vai possibilitar diagnósticos parasitológicos cada vez mais precisos.
- A detecção de protozoários em coprólitos e em material de antigas latrinas através de técnicas imunoenzimáticas pode vir a se tornar padrão no diagnóstico de enteroprotosooses em material paleoparasitológico. Apesar de relativamente dispendioso, no momento tem muitas vantagens operacionais sobre as técnicas de detecção de DNA parasitário pela reação em cadeia da polimerase.
- Muito provavelmente *Ascaris suum* tornou-se uma nova espécie a partir da infecção do porco com *A. lumbricoides* humano. O encontro de ovos de *A. lumbricoides* em coprólitos humanos do Velho Mundo, anteriores à domesticação do porco, assim como o encontro de ovos deste nematódeo no Novo Mundo antes do período colonial permitem supor que a infecção do porco por *Ascaris* é posterior ao parasitismo humano.

- Os dados paleoparasitológicos indicam que há pelos menos 8 mil anos ocorreu a entrada de geohelminhos humanos nas Américas. Considerando que esses achados mais antigos são do interior do Brasil, provavelmente a data da entrada no Novo Mundo é bem anterior a 8 mil anos. Estes achados indicam a utilização de vias migratórias humanas alternativas a eventuais rotas terrestres pela região da Beríngia. O encontro de ovos de geohelminhos nas Américas em época pré-colombianas permite tal inferência, pois o clima inóspito da região da Beríngia não permitiria a manutenção dessas parasitoses na população migrante, funcionando verdadeiramente como um filtro, o “filtro Ártico” (Stewart, 1960). Quer tenha sido por navegações costeiras ao longo das Aleutas (Dixon, 2001), ou por navegações trans-oceânicas (Meggers & Evans, 1966), os geohelminhos humanos entraram nas Américas por vias não terrestres. Quando os dados paleoparasitológicos de sítios arqueológicos ao longo de possíveis vias de entrada nas Américas do homem pré-histórico forem se avolumando, será possível fazer estimativas mais concretas de eventuais rotas utilizadas.

Concluindo, acreditamos que questões complexas como o povoamento pré-histórico das Américas, se algum dia chegarem a ser esclarecidas totalmente, só o serão através de abordagens multidisciplinares, onde a paleoparasitologia terá sempre lugar de destaque a partir do dado empírico incontestado.

BIBLIOGRAFIA

- ALLISON, M. J., BERGMAN, T. & GERSZTEN, E., 1999. Further studies on fecal parasites in Antiquity. *American Journal of Clinical Pathology*, 112:605-605.
- COUPÉ, C. & HOMBERT, J. M., 2001. From Africa to Australia: Elements for an early coastal route <http://www.ddl.ish-lyon.cnrs.fr/PDF/hombert/Africa_Australia.pdf>.
- DIXON, E.J., 2001. Human colonization of the Americas: timing, technology and process. *Quaternary Science Review*, 20:277-299.
- FAULKNER, C. T., SHARON, P. & JOHNSON, S. S., 1989. Prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated fecal material collected from Big Bone cave, Van Buren, Tennessee. *The Journal of Parasitology*, 75:461-463.
- FOUANT, M. M., ALLISON, M., GERSZTEN, E. & FOCACCI, G., 1982. Parasitos intestinales entre los indigenas precolombinos. *Revista Chungará*, 9:285-299.
- GONÇALVES, M. L. C.; ARAÚJO, A.; DUARTE, R.; SILVA, J. P.; REINHARD, K.; BOUCHET, F. & FERREIRA, L. F., 2002. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme immunoassay. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, in press.
- MEGGERS, B. J. & EVANS, C., 1966. A transpacific contact in 3000 BC. *Scientific American*, 214:28-35.
- STEWART, T. D., 1960. A physical anthropologist's view of the peopling of the New World. *Southwestern Journal of Anthropology*, 16:259-273.