

**PALEOPARASITOLOGIA: PESQUISAS RECENTES COM NOVAS TÉCNICAS***Adauto Araujo**Luiz Fernando Ferreira*Escola Nacional de Saúde Pública/ Fundação Oswaldo Cruz - R. Leopoldo Bulhões, 1480, 21041-210,  
Rio de Janeiro, RJ [adauto@ensp.fiocruz.br](mailto:adauto@ensp.fiocruz.br)*Marcelo Gonçalves*

Hospital Universitário, Universidade Federal do Rio de Janeiro

*Karl Reinhard*

Universidade de Nebraska, Lincoln, Nebraska, Estados Unidos

Os trabalhos publicados em paleoparasitologia foram revistos por Reinhard et al. (1988). 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. Revê-se aqui o desenvolvimento destas técnicas e perspectivas de estudo que elas proporcionam.

***O Período dos Pioneiros***

Paleoparasitologia é o estudo de parasitos em material arqueológico. O primeiro a registrar a presença de ovos de parasitos em material antigo foi Ruffer (1910), diagnosticando ovos de *Schistosoma haematobium* em tecido renal de múmias egípcias. Sir Marc Armand Ruffer desenvolveu técnica de reidratação que permite cortar e corar tecidos mumificados em preparações histológicas, possibilitando o diagnóstico de diversas doenças em populações do antigo Egito. Embora tenham sido publicados alguns outros trabalhos (Szidat, 1944; Pizzi & Schenone, 1954; Taylor, 1955; Helbaeck, 1958), foi somente a partir de 1960 que se multiplicaram os encontros de parasitos em material antigo e, finalmente, em 1979, esta nova ciência foi chamada de Paleoparasitologia (Ferreira et al., 1979).

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 (Taylor, 1955; Sandison, 1967). Entretanto, não se conseguia aplicar as técnicas de rotina de análise parasitológica nem se obtinham preparações em lâminas duradouras. Ovos e cistos de parasitos se perdiam em soluções não isotônicas. Somente com a introdução da técnica de reidratação de coprólitos em solução aquosa de fosfato trissódico (Callen & Cameron, 1960), uma adaptação da técnica usada para recuperar espécimens dessecados em coleções de museu (Van Cleave & Ross, 1947), multiplicaram-se os achados em coprólitos e outros tipos de material arqueológico, como os coletados diretamente de corpos mumificados, em fossas e latrinas medievais (Bouchet et al., 1998; Bouchet & Paicheler, 1995). 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 epidemiológica (Cockburn, 1967). Esta mensagem alcançou parasitologistas nas Américas do Norte e do Sul e também na Europa. Estes trabalhos podem ser encontrados nas revisões de Fry (1976), Araújo et al. (1981), Horne (1985) e Nozais (1985). Na década seguinte, os trabalhos puderam-se voltar para interpretações paleoepidemiológicas.

### ***Paleoepidemiologia (1980-1997)***

Este período caracteriza-se por discussões sobre novas questões metodológicas. O problema maior da paleoparasitologia 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. (1991) 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 (Jones, 1982; Confalonieri et al., 1985). 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. Nestes casos, devem-se fazer interpretações cuidadosas dos achados para que se evitem erros de diagnóstico. Um exemplo pode ser encontrado em Moore et al. (1969), 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 se encontra em populações indígenas em cujas fezes se encontram ovos de *Capillaria*.

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 transmissão (Araújo et al., 1986). Estes trabalhos voltaram-se principalmente para o diagnóstico diferencial entre helmintos, fungos e pólen (Reinhard et al., 1988). O diagnóstico sorológico foi usado para identificar a infecção por protozoários em coprólitos (Fouant et al., 1982; Faulkner, 1991).

Uma visão de um quadro de infecções parasitárias em populações pré-históricas pode ser hoje desenhado, com ampla distribuição por todas as 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 alcançou um estágio de metamorfose de um período descritivo para um enfoque de contribuições à patoecologia do parasitismo (Ferreira et al., 1988).

Estudos quantitativos também mostraram interessantes padrões epidemiológicos. 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, enquanto os agricultores eram parasitados por parasitos específicos humanos, isto é, de origem filogenética. Alguns estudos resultaram na correlação positiva entre hiperostose porótica e parasitismo (Reinhard, 1992). Estudos de patoecologia em agricultores pré-históricos mostraram que a prevalência de parasitos era dependente de padrões

sanitários, tipos de moradia e ambiente local (Reinhard, 1996; 1998). 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 populações (Reinhard et al., 1997).

Reinhard (1996) desenvolveu técnica de recuperação de ovos de parasitos para uso em solo e sedimento arqueológico, em 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 (Samuels, 1965).

Quanto a coprólitos mineralizados, utilizam-se soluções ácidas, como ácido clorídrico a 10% para separação de partículas e visualização microscópica (Ferreira et al., 1993).

### ***Paleoparasitologia e migrações pré-históricas***

Parasitos são organismos que encontram em outro organismo, de espécie diferente, o seu nicho ecológico. Podem apresentar alta especificidade em relação ao hospedeiro possibilitando estudos filogenéticos (Araújo et al., 1999). Desde o início do século parasitologistas voltaram-se para a linha de estudo de migrações pré-históricas humanas e parasitismo (Fonseca, 1972). A partir do desenvolvimento da paleoparasitologia, retomou-se esta linha que originou dados, através de marcadores biológicos, para a questão da origem de determinadas populações humanas e seus hospedeiros nos continentes (Araújo & Ferreira, 1995; 1997). A construção do quadro da distribuição passada de infecções parasitárias 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.

### ***Biologia Molecular e ADN antigo (ancient DNA)***

Hoje, novas perspectivas 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 sequências específicas e conhecidas de ADN ou ARN de parasitos. O uso da reação da polimerase em cadeia (PCR) fundamenta-se na replicação *in vitro* da dupla hélice da molécula de ADN, usada para amplificar o ADN situado entre regiões de uma sequência 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, 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 autólise (Herrmann & Hummel, 1994).

A hibridização foi a primeira técnica a ser usada para recuperar material genético de material arqueológico. Higuchi et al. (1984) conseguiram o primeiro clone molecular usando restos de pele de uma espécie de zebra extinta. Pääbo (1985) e Wilson et al. (1985) 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 da polimerase em cadeia, 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. (1986) e Saiki et al (1985;1989). Pääbo (1989; 1990) adaptaram-na para material arqueológico. O ADN antigo foi então amplificado de ossos humanos e tecidos mumificados (Hagelberg et al., 1989; Horay et al., 1989; Hanni et al., 1990); Hagelberg & Clegg, 1991; Pääbo, 1991). Brown & Brown (1992) e Pääbo (1991; 1993) fizeram revisões sobre a importância desta técnica para a arqueologia mostrando suas perspectivas e limites. Stone et al. (1996) e Monsalve et al. (1996) mostraram suas possibilidades para estudos de determinação de sexo em esqueletos e relações filogenéticas entre populações pré-históricas.

### ***Paleoparasitologia Molecular***

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 (Pizzi & Schenone, 1954; Witemberg, 1961; Ferreira et al., 1992). Os protozoários teciduais são ainda mais raramente diagnosticados.

Lesões paleopatológicas são descritas em corpos mumificados, relacionadas a protozoários. Rothhammer et al. (1985) encontrou, em cortes histológicos, formas teciduais identificadas como de *Trypanosoma cruzi*, em populações pré-históricas andinas. Fornaciari et al. (1992) usaram a microscopia eletrônica e técnicas histoquímicas, confirmando o diagnóstico de infecção chagásica em múmias peruanas.

Mais recentemente, Guhl et al. (1997;1999) e Ferreira et al. (1999) encontraram múmias chilenas datadas de 4000 a 2000 do presente, positivas para Doença de Chagas na reação da polimerase em cadeia (PCR).

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 museu (Persing et al., 1990), material genético de bactérias em plantas fossilizadas do mioceno (Sidow et al., 1991), *Mycobacterium tuberculosis* em corpos mumificados humanos (Spigelman & Lemma, 1993; Salo et al., 1994; Arriaza et al., 1995). 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 anos (Cantarino et al., 1998). Em coprólitos humanos de Minas Gerais, datados de até 4000 anos, identificou-se material genético de bactérias (Araújo et al., 1998).

O diagnóstico de Doença de Chagas em populações pré-históricas vem se desenvolvendo em nosso laboratório, na Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz, desde 1995. Inicialmente montou-se um trabalho experimental em que se infectavam camundongos com *Trypanosoma cruzi*. Constatada a infecção, os animais eram mortos e dessecados em estufa até completar-se a desidratação. Em seguida testaram-se diferentes procedimentos para recuperação do material genético. 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 há pelo menos 2000 anos nesta região (Bastos et al., 1996; Araújo et al., 1998).

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 ósseos (Hagelberg et al., 1991), 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 (Wilson et al., 1985; Wilson, 1993). Este enfoque poderá trazer respostas sobre variações na virulência de patógenos que, conjuntamente com os estudos de patoecologia de parasitos em diferentes patocenoses, possibilitará maior entendimento sobre emergência e reemergência de doenças infecciosas.

Financiamento: CNPq/PRONEX; PAPES/FIOCRUZ

#### Referências

ARAÚJO, A.; FERREIRA, L.F. & CONFALONIERI, U. - A contribution to the study of helminth findings in archaeological material in Brazil. **Rev. Bras. Biol.** 41: 873-881, 1981.

ARAÚJO, A.; FERREIRA, L.F.; CONFALONIERI, U. & MEIRELLES, M.N. - 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.

ARAÚJO, A. & FERREIRA, L.F. - Oxiuríase e migrações pré-históricas. **Manguinhos** 1 (II): 99-109, 1995.

ARAÚJO, A. & FERREIRA, L.F. - Homens e parasitos: a contribuição da paleoparasitologia para a questão da origem do homem na América. **Rev. da USP** 34: 58-70, 1997.

ARAÚJO, A.; REINHARD, K.; BASTOS, O.M.; CANTARINO, L.; PIRMEZ, C.; IÑIGUEZ, A.; VICENTE, A.C.; MOREL, C.M. & FERREIRA, L.F. - Paleoparasitology: perspectives with new techniques. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo 40: 371-376, 1998.

ARAÚJO, A.; FERREIRA, L.F. & REINHARD, K. - Dos caçadores de micróbios à paleoparasitologia molecular. **Ciência Hoje** 152: 32-38, 1999.

BASTOS, O.M.; ARAÚJO, A.; FERREIRA, L.F.; SANTORO, A.; WINKER, P. & MOREL, C.M. - Experimental paleoparasitology: identification of *Trypanosoma cruzi* DNA in desiccated mice tissue. **Paleopathol News** 94: 5-8, 1996.

BOUCHET, F. & PAICHELER, J.C. - Paleoparasitologie: presumption of Bilharziose on an archaeological site from XVth century of Montbeliard (Doubs, France). **Cop. R. Acad. Sci** 318: 811-814, 1995.

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.

BROWN, T.A. & BROWN, K.A. - Ancient DNA and the archaeologist. **Antiquity** 66: 10-23, 1992.

CALLEN, E.O. & CAMERON, T.W.M. - A prehistoric diet as revealed in coprolites. **New Sci** 8: 35-40, 1960.

CANTARINO, L.; ARAÚJO, A.; SABROZA, P.; FERREIRA, L.F.; FERNANDES, O. & PIRMEZ, C. - *Leishmania amazonensis* in taxidermized rodents. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 93: 182-183, 1998.



CHAME, M.; FERREIRA, L.F.; ARAÚJO, A. & CONFALONIERI, U. - Experimental paleoparasitology: an approach to the diagnosis of animal coprolites. **Paleopathol News** 76: 7-9, 1991.

COCKBURN, A. - **Infectious Diseases: their evolution and eradication**. Charles C. Thomas Publ., USA, 1967.

CONFALONIERI, U.; RIBEIRO, B.M.; FERREIRA, L.F. & ARAÚJO, A. - The experimental approach to paleoparasitology: desiccation of *Trichuris trichiura* eggs. **Paleopathol News** 51: 9-11, 1985.

FAULKNER, C.T. - Prehistoric diet and parasitic infection in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated human paleofeces. **Am. Antiquity** 56: 687-700, 1991.

FERREIRA, L.F.; 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.

FERREIRA, L.F.; ARAÚJO, A. & CAMILLO-COURA, L.- Paleoparasitologia. **An. Acad. Nac. Med.** 152: 22-25, 1992.

FERREIRA, L.F.; ARAÚJO, A.; CONFALONIERI, U.; CHAME, M. & RIBEIRO, B.M. - *Eimeria* oocysts in deer coprolites dated from 9,000 years B.P. **Mem Inst. Oswaldo Cruz** 87: 105-106, 1992.

FERREIRA, L.F.; ARAÚJO, A. & RANGEL, A. - Nematode larvae in fossilized animal coprolites from lower and middle pleistocene sites, central Italy. **J. Parasitol** 79: 440-442, 1993.

FORNACIARI, G.; CASTAGNA, M.; VIACAVAL, P.; TOGNETI, A.; BEVILACQUA, G. & SEGURA, E.L. - Chagas' disease in Peruvian Inca mummy. **Lancet** 339: 128-1129, 1992.

FOUANT, M.M.; ALLISON, M.J. & GERSZTEN, E. - Intestinal parasitic infestations among pre-Columbian Indians. **Lab. Invest.** 46: 26 A, 1982.

FRY, G.F. - Analysis of prehistoric coprolites from Utah. **Anthropol. Papers**, Univ. Utah, 97, 1976. 45pp.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; YOCKTENG, R.; VALLEJO, G.A. & ARROYO, F.C. - *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. **Lancet** 349: 1370, 1997.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; VALLEJO, G.A.; YOCKTENG, R.; CÁRDENAS-ARROYO, F.; FORNACIARI, G.; ARRIAZA, B. & AUFDERHEIDE, A.C. - Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000-Year-old mummified human tissue from Northern Chile. **Am.J.phys. Anthropol** 108: 401-407, 1999.

HAGELBERG, E.; SKYES, B. & HEDGES, R. - Ancient bone DNA amplified. **Nature** 342: 485, 1989.

HAGELBERG, E. & CLEGG, J.B. - Isolation and characterization of DNA archaeological bone. **Proc. R. Soc. London** 244: 45-50, 1991.

HAGELBERG, E.; BELL, L.S.; ALLEN, T.; BYDE, A.; JONES, S.J. & CLEGG, J.B. - Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. **Phil. Trans. R. Soc. London** 333: 399-407, 1991.

HANNI, C.; LAUDET, A.; SAKKA, M.; BEGUE, A. & STEHELIN, D. - Amplification of mitochondrial DNA from ancient human teeth bones. **Comp. Rend. Acad. Sci. Paris** (series III) 310: 365-370, 1990.

HELBAEK, H. - Studying the diet of ancient man. **Archaeol.** 14: 95-101, 1958.

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.

HIGUCHI, R.; BOWMAN, B.; FREIBERGER, B.; RYDER, O.A. & WILSON, A.C. - DNA sequence from the quagga, an extinct member of the horse family. **Nature** 312: 282-284, 1984.

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.

HORNE, P.D. - 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.

JONES, A.K.G. - 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

MONSALVE, M.V.; CARDENAS, F.; GUHL, F.; DELANEY, A.D. & DEVINE, D.V. - Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. **Ann. Hum. Gen.** 60: 293-303, 1996.

MOORE, J.G.; FRY, G.F. & ENGLERT Jr, E. - Thorny-headed worm infection in North American prehistoric man. **Science** 163: 1324-1325, 1969.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G. & ERLICH, H. - Specific enzymatic amplifications of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.** 14: 263-273, 1986.

NOZAIS, J.P. - Hypothèses sur l'origine de certains parasites du continent latino-américain. - **Bull. Soc. Pathol. Ex.** 78: 401-412, 1985.

PÄÄBO, S. - Molecular cloning of ancient Egyptian mummy DNA. **Nature** 314: 644-645, 1985.

PÄÄBO, S. - Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 86: 1939-1943, 1989.

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.

PÄÄBO, S. - Amplifying DNA from archaeological remains: a meeting report. **PCR Met. Applic.** 1: 107-110, 1991.

PÄÄBO, S. - Ancient DNA. **Sci. Amer.** Nov., 60-66, 1993.

PERSING, D.H.; TELFORD, S.R.; RYS, P.N.; DODGE, D.E.; WHITE, S.E. & SPIELMAN, - A. Detection of *Borrelia burgdoferi* DNA in museum specimens of *Ixodes dammini* ticks. **Science** 249: 1420-1423, 1990.

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.

REINHARD, K.J.; HEVLY, R.H. & ANDERSON, G.A. - Helminth remains from prehistoric Indian coprolites from the Colorado Plateau. **J. Parasitol** 70: 630-639, 1987.

REINHARD, K.J. - 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.

REINHARD, K.J. - Parasite ecology of two Anasazi villages. In: E.J. Reitz, L.A., Newson & S.J. Scudder (Eds.) - **Case studies in environmental archaeology**. New York: Plenum Press, 1996.

REINHARD, K.J. - Parasitology. In: **Mummies, disease, and ancient cultures**. A. Cockburn; E. Cockburn & T.A. Reyman (Eds.), Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1998 (in press).

REINHARD, K.J.; CONFALONIERI, U.; HERRMANN, B.; FERREIRA, L.F. & ARAÚJO, A. - A recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological techniques. **Homo** 37: 2117-239, 1988.

REINHARD, K.J.; GARDNER, S.L. & HUGOT, J.P. - Evolutionary history of enterobiasis. **An. Meet. Paleopathol. Ass.**, 1997.

ROTHHAMMER, F.; ALLISON, M.J.; NUÑEZ, L.; STANDEN, V. & ARRIZA, B. - Chagas' disease in pre-Columbian South America. **Am. J. Phys. Anthropol.** 68: 495-498, 1985.

RUFFER, M.A. - Note on the presence of *Bilharzia haematobia* in Egyptian mummies of the Twentieth Dynasty (1250-1000 BC). **Brit. Medd. J.** 1: 16, 1910.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J. & JALOONA, F. - Enzymatic amplification of betaglobin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 230: 1350-1354, 1985.

SAIKI, R.K. ; GELFAND, D.H. & STOFELL, F. - Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science** 239: 487-491, 1989.

SALO, W.L.; AUFDERHEIDE, A.C.; BUIKSTRA, J. & HOLCOMB, T. - Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. **Proc. Natl. Acad. Sci** 91: 2091-2094, 1994.

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.

SANDISON, A.T. - Parasitic diseases. In: D. Brothwell & A.T. Sandison (Eds.) - **Diseases in antiquity**. C.C. Thomas, Springfield, 1967. p. 178-183.

SIDOW, A.; WILSON, A.C. & PÄÄBO, S. - Bacterial DNA in *Clarkia* fossil. **Phil. Trans. R. Soc. London** 333: 429-433, 1991.

SPIGELMAN, J. & LEMMA, E. - **The use of polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* in ancient skeletons**. *Int. J. Osteoarchaeol.* 3: 137-143, 1993.

STONE, A.C.; MILNER, G.R.; PÄÄBO, S. & STONEKING, M. - Sex determination of ancient human skeletons using DNA. **Am. J. phys. Anthropol.** 99: 231-238, 1996.



SZIDAT, L. - Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor-und frühgeschichtlichen Moorleichen. **Zeitschr. für Parasit.** 13: 265-274, 1944.

TAYLOR, E.L. - Parasitic helminths in mediaeval remains. **Vet. Rec.** 67: 216-218, 1955.

VAN-CLEAVE, H.J. & ROSS, J.A. - A method for reclaiming dried zoological specimens. *Science* 105: 318, 1947.

WILSON, S.M. - Application of nucleic acid-based technologies to the diagnosis and detection of disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. & Hyg.** 87: 609-611, 1993.

WILSON, A.C.; CANN, R.L.; CARR, S.M.; GEORGE, M.; GYLLENSTEN, U.B.; HELM-BYCHOWSKI, K.M.; HIGHUCHI, R.G.; PALUMBI, S.R.; PRAGER, E.M.; SAGE, R.M. & STONEKING, M. - Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. **Biol. J. Linn. Soc.** 26: 375-400, 1985.

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