

ARTIGO DE ATUALIZAÇÃO

Parasitos, parasitismo e paleoparasitologia molecular

Adauto Araújo¹, Luiz Fernando Ferreira¹, Léa Camillo-Coura¹, Marcelo Gonçalves²

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 do parasitismo procura entender as relações entre estes dois organismos como um processo evolutivo, cuja origem remonta à própria origem da vida. Ao se reverem conceitos sobre o fenômeno do 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 a replicação de material genético, com datações de alguns milhares de anos, possibilitam estudos evolutivos da relação parasito-hospedeiro, com implicações possíveis sobre a virulência de parasitos e a origem e evolução de doenças infecciosas.

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

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 compararem genomas de parasitos, separados por intervalos de tempo de alguns milhares de anos, abre um campo fértil para estudos sobre a origem e a evolução das doenças parasitárias, seus agentes etiológicos e seus hospedeiros.

Nos últimos 15 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 em nível molecular, abrindo perspectivas inéditas sobre a abordagem evolutiva das associações biológicas ao longo do tempo real e recuperado do passado.

Sobre este mesmo caminho interpõem-se novas teorias a despeito das relações parasito-hospedeiro, voltadas, sobretudo, para a co-evolução e os modelos de virulência, e ao 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 a ecologia de parasitos vêm contribuindo para novas análises, uma vez que os parasitos 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 do parasitismo amplia a definição do organismo hospedeiro como *hábitat*²⁵,

¹Fundação Oswaldo Cruz.

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.

ou mesmo como ambiente⁵⁸. Ao entender-se nicho ecológico não apenas como o local onde se encontra o parasito, mas como 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 as interfaces parasito-hospedeiro, como acontece em qualquer biocenose, em que 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 para 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 do 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 como de origem bacteriana, correspondendo a um relacionamento parasitário ancestral que, de tão estreito e dependente, se tornou 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, relacionada aos vírus e chamada de transposons, encontra-se inserida no genoma do hospedeiro, onde essas seqüências replicam e copiam-se a si mesmas, sendo a cópia inserida em outra parte do genoma³⁵. Os transposons 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 co-evolutivo com o hospedeiro mede-se pelo surgimento e pela diversidade de células procariontas 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 do parasitismo é observável em toda a natureza, em todos os seres vivos, hospedeiros ou parasitos, e pode tornar-se parte do próprio sucesso evolutivo ou da extinção de ambos.

Infeção parasitária refere-se à presença de parasitos no organismo hospedeiro, sejam eles, em amplo senso, vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos, vegetais, artrópodos ou vertebrados. Contudo, doença parasitária implica o conceito médico de um conjunto de si-

nais e sintomas que caracterizam determinada parasitose, diagnosticada pela presença ou por 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 simbiontes, 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, no qual 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 um 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 que pode não ser, necessariamente, um indicativo da antiguidade da relação parasito-hospedeiro. Neste aspecto, o trabalho de Frank³⁵ faz uma ampla discussão sobre virulência, sob enfoque evolutivo, classificando os parasitos em: aqueles que exploram o hospedeiro de forma prudente, tirando recursos sem causar dano notável, e aqueles 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 à 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 e ancestrais de espécies de atuais parasitos. Assim, diz-se, também, que a tendência evolutiva entre parasitos é para uma alta taxa de fecundidade. Poulin⁷⁴ discute esses 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 com comparações entre as taxas de fecundidade de ectoparasitos e de artrópodos de vida livre. Morand & Sorci⁶³ discutem esses 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 entenderem as 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 tenham sido herdados de ancestrais. Isto pode acontecer através do próprio ambiente, onde 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 a 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 de nele se manter. Nos outros casos estão os parasitos de animais que, ao se tornarem domesticados, se adaptaram à espécie, ou vice-versa. Em algumas situações a adaptação não se completa, como por exemplo no caso do *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 a co-evolução 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 da química de proteínas, elaborados com parasitos e hospedeiros relacionados filogeneticamente, mostrando similaridades entre as espécies do grupo estudado⁴².

Alguns especialistas, entretanto, vêem esta metodologia com cautela, pois, como foi dito, determinadas espécies de parasitos foram adquiridas do ambiente onde circula o hos-

pedeiro. Portanto, a confiabilidade do método pressupõe o conhecimento da origem filogenética ou ecológica da espécie de parasito, para que os resultados reflitam a co-evolução 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 das 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 a descoberta de parasitos em material arqueológico e paleontológico trouxeram novos dados para esta linha de investigação. A seguir são feitos breves comentários sobre o histórico e os achados da paleoparasitologia, e sobre 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 se expandiu e novas técnicas foram introduzidas. A mais importante delas foi a aplicação das técnicas da biologia molecular para a recuperação de material genético de parasitos. Também o uso de técnicas adaptadas da análise de pólen foi aplicado em sedimentos arqueológicos e coprólitos mineralizados, a fim de se recuperarem ovos de parasitos, ampliando-se o espectro da análise. Revê-se aqui o desenvolvimento destas técnicas e das perspectivas de estudo por elas proporcionadas.

Pode-se dividir a história da paleoparasitologia em períodos, como o Período dos Pioneiros, no qual se iniciaram os trabalhos e se implantaram 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 achados de parasitos em material antigo e, finalmente, em 1979, esta nova ciência foi chamada de Paleoparasitologia, por Ferreira *et al.*²⁶.

Inicialmente os parasitologistas que analisaram coprólitos (fezes dessecadas ou mineralizadas) tentaram diferentes técnicas de concentração de ovos de parasitos, efetivas apenas quando o material não estava completa-

mente consolidado e podia ser hidratado em água destilada ou hidróxido de sódio e potássio^{92,88}. Entretanto não se conseguiam aplicar as técnicas de rotina de análise parasitológica, nem se obtinham preparações duradouras em lâminas. 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 em outros tipos de material arqueológico, como os coletados diretamente de corpos mumificados, em fossas e em latrinas medievais^{10,11}. Assim, essa técnica permitiu a descoberta de parasitos e de 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 é muito antigo 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 em uma perspectiva epidemiológica¹⁸. Esta mensagem alcançou parasitologistas nas Américas do Norte e do Sul e também na Europa. Esses 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. Esse 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 foram feitos 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 a eventual modificação da composição faunística.

Outra questão refere-se à presença de parasitos não encontrados habitualmente 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. Há casos, porém, em que se devem fazer interpretações cuidadosas dos achados, a fim de que se evitem 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*, um nematódeo parasito de animais.

Durante essas duas décadas a paleoparasitologia avançou baseada no diagnóstico por parâmetros morfométricos, sendo o microscópio óptico o instrumento dos cientistas dedicados a 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 esboçada, com distribuição pela maioria das regiões ocupadas pela espécie humana, em tempos determinados por datações, localizadas no espaço pelo registro arqueológico. Esta distribuição permite que se levantem questões sobre migrações pré-históricas de seus hospedeiros humanos. Pode-se dizer que a paleoparasitologia passou de um período descritivo para um enfoque de contribuições à patocenose, conceito criado por Grmek³⁹ referente às condições ambientais, às relações parasito-hospedeiro e ao conjunto de situações que permitiram que determinada infecção se instalasse 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, comparados às populações de agricultores. Os resultados mostraram, também, uma dominância de parasitos de origem zoonótica em caçadores-coletores, enquanto os agricultores eram parasitados por parasitos especificamente humanos, isto é, de origem filogenética⁷⁶. Estudos de infecções em agricultores pré-históricos mostraram que a prevalência de parasitos dependia 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 em 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 aos coprólitos mineralizados, são utilizadas soluções ácidas, como ácido clorídrico a 10%, para separa-

ção 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 como relacionadas a protozoários. Rothhammer *et al.*⁸¹ encontraram, 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 ao povoamento das Américas. Como já foi dito, parasitos podem apresentar alta especificidade em relação ao hospedeiro, possibilitando estudos filogenéticos⁷ e, por isso, é possível se buscarem 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 ao parasitismo, em que se destacam as contribuições de Olímpio da Fonseca. Seus estudos sobre populações indígenas isoladas e sobre 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.

Contudo sempre se questionam dados baseados em populações supostamente isoladas, pois através de qualquer contato com outra população, em passado recente, haveria a possibilidade de se introduzirem infecções e, assim, se confundirem os dados da análise.

A partir do desenvolvimento da paleoparasitologia, retomou-se a essa linha, que trouxe como dado novo a descoberta do parasito em material arqueológico, afastando fatores de confusão epidemiológica. 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 de seus hospedeiros nos continentes^{4,5,30}. A construção do quadro da distribuição

passada de infecções parasitárias, através da descoberta de parasitos em material arqueológico, possibilita especulações sobre a origem de populações e sobre seu relacionamento com outras populações, 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 técnica baseada no ácido nucléico para o diagnóstico de doenças infecciosas. Abriu-se um campo imenso de interpretações de resultados para a epidemiologia, a prevenção e o 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 nucléico recuperado de espécimens arqueológicos, paleontológicos ou de museus. Em um senso amplo, pode ser aplicado para qualquer ácido nucléico 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. Isto tornou possível a aplicação em pequenas quantidades de ácido nucléico 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 dessa técnica para a arqueologia, mostrando suas perspectivas e seus limites. Stone *et al.*⁹⁰ e Monsalve *et al.*⁶¹ mostraram suas possibilidades para estudos de determinação de sexo em esqueletos, e das relações filogenéticas entre populações pré-históricas.

A técnica da PCR tem sido aplicada para o 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 à 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 uma coleção do Museu Nacional, UFRJ, por mais de 40 anos¹⁵. Em coprólitos humanos de Minas Gerais, datados de até 4.000 anos, identificou-se material genético de bactérias⁶.

O diagnóstico de Doença de Chagas e de 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 2.000 anos, naquela região^{8,6,1}. Recentemente, Guhl *et al.*^{40,41} e Ferreira *et al.*³¹ encontraram múmias chilenas, datadas de 4.000 a 2.000 anos do presente, positivas para Doença de Chagas pela reação da polimerase em cadeia (PCR) e por hibridização.

Os primeiros resultados com a técnica da PCR e suas variantes se acumulam, fazendo-se diagnósticos de infecções parasitárias em material antigo, 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, possibilitarão maior entendimento sobre a emergência e a reemergência de doenças infecciosas.

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.

Key words: paleoparasitology, origin of parasitism, evolution, parasitic infections, infectious diseases, aDNA.

Endereço para correspondência:

Fundação Oswaldo Cruz
Escola Nacional de Saúde Pública
Rua Leopoldo Bulhões, 1.480 - CEP 21041-210 - Rio de Janeiro-RJ
HYPERLINK mailto:adauto@ensp.fiocruz.br - adauto@ensp.fiocruz.br
Tel.: (0xx21) 598-2587

Referências

1. ALLISON, M.J.; 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 Electr*, Caxambu, MG, 1986, p.66.
4. ARAÚJO, A & FERREIRA, LF - Oxiúrfase 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 & TOWSEND, 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, 1973, p.965.
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., 1994. pp. 3-13. • **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 Unaf, 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, 1972. p.446. • **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. p.45. • **37. FUTUYMA, DJ** – Evolutionary Biology. 2nd Ed., Sinauer Ass.Inc., Sunderland, Massachusetts, 1986. p. 600. • **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, an 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. pp.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 Zealand 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. pp. 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. EVINE, 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. pp.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 burgdorferi* 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. pp. 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