
PALEOPARASITOLOGIA:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E NOVAS PERSPECTIVAS

PARA OS ESTUDOS MICROBIOLÓGICOS

Joseli Maria da Rocha Nogueira, ¹ Luis Fernando Ferreira da Silva, ¹ Ernesto Hofer ² e Adauto José Gonçalves de Araújo ³

RESUMO

Este trabalho consiste na revisão da literatura sobre o tema da Paleoparasitologia e sugere perspectivas de desenvolvimento de novos estudos sobre a introdução de técnicas de biologia molecular e imunologia. Aborda o tema central e outros correlatos e traça o caminho destas pesquisas até as metodologias usadas atualmente na área. E, finalmente, mostra que essas novas possibilidades permitirão uma melhor compreensão da relação saúde-ambiente-doença no passado, mediante a análise do conteúdo de material arqueológico e de sua correlação com a detecção de possíveis infecções microbianas em populações antigas.

DESCRITORES: Paleoparasitologia. Paleopatologia. Coprólitos. Múmias. Evolução de doenças.

INTRODUÇÃO

O termo Paleoparasitologia foi criado em 1979 pelo Dr. Luiz Fernando Ferreira, pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz, e denomina o estudo (logos) de parasitos em material antigo. O objetivo primário do estudo é o reconhecimento de parasitos presentes em populações no passado. Desse modo, pode-se alcançar uma melhor compreensão das possíveis doenças e dos problemas de natureza epidemiológica que ocorreram remotamente (Ferreira et al., 1988).

1 Departamento de Ciências Biológicas da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – Fundação Oswaldo Cruz-RJ.

2 Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz – Fundação Oswaldo Cruz-RJ.

3 Departamento de Endemias da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – Fundação Oswaldo Cruz-RJ.

Endereço para correspondência: Joseli Maria da Rocha Nogueira, Departamento de Ciências Biológicas/ ENSP-FIOCRUZ, Rua Leopoldo Bulhões, 1480. Rio de Janeiro-RJ, Brasil. E-mail: joseli@fiocruz.br

Recebido para publicação em 26/1/2006. Revisto em 20/4/2006. Aceito em 29/5/2006.

Ao buscar entender o processo saúde-doença dos povos antigos, esta disciplina permite descobrir vestígios de hábitos e costumes, bem como estabelecer possíveis associações entre diferentes formas de infecção (Palhano Silva & Nogueira, 2005). No estudo das relações evolutivas entre os seres humanos, os animais e os diversos agentes parasitários, a Paleoparasitologia constitui uma ciência valiosa para a compreensão do comportamento e da distribuição de zoonoses e endemias através do tempo em diferentes lugares, além de participar também de forma coadjuvante no esclarecimento de processos de povoamento e dispersão de populações humanas antigas (Ferreira et al., 1988; Guhl et al., 2000).

O diagnóstico de doenças em populações extintas pode ser pesquisado com base em diversos materiais como, por exemplo, tecidos, sinais de anormalidade em registros ósseos e até mesmo marcadores biológicos como é o caso de ovos de parasitos detectados em coprólitos (Duarte et al., 2002). Os coprólitos (gr. copros = fezes; litos = pedra), que servem de vasta fonte para essas pesquisas, são fezes antigas conservadas naturalmente por dessecação ou mineralização. Eles mantêm, muitas vezes, vestígios físicos ou mesmo moleculares de organismos que estavam presentes nos intestinos do homem e/ou animais que os originaram (Araújo & Ferreira, 2000). Esse material, além de informações gerais sobre a saúde, também pode prover subsídios sobre a dieta e as práticas de agricultura (Donoghue et al., 2004; Rollo et al., 2002).

O trato gastrointestinal pode ser acometido por uma ampla gama de agentes responsáveis por infecções, que variam desde processos autolimitados a diarreias graves e fatais (Schaechter et al., 2002). Tais infecções podem ter etiologia viral, bacteriana ou de outros parasitos, com transmissão desses agentes por meio de alimento ou água contaminada (WHO, 2000).

Até recentemente a pesquisa de helmintos em coprólitos ocorria pela identificação de ovos e larvas através da microscopia óptica. Havia, no entanto, uma grande lacuna em relação a outros agentes bastante numerosos como protozoários, bactérias e vírus. Com o incremento do estudo da Paleoparasitologia por meio da biologia molecular e das interações sorológicas com anticorpos monoclonais, abriram-se novas possibilidades para a investigação de organismos não detectáveis pela pesquisa direta de vestígios. Essas novas técnicas possibilitaram a definição da Paleoparasitologia como uma ciência caracterizada pela interdisciplinaridade, que, em tese, permite também a pesquisa destes organismos considerados não detectáveis anteriormente (Araújo et al., 1998; Pääbo, 1991).

METODOLOGIA

Apesar de que alguns artigos de revisão tenham como definição não incluir os procedimentos (Castro & Guidugli, 2001), admite-se, entretanto, que seja pertinente delinear os critérios utilizados nesta tarefa. Desse modo, neste trabalho a abordagem inicial concentrou-se na pesquisa de outras revisões, entre as quais não foi encontrada nenhuma com o mesmo objetivo e abrangência ou com os mesmos critérios de seleção.

Para o levantamento bibliográfico, foram acessadas diferentes bases de dados disponíveis *on-line* como, por exemplo: a Bireme (<http://www.bireme.br/>), que engloba os sistemas Scielo (*Scientific Eletronic Library on line*), Lilacs, Scad e a Biblioteca Cochrane; o NCBI (*National Center for Biotechnology Information* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), que envolve o Pubmed, o “*online books*” e outras bases virtuais; a *Nature Publishing Group* (<http://www.nature.com/index.html>); o portal CAPES (<http://periodicos.capes.gov.br/>) e buscadores internacionais como o *Google Scholar* (<http://scholar.google.com/>). Procurou-se utilizar diferentes estratégias de busca cruzando palavras-chave (em inglês) pertinentes ao tema do trabalho tais como: *ancient DNA, coprolites, ELISA, paleoparasitology, paleomicrobiology, ancient diseases, diseases in antiquity, diseases in ancient humans, ancient populations and diseases, mummy, mummies, ancient parasites, organic remains*.

Realizadas as buscas, imprimiram-se para leitura os resumos dos trabalhos que, aparentemente, possuíam maior afinidade com o tema da revisão. Os artigos sem relação estreita com tema foram excluídos, solicitando-se, via internet ou à biblioteca, os artigos completos cujos resumos mostraram associação com a pesquisa.

Há que se fazer menção destacada ao exemplar especial das *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98 (supl.1), publicado em 2003, cujo acesso é livre na rede (<http://memorias.ioc.fiocruz.br/98sup/98sup.html>), e de onde muita informação sobre o tema pôde ser retirada.

EVOLUÇÃO HISTÓRICA DA PALEOPARASITOLOGIA

O parasitismo é inerente à vida. Os parasitos são encontrados em cada ser vivo de todas as espécies existentes na Terra (Poulin & Morand, 2000) e, desde o início da vida, o parasitismo foi utilizado por proto-organismos para multiplicarem-se. Provavelmente o parasitismo deve ter ocorrido em um estágio primitivo da evolução (Bremermann, 1983), pois a uniformidade bioquímica dos seres vivos atuais aponta para uma origem comum em um antepassado que vivia há bilhões de anos (Nasmith, 1995; Orgel, 1998). A vida na Terra somente foi possível em razão do parasitismo ainda no nível molecular e as formas de vida atuais demonstram ainda restos dessas associações antigas em seus genomas (Galtier et al., 1999; Cavalier-Smith, 2001).

Se por um lado há o confronto entre teorias relacionadas com a emergência e a evolução dos agentes parasitários, por outro, evidências arqueológicas não documentais também ilustram a complexa e antiga relação entre os parasitos, hospedeiros humanos e animais na determinação do processo saúde-doença das populações (Araújo et al., 2003). Através da interação entre a Medicina, a Arqueologia e a Antropologia, foi possível a concepção de uma nova disciplina, a Paleopatologia, campo de investigação das enfermidades que nos acompanham desde a Antiguidade, por meio do estudo de achados humanos arqueológicos. Esta especialidade contribuiu também para a reconstituição do modo de vida das populações antigas, assim como de sua formação e dispersão geográfica.

Além do estudo direto de esqueletos e anomalias ósseas, as técnicas mais usadas nessas análises foram as necropsias, que quase sempre alteram ou destroem os corpos preservados, e a radiologia, que é um método não invasivo (David, 1997).

Metodologias empregadas no início dos estudos paleopatológicos levaram a resultados de caráter principalmente descritivos, enquanto estudos mais recentes têm procurado inserir uma análise mais qualitativa, buscando contextualizar as informações arqueológicas com modelos culturais pré-históricos sobre doenças e sua relação com o modo de vida (Aufderheide & Rodriguez-Martin, 1998; Mendonça de Souza et al., 2003).

A Paleoparasitologia é um ramo da Paleopatologia que se baseia em estudos de resquícios biológicos na procura de parasitos, visando à identificação de morbidades nas populações humanas antigas e à reconstrução de suas rotas de migração e ocupação territorial através dos tempos. Sua origem deve-se a Sir Marc Armand Ruffer que, em 1910, identificou ovos de *Schistosoma haematobium* em tecido renal de uma múmia egípcia de 3.200 anos. Ele desenvolveu técnicas de reidratação de tecidos mumificados, possibilitando preparações histológicas e, conseqüentemente, o diagnóstico de doenças em populações do antigo Egito. O intercâmbio com egiptólogos ampliou as perspectivas de estudo da ocorrência dos parasitos no passado (Ruffer, 1921).

A associação entre os parasitologistas e os arqueólogos estruturou-se, mais tarde, a partir da análise de coprólitos coletados em sítios arqueológicos e enviados ao laboratório. Todavia, até a metade do século XX, por limitações técnicas, foram descritos em coprólitos poucos ovos e larvas de helmintos parasitos de animais e de humanos. Destes últimos, a maioria era proveniente do interior de corpos mumificados e do conteúdo de fossas européias medievais (Szidat, 1944; Pizzi & Schenone, 1954; Taylor, 1955).

O método usado para a análise dos coprólitos consistia na análise do material seco, sendo as amostras quebradas e passadas por peneiras graduadas para posterior exame microscópico (Fry, 1977). A partir da década de 1960, o uso de fosfato trissódico em solução aquosa como reidratante impulsionou a Paleoparasitologia. Essa foi uma adaptação da técnica usada para recuperar espécimes dessecados em coleções de museus. Esse método, utilizado nos coprólitos dessecados, permitiu o emprego de técnicas parasitológicas comumente aplicadas nos laboratórios clínicos (Callen & Cameron, 1960; Reinhard et al., 1988). Essa melhoria da técnica possibilitou que achados de ovos e larvas de parasitos fossem mais freqüentes, demonstrando as potencialidades desta ciência e todas as suas implicações no estudo da evolução parasito-hospedeiro e da dispersão das espécies. A Paleoparasitologia mostrou, então, sua vocação para a interdisciplinaridade (Gonçalves et al., 2002a).

Wilke e Hall (1975), em uma revisão comentada sobre coprólitos, fazem uma discussão sobre os problemas relativos às técnicas e às dificuldades encontradas nos estudos desse material. Apesar de quase vinte anos passados, algumas perguntas ainda não estão totalmente solucionadas, como a confiabilidade da origem humana das amostras e as interpretações sobre o parasitismo e o falso-parasitismo.

Desde então, diversas espécies de parasitos têm sido evidenciadas, dentre as quais os helmintos são os mais freqüentes tanto em tecidos mumificados como em fezes dessecadas. No entanto, a identificação de outros organismos, como protozoários, ainda é escassa em razão da fácil destruição de sua membrana cística por processos ambientais adversos (Bouchet et al., 2003a). Métodos de identificação dos antígenos têm sido empregados na tentativa de se obter um diagnóstico mais acurado desses parasitos (Gonçalves et al., 2004).

Os materiais mais comumente pesquisados na Paleoparasitologia são os coprólitos, ou seja, fezes humanas ou de animais preservadas por dessecação mineralização, ou condições de anaerobiose em ambientes úmidos ou secos. São recolhidos de camadas arqueológicas, latrinas ou diretamente do lúmen intestinal de corpos mumificados (Bouchet et al., 2003a). Outras fontes importantes de material são os sedimentos de latrinas, compostos de grande quantidade de coprólitos já desintegrados, e corpos mumificados, seja por preparo artificial oriundo de prática cultural e religiosa ou por condições ambientais naturais.

A contribuição da Paleoparasitologia tem sido significativa no estudo das populações ameríndias do período pré-colombiano, possibilitando o reconhecimento e a análise evolutiva das infecções parasitárias que ocorriam na América antes do século XV (Mendonça de Souza et al., 1994). Assim, o fato de serem encontrados ovos de ancilostomídeos em coprólitos com datação de alguns milhares de anos refuta a idéia de ocupação exclusiva da América através do estreito de Bering, pela impossibilidade de manutenção do ciclo do parasito em tão baixa temperatura do solo. Evidências de outros agravos, como treponematoses, tuberculose e Doença de Chagas, já foram documentadas com base em material anterior à ocupação européia no século XV (Fornaciari et al. 1992, Gonçalves et al., 2002a; Sianto et al., 2003).

O mesmo tipo de trabalho vem sendo realizado no Velho Mundo (Nozais, 2003), buscando-se a origem e a dispersão das infecções parasitárias.

A técnica clássica de pesquisa inicia-se pela datação, que é realizada no material por métodos físicos (geralmente radiocarbono ou termoluminescência) e feita nas camadas arqueológicas ou diretamente no coprólito, ou ainda por contexto cultural (Gonçalves et al., 2002a). No exame morfológico geral do coprólito e no teor de seus restos alimentares, são obtidos dados que auxiliam na identificação de sua origem zoológica (Chame, 2003) e estabelecidos parâmetros que podem revelar importantes associações dos achados com padrões da dieta, paleoclima, paleobotânica e adaptações paleoecológicas. Esses dados têm proporcionado a criação da linha de investigação da Paleoepidemiologia (Wilke & Hall, 1975; Andrews & Fernandez-Jalvo, 1998; Chaves & Reinhard, 2003).

A técnica microscópica consiste na visualização em microscopia óptica de sedimentos provenientes do coprólito. Caso este 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). No caso de coprólito mineralizado, utiliza-se ácido clorídrico a 10% até sua desagregação, conforme a técnica de Jones (1983).

Concluída essa etapa, o material é concentrado pela técnica de sedimentação espontânea (Reinhard et al., 1988). O sedimento é então examinado no microscópio e devidamente identificado. As larvas e ovos encontrados são medidos e fotografados para comparações morfométricas. Esses dados são extremamente úteis como tentativa de identificar as espécies envolvidas e confirmar ou não a origem humana do coprólito (Confalonieri et al., 1988; Chame et al., 1991).

Vários trabalhos usando esta técnica já foram realizados com sucesso, entre eles a pesquisa de diferentes ácaros (Guerra et al., 2003), ovos e vestígios de distintos parasitos (Ferreira et al., 1988) e larvas de helmintos (Ferreira et al., 1993). No Japão, estudos realizados em antigos banheiros evidenciaram, entre outros achados, ovos de *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, e *Taenia* spp. (Matsui et al., 2003).

As múmias possuem um papel extremamente importante como fonte de informação, pois, a partir desse material, é possível afirmar, com certeza, que os restos de fezes recuperados são de seres humanos, o que pode não ocorrer com toda precisão nos coprólitos de sítios arqueológicos ou latrinas (Reinhard, 1998). Nessa situação, mesmo identificando o material como possivelmente humano, é impossível determinar o número de indivíduos acometidos ou se a parasitose estava presente em todos (Reinhard, 1990; Araújo et al., 2000). Assim, a maioria dos estudos epidemiológicos da Paleoparasitologia humana está associada, atualmente, à análise do conteúdo gastrointestinal de múmias. Todavia, muitos esforços estão sendo feitos no sentido de identificar com maior sensibilidade a origem dos coprólitos analisados (humanos ou animais), buscando-se detectar alguma substância e/ou substrato genuínos de determinada espécie.

Outro procedimento utilizado nessa investigação tem sido a técnica imunológica. Enquanto há dificuldade de detecção direta de protozoários pelo método clássico em coprólitos (Reinhard et al., 1988; Gonçalves et al., 2003), os antígenos nestes espécimes permanecem detectáveis por longos períodos em material antigo. Com a utilização dessas técnicas foram recuperadas proteínas ancestrais (Lowenstein, 1980; 1981; 1985; 1988; 1991), com o intuito de resgatar a informação genética a partir da sequência de aminoácidos. Outros achados bem sucedidos detectaram a presença de *Giardia duodenalis* por meio de técnicas imunológicas em material com mais de 2 mil anos (Faulkner et al., 1989; Allison et al., 1999; Gonçalves et al., 2002b).

O teste de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Voller et al., 1976), com anticorpos monoclonais, tem sido empregado de forma promissora na atualidade (Guhl et al., 1992). No Brasil, Gonçalves (2002) utilizou esta técnica e concluiu que sua sensibilidade era maior do que o exame microscópico para detecção de *Giardia duodenalis*. Usando um *kit* comercial com anticorpos anti-adesina de *Entamoeba histolytica* conjugados com a enzima peroxidase, identificou a presença do protozoário em amostras ancestrais de até 5.300 anos (Gonçalves et al., 2004).

Outra linha desenvolvida foi associada às pesquisas que utilizaram técnicas de biologia molecular para a detecção de fragmentos de ácido desoxirribonucléico de material biológico preservado ou fossilizado (Brown et al., 1994).

O termo *ancient DNA* (aDNA) engloba qualquer massa ou traço de DNA originado de um organismo morto ou de parte deste. Entretanto, qualquer DNA que tenha sido submetido a processos de autólise ou qualquer tipo de fixação é considerado aDNA (Herrmann & Hummel, 1994). Esse material também chamado de DNA antigo tem auxiliado de forma bastante abrangente esses estudos.

Podemos então considerar que o DNA recuperável em organismos ou seus restos, preparados por técnicas especiais de conservação nos museus, ou mesmo preservados naturalmente, é aDNA, e este é passível de recuperação, análise e identificação pelas técnicas empregadas para os demais estudos antropológicos (Costa, 1998). Tais estudos tiveram grande repercussão em todas as subdisciplinas da Biologia moderna, incluindo a evolução, a conservação biológica, a biologia animal e vegetal, a antropologia e a saúde humana, particularmente no que se refere às doenças infecciosas (Herrmann & Hummel, 1994).

Segundo Lindahl (1993), apesar do seu potencial, os ácidos nucléicos possuiriam baixa possibilidade de preservação em fósseis, em razão, principalmente, da existência de água na amostra, o que rapidamente hidrolisa o DNA. Todavia, tentativas para extrair o DNA de espécimes preservados e fósseis começaram a partir da segunda metade dos anos 1980, tornando-se mais comuns com o desenvolvimento da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (Waggoner, 2002).

Na técnica de PCR (Powledge, 2004), a existência de somente uma fita intacta de DNA-alvo é suficiente para produzir milhares de cópias deste fragmento, facilmente detectáveis pela eletroforese (Mullis & Fallona, 1987). Segundo Pääbo, esta técnica é ideal para o estudo do aDNA. O próprio autor, junto com seus colaboradores, publicou vários trabalhos de padronização da técnica de PCR para diferentes amostras, inclusive sugerindo estratégias para recuperação de aDNA degradado ou em mínimas quantidades (Pääbo et al., 1988; Pääbo & Wilson, 1988; Pääbo et al., 1989; Pääbo, 1989; 1990).

De acordo com as pesquisas de Willerslev e colaboradores (2004), que usaram técnicas apuradas para detecção, manutenção e recuperação de aDNA bacteriano, foi possível reconhecê-lo em espécimes na ordem de 400 mil anos ou mais. A pesquisa utilizou amostras preservadas em temperaturas constantes abaixo de zero, pH neutro e condições de anaerobiose, situações incomuns para esse tipo de análise.

É importante ressaltar que esta prática deve seguir rigoroso controle da qualidade para evitar problemas de contaminação com DNA contemporâneo, e sua técnica inclui diversas recomendações a serem seguidas, incluindo controles negativos e duplicação do teste em diferentes laboratórios (Pääbo, 1989; Lindahl, 1997; Cooper & Poinar, 2000; Vreeland & Rosenzweig, 2002).

NOVAS PERSPECTIVAS

Com o incremento do estudo da Paleoparasitologia pela biologia molecular e a análise de interações sorológicas com anticorpos monoclonais, abriu-

se uma nova possibilidade para a pesquisa de organismos não detectáveis pela análise direta de vestígios, tendo como pioneiros nestes estudos os protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp. e *Plasmodium falciparum* (Miller et al., 1994; Taylor et al., 1997; Guhl et al., 1997; Guhl et al., 1999; Aufderheide et al., 2004). Essas novas técnicas possibilitaram a afirmação da Paleoparasitologia como ciência interdisciplinar, permitindo também a pesquisa de organismos não evidenciáveis anteriormente como, por exemplo, as bactérias (Araújo et al., 1998; Pääbo, 1991).

Segundo Drancourt e Raoult (2005), o estudo de bactérias em material arqueológico teve início em 1993 com a detecção molecular de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* em esqueletos humanos (Spigelman et al., 1993). Usando os mesmos *primers*, Salo e colaboradores (1994) identificaram a bactéria no pulmão de uma múmia de mil anos. Seguindo a mesma linha, Rafi e colaboradores (1994) demonstraram a presença de *Mycobacterium leprae* em ossos. Prat e Mendoça de Souza (2003) publicaram uma retrospectiva comentada sobre os achados de tuberculose nas populações das Américas pré-históricas e, no ano seguinte, Donoghue e colaboradores (2004) retomaram o tema e fizeram uma ampla revisão sobre *Mycobacterium* e aDNA.

A maioria dos estudos iniciais era baseada em análise de tecido ósseo (Larsen, 2002), contudo a evolução dessas pesquisas permitiu, na atualidade, a utilização de outros materiais como tecidos mumificados e polpa dentária.

Os objetivos da Paleoparasitologia (Araújo et al., 2003; Drancourt & Raoult, 2005) incluem o diagnóstico de doenças do passado, a detecção de microorganismos patogênicos (vírus, bactérias, protozoários, helmintos ou outros organismos) em material biológico ancestral, a elucidação da epidemiologia dos agravos ocorridos no passado pela reconstituição temporal e geográfica dos indivíduos infectados, reservatórios e vetores. Esses estudos apontam também a possibilidade de traçar a evolução genética dos microorganismos encontrados. Esses dados certamente são de grande valia para o estudo das interações parasito-hospedeiro, em particular no que concerne às doenças infecciosas (Drancourt & Raoult, 2005).

A análise do aDNA surge como uma das mais promissoras técnicas dentro da Paleopatologia. Numerosos estudos mostraram a possibilidade de recuperação de ácidos nucleicos de material arqueológico (Willcox, 2002). A técnica de PCR tem sido utilizada com esse intuito desde 1997, com a detecção de *Escherichia coli* do conteúdo intestinal de múmias datadas do século III (Fricker et al., 1997). Esta pesquisa demonstrou tal possibilidade, mas ressaltou as inúmeras dificuldades relacionadas com o uso de fezes ancestrais como material de investigação.

Salienta-se que na pesquisa de agentes bacterianos em material arqueológico já manipulado, como coprólitos, por técnicas de biologia molecular, as amostras deverão inicialmente ser tratadas com irradiação ultravioleta para evitar contaminação com DNA contemporâneo (Iñiguez et al., 2003a; Santos, 1996).

A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) é usada para amplificar um segmento de DNA entre duas regiões de seqüência conhecida. Assim, dois

oligonucleotídeos (com seqüências diferentes e complementares) são usados como *primers* numa série de reações catalisadas pela enzima DNA polimerase. O *primer* a ser utilizado é definido com base em seqüência já conhecida, específica para o agente a ser pesquisado. A eletroforese em gel de agarose é um método padrão usado para separar, identificar e purificar os fragmentos de DNA amplificados (Sambrook et al., 1989).

Iñiguez (1998) demonstrou a possibilidade real de recuperação de DNA bacteriano de fezes dessecadas artificialmente, através da técnica de PCR, e conseguiu recuperar, após inoculação de *Vibrio cholerae* e *Bacillus sphaericus*, material genético desses microorganismos. A mesma pesquisadora, utilizando a técnica de RAPD-PCR, obteve as seqüências intactas de DNA de *Shigella flexneri* de coprólitos ancestrais.

Ubaldi e colaboradores (1998) foram capazes de detectar com sucesso aDNA humano e bacteriano de tecidos provenientes de órgãos internos de uma múmia andina do século X. Nesse estudo foi particularmente importante a caracterização da flora intestinal, que não sofreu os mesmos estímulos externos atuais, como dieta, interações ambientais, drogas e substâncias carcinogênicas, possibilitando comparações com a microbiota bacteriana atual.

Ainda em 1998, experimentos utilizando extração de aDNA de polpa dentária foram capazes de evidenciar DNA de *Yersinia pestis*, agente etiológico da peste murina ou negra, causadora de importante zoonose epidêmica que matou milhões de pessoas na Europa, confirmando sua existência em esqueletos dos séculos XVI e XVIII (Drancourt et al., 1998).

Rollo e Marota (1999), do departamento de Biologia Molecular da Universidade de Camerino – Itália, fizeram um trabalho retrospectivo, analisando outros achados, inclusive do mesmo grupo. Concluíram que, apesar das inúmeras respostas que estas análises podem fornecer, o estudo do aDNA representa uma tarefa de extrema exigência técnica, principalmente pela dificuldade de diferenciá-lo do DNA atual. Finalmente, sugerem que protocolos rigorosos devem ser aplicados para garantir a autenticidade dos resultados encontrados.

Em outro estudo, uma equipe alemã demonstrou a presença de DNA bacteriano no metatarso de uma múmia de criança egípcia, evidenciando uma possível bacteremia. Esses dados, associados a sinais ósseos de anemia crônica e deficiência de vitamina C, sugeriram aos autores tratar-se de infecção gastrointestinal com uma bactéria invasiva que se tornou sistêmica (Zink et al., 2000).

Cano e colaboradores (2000), extraindo DNA de amostras do estômago e cólon de uma múmia congelada do período neolítico (aproximadamente 5.350-5.100 anos atrás) e usando a técnica da PCR, foram capazes de identificar, após clonagem, bactérias comuns da flora fecal humana, bem como membros bacterianos do gênero *Vibrio*, comum em habitantes aquáticos.

Segundo Waggoner (2002), atualmente o DNA pode ser extraído de forma rotineira de diferentes espécimes de animais e vegetais mantidos em museus. Conseqüentemente, também é possível detectá-lo em organismos como helmintos, protozoários e bactérias presentes nos restos preservados.

Estudos feitos no Brasil por Iñiguez e colaboradores (2003ab) mostraram a importância da utilização de novas técnicas como polimerização reconstitutiva (RP) e o PCR RAPD (amplificação polimórfica randômica), as quais têm aumentado a possibilidade de sucesso com o aDNA que, em grande parte das amostras, se apresenta danificado. Conjugando essas técnicas em coprólitos provenientes do Chile e América do Norte, foram capazes de detectar aDNA de *Enterobius vermicularis*. Apesar de nem todas amostras se apresentarem positivas, os pesquisadores indicaram a possibilidade de, com o auxílio da técnica, comparar as seqüências antigas com as contemporâneas, estimulando estudos sobre a evolução da interação parasito-hospedeiro.

Apesar dos achados significativos de diferentes grupos de pesquisa, outros trabalhos demonstraram as falhas, criticando e sugerindo diferentes metodologias para essas análises, principalmente em relação ao controle de contaminação contemporânea (Nickle et al., 2002).

Vários autores referiram-se a dificuldades no isolamento de aDNA em coprólitos, em virtude da interferência de múltiplos fatores associados a essas amostras. Entretanto, existem algumas técnicas capazes de melhorar a extração ou facilitar a análise, razão pela qual os estudos em paralelo deverão ser realizados (Poinar et al., 1998). Assim, nesta linha de raciocínio, Vray (2002) destaca as novas tecnologias como imprescindíveis para futuros estudos de filogenia e sistemática de parasitos, bem como para o melhor entendimento da história das doenças parasitárias.

Estudos contemporâneos têm procurado detectar aDNA, inclusive de vírus, em restos humanos e de animais (Fornaciari & Marchetti, 1986; Dube et al., 1995; Reid et al., 2001; Basler et al., 2001; Fornaciari et al., 2003). Segundo Collins (2004), algumas proteínas são capazes de se conservar por mais tempo, sendo reconhecidas de forma mais efetiva do que os ácidos nucleicos em tecido ósseo e, por conseguinte, oferecem maiores possibilidades de identificação e aplicação nas análises paleoparasitológicas.

Cerutti e colaboradores (2004), atualizando os trabalhos de Drancourt (1998) e sua equipe, discutiram essas técnicas e apresentaram novos achados de *Y. pestis*, bactéria causadora da peste negra que assolou a população européia entre 1347 e 1352. Esse trabalho foi realizado com material ósseo e dentário obtido em diferentes sítios europeus, historicamente documentados como sepulturas de vítimas da peste. Os achados, inicialmente obtidos por análise imunoquímica, foram confirmados pela análise do aDNA.

Segundo a revisão feita por Bouchet e seus colaboradores (2003 b), a Paleoparasitologia está caminhando para o seu estado de arte, contribuindo para a história das relações parasito-hospedeiro, assim como abrindo novos campos no estudo das dimensões espaço-temporais do parasitismo que favorecem os conhecimentos sobre a emergência e reemergência das doenças infecciosas. Combes (2003) é da mesma opinião e aponta a Paleoparasitologia como o caminho para o diálogo entre diferentes disciplinas como a Paleontologia, a Arqueologia, a História, a Medicina humana e veterinária, a Epidemiologia, a Geografia e a Biologia Molecular, entre outras.

Nogueira e colaboradores acrescentam, ainda, comentários sobre a importância dos aspectos bioéticos na pesquisa paleoparasitológica, dentro do que pode ser considerado o estado de arte deste segmento (Nogueira et al., 2005; Nogueira & Palhano Silva, 2005).

CONCLUSÃO

A revisão mostrou-se um trabalho valioso para o conhecimento das pesquisas que foram e estão sendo conduzidas na área da Paleoparasitologia. Este levantamento permitiu interagir com a evolução e o aperfeiçoamento de técnicas imunológicas e de biologia molecular que, aliadas aos estudos clássicos de Paleoparasitologia, tornam-se poderosos meios de estudo das doenças ocorridas no passado, que poderão responder a várias questões históricas. Admite-se que, integradas, facilitarão pesquisas epidemiológicas e estudos de populações, auxiliando também na compreensão das modificações geográficas que ocorreram ao longo dos anos. Esses achados permitirão comparações entre parasitos do passado e os atuais, assim como a compreensão de mudanças evolutivas e do desenvolvimento das suas relações com os hospedeiros humanos e animais.

Novas linhas de pesquisa derivadas da Paleopatologia poderão agora se desenvolver, fornecendo uma nova classe de informações, com mais subsídios e inter-relações. Campos de investigação, como a paleoparasitologia molecular, paleogenética, paleoepidemiologia, paleobacteriologia, paleovirologia e paleoimunologia estão surgindo e, apesar de recentes, mostram-se extremamente promissores.

ABSTRACT

Paleoparasitology: bibliographic review and new perspectives for microbiologic studies

The purpose of this study was to make a critical review about Paleoparasitology. Also, future perspectives for the development of new researches in Paleoparasitology were suggested given the recent availability of important techniques, like Immunology and Molecular Biology. By an historical perspective of the methods, this study comments about research designs in Paleoparasitology. Given that Paleoparasitology analyzes archaeological material in association with infectious diseases in ancient peoples, the authors believe that new techniques available nowadays should be taken in consideration in order to contribute to better understand the health-environment-disease process in the past.

KEYWORDS: Paleoparasitology. Paleopathology Coprolites. Mummy. Diseases evolution.

REFERÊNCIAS

1. Allison MJ, Bergman T, Gerszten E. Further studies on faecal parasites in antiquity. *Am J Clin Pathol* 113: 605-609, 1999.
2. Andrews P, Fernandez-Jalvo Y. 101 uses for fossilized faeces. *Nature* 393: 629-630, 1998.
3. Araújo AJG, 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.
4. Araújo AJG, Ferreira LF. Paleoparasitology and the Antiquity of Human Host-parasite Relationships. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 89-93, 2000.
5. Araújo AJG, Reinhard KJ, Ferreira LF. The role of mummy studies in paleoparasitology. *Chungara (Arica)* 32: 111-115, 2000.
6. Araújo AJG, Jansen AM, Bouchet F, Reinhard K, Ferreira LF. Parasitism, the Diversity of Life, and Paleoparasitology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 5-11, 2003.
7. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Lorentz W, Fornacieri G, Allison M. A 9000-year Record of Chagas disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 2034-2039, 2004.
8. Aufderheide AC, Rodriguez-Martin C. *The Cambridge Encyclopedia of Human Paleopathology*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998. p. 263-264.
9. Basler CF, Reid AH, Dybing JK, Janczewski TA, Fanning TG, Zheng H, Salvatore M, Perdue M.L, Swayne DE, Garcia-Sastre A, Palese P, Taubenberger JK. Sequence of the 1918 pandemic influenza virus nonstructural gene (NS) segment and characterization of recombinant viruses bearing the 1918 NS genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2746-2751, 2001.
10. Bouchet F, Guidon N, Dittmar K, Harter S, Ferreira LF, Chaves SAM, Reinhard K, Araújo AJG. Parasite remains in Archaeological Sites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl.1): 47-52, 2003a.
11. Bouchet F, Harter S, Le Bailly M. The State of the Art of Paleoparasitological Research in the Old World. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(suppl. 1): 95-101, 2003b.
12. Bremermann HJ. Parasites at the origin of life. *J Math Biol* 16: 165-180, 1983.
13. Brown TA, Brown KA. Ancient DNA: using molecular biology to explore the past. *BioEssays* 16: 719-726, 1994.
14. Callen EO, Cameron TWM. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Sci* 8: 35-40, 1960.
15. Cano RJ, Tiefenbrunner F, Ubaldi M, Delcueto C, Luciani S, Cox T, Orkand P, Kunzel KH, Rollo F. Sequence analysis of bacterial DNA in the colon and stomach of the Tyrolean Iceman. *Am J Phys Anthropol* 112: 297-309, 2000.
16. Castro AA, Guidugli F. Projeto de Pesquisa de uma Revisão Sistemática, cap 15:1-8 In: Castro AA, editor. Planejamento da pesquisa clínica. São Paulo, Disponível em: <http://www.evidencias.com>, 2001.
17. Cavalier-Smith T. Obcells as proto-organisms: membrane heredity, lithophosphorylation, and the origins of the genetic code, the first cells, and photosynthesis. *J Mol Evol* 53: 555-595, 2001.
18. Cerutti N, Salomone A, Santovito A, Rabino Massa E. La "Morte Nera" nel Medioevo: aspetti eziologici, dibattiti e nuove proposte d'indagine molecolare. Disponível em: <http://www.adquintum.info/convegni/nera.html>, 2004.
19. Chame M, Ferreira LF, Araújo AJG, Confalonieri U. Experimental paleoparasitology: an approach to the diagnosis of animal coprolites. *Paleopath News* 76: 7-9, 1991.
20. Chame M. Terrestrial mammal faeces: a morphometric summary and description. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl 1): 71-94, 2003.
21. Chaves SAM, Reinhard KJ. Paleopharmacology and pollen: Method and application. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl. 1): 207-211, 2003.
22. Collins M. Estimating limits to survival of DNA and proteins. School of Social Science – The University of Queensland, Brisbane, Australia. Disponível em: <http://www.ansoc.uq.edu.au/index.html?page=19072epid=19072>, 2004.
23. Combes C. Paleoparasitology. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl 1): 1-2, 2003.

24. Confalonieri U, Ferreira LF, Araújo AJG, Ribeiro BM. The use of a statistical test for the identification of helminth eggs in coprolites. *Paleopath News* 62: 7-8, 1988.
25. Cooper A, Poinar HN. Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289: 1139, 2000.
26. Costa LMC. Leishmaniose tegumentar americana: uso de técnicas da biologia molecular no diagnóstico de infecção de roedores de coleção do Museu Nacional - UFRJ. [Mestrado] Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 1998. 70 p.
27. David AR. Disease in Egyptian mummies: the contribution of new technologies. *Lancet* 349: 1760-1763, 1997.
28. Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt LC, Lev-Maor G, Bra-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG, Zink AR. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet* 4: 584-592, 2004.
29. Drancourt M, Aboudharam G, Signoli M, Dutour O, Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: An approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc Natl Acad Sci* 95: 12637-12640, 1998.
30. Drancourt M, Raoult D. Palaeomicrobiology: Current issues and perspectives. *Nat Rev Microbiol* 3: 23-35, 2005.
31. Duarte NA, Ferreira LF, Araújo AJG. Paleoepidemiologia e Paleoparasitologia. In: Medronho RA. *Epidemiologia*. São Paulo, Editora Atheneu. 2002. p. 457-463.
32. Dube S, Spicer T, Bryz-Gornia V, Jopnes B, Dean T, Love J, Esteban N, Harrington Jr. W, Glaser J. A rapid and sensitive method of identification of HTLV-II subtypes. *J Med Virol* 45: 1-9, 1995.
33. Faulkner C.T, Sharon P, Johnson SS. prehistoric parasitism in Tennessee: evidence from the analysis of desiccated faecal material collected from Big Bone cave, Van Buren, Tennessee. *J Parasitol* 75: 461-463, 1989.
34. Ferreira LF, Araújo AJG, Confalonieri U. *Paleoparasitologia no Brasil*. PEC/ENSP, Rio de Janeiro, 1988. 158p.
35. Ferreira LF, Araújo AJG, Duarte, AN. Nematode larvae in fossilized animal coprolites from lower and middle Pleistocene sites, Central Italy. *J Parasitol* 79: 440-442, 1993.
36. Fornaciari G, Marchetti A. Intact smallpox virus particles in an Italian mummy of the Sixteenth century. *Lancet* 2: 625, 1986.
37. Fornaciari G, Castagna M, Viacava P, Tognetti A, Bevilacqua G, Segura E. Chagas' disease in a Peruvian Inca mummy. *Lancet* 339: 128-129, 1992.
38. Fornaciari G, Zavaglia K, Giusti L, Vultaggio C, Ciranni R. Human papillomavirus in a 16th century mummy. *Lancet* 362: 1160, 2003.
39. Fricker EJ, Spigelman M, Fricker CR. The detection of *Escherichia coli* DNA in the ancient remains of Lindow Man using the polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol* 24: 351-354, 1997.
40. Fry GF. Analysis of prehistoric coprolites of Utah. *Anthropological papers* 97: 1-45, 1977.
41. Galtier N, Tourasse N, Gouny M. A nonhyperthermophilic common ancestor to extant life forms. *Science* 283: 220-221, 1999.
42. Gonçalves MLC. Helminths, protozoários e algumas idéias: novas perspectivas na paleoparasitologia. Tese de doutorado. Rio de Janeiro, Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz. 2002. 89p.
43. Gonçalves MLC, Araújo AJG, Ferreira LF. Paleoparasitologia no Brasil. *Ciênc. saúde coletiva* 7: 191-196, 2002a.
44. Gonçalves MLC, Araújo AJG, Duarte R, Silva JP, Reinhard K, Bouchet F, Ferreira LF. Detection of *Giardia duodenalis* antigen in coprolites using a commercially available enzyme immunoassay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 640-643, 2002b.
45. Gonçalves MLC, Araújo AJG, Ferreira LF. Human intestinal parasites in the past: new findings and review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl 1): 103-118, 2003.
46. Gonçalves MLC, Silva VL, Andrade CM, Reinhard K, Rocha GC, Bailly ML, Bouchet F, Ferreira LF, Araújo AJG. Amoebiasis distribution in the past: first steps using an immunoassay technique. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98: 88-91, 2004.
47. Guerra RMC, Gazeta GS, Amorim M, Duarte AN, Serra-Freire NM. Ecological analysis of acari recovered from coprolites from archaeological site of northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl.1): 181-190, 2003.

48. Guhl F, Jaramillo C, Chiriboga M, Cárdenas-Arroyo F. Aislamiento y purificación de anticuerpos a partir de cuerpos momificados. *Bioantropología* 2: 6-7, 1992.
49. Guhl F, Jaramillo C, Yockteng R, Vallejo GA, Cárdenas-Arroyo F. *Trypanosoma cruzi* DNA in Human mummies. *Lancet* 349: 1370, 1997.
50. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Yockteng R, Cárdenas-Arroyo F, Fornaciari G, Arriaza B, Aufderheide A. Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4000-year-old mummified human tissue from northern Chile. *Amer J Phys Anthropol* 108: 401-407, 1999.
51. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo GA, Cárdenas-Arroyo F, Aufderheide A. Chagas disease and human migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 553-555, 2000.
52. Herrmann, B., Hummel, S. Introduction. In: 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. p. 1-12.
53. Iñiguez AM, *Análise do DNA Ancestral para o estudo de Infecções Parasitárias em populações pré-Históricas*. Rio de Janeiro [Dissertação de Mestrado: Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ]. 1998.
54. Iñiguez AM, Araújo AJG, Ferreira LF, Vicente ACP. Analysis of ancient DNA from coprolites: a perspective with random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction approach. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I): 63-65, 2003a.
55. Iñiguez AM, Reinhard KJ, Araújo AJG, Ferreira LF, Vicente ACP. *Enterobius vermicularis*: Ancient DNA from North and South American Human Coprolites. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I): 67-69, 2003b.
56. Jones AKG. A coprolite from 6-8 pavement. In: Hall AR, Kenward HK, Williams D, Greig JRA. *Environment and living conditions at two Anglo-Scandinavian sites*. University of York, York. 1983. p. 225-229.
57. Larsen CS. Bioarchaeology: The Lives and Lifestyles of Past People. *J Archaeol Res* 10: 119-166, 2002.
58. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715, 1993.
59. Lindahl T. Facts and Artefacts of ancient DNA. *Cell* 90: 1-3, 1997.
60. Lowenstein JM. Species-specific proteins in fossils. *Naturwissenschaften* 67: 343-346, 1980.
61. Lowenstein JM. Immunological reactions from fossil material. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 292: 143-149, 1981.
62. Lowenstein JM. Radioimmune assay of mammoth tissue. *Acta Zool* 170: 233-235, 1985.
63. Lowenstein JM. Immunological methods for determining phylogenetic relationships. In: Broadhead, T.W. (ed.), *Molecular evolution and the fossil record: Short Courses in Paleontology* vol 1. Paleontological Society, 1988. p. 12-19
64. Lowenstein JM, Scheuenstuhl G. Immunological methods in molecular paleontology. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 333: 375-380, 1991.
65. Matsui A, Kanehara M, Kanehara M. Palaeoparasitology in Japan – Discovery of toilet features. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl. I): 127-136, 2003.
66. Mendonça de Souza SMF, Araújo AJG, Ferreira LF. Saúde e doença em grupos indígenas pré-históricos do Brasil: paleopatologia e paleoparasitologia. In: *Saúde e Povos Indígenas* (R.V. Santos e C.E.A. Coimbra Jr., org), Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1994. p. 21-42.
67. Mendonça de Souza SMF, De Carvalho DM, Lessa A. Paleoepidemiology: is there a case to answer? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl. I): 21-27, 2003.
68. Miller RL, Ikram S, Armelagos GL, Walker R, Harer WB, Schiff CJ, Bagett D, Carrigan M, Maret SM. Diagnosis of *Plasmodium falciparum* infections in mummies using the rapid, manual ParaSight-F test. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 88: 31-32, 1994.
69. Mullis KB, Fallona FA. Specific synthesis of DNA in vitro through polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350, 1987.
70. Nasmith K. Evolution of the cell cycle. *Phil Trans R Soc Lond* 349: 271-281, 1995.
71. Nickle DC, Learn GH, Rain MW, Mullins JI, Mittler JE. Curiously Modern DNA for a “250 Million-Year-Old” Bacterium. *J Mol Evol* 54: 134-137, 2002.
72. Nogueira JMR, Palhano Silva CS, Gonçalves MLC, Araújo A. The importance of ethical aspects in Paleoparasitological research. *Paleopathology Newsletter* 131 (suppl): 29, 2005a.

73. Nogueira JMR, Palhano Silva CS. Implicações éticas na Paleoparasitologia. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (suppl 1): 250, 2005b.
74. Nozais JP. The origin and dispersion of human parasitic disease in the Old World (Africa, Europe and Madagascar) *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (suppl. 1): 13-19, 2003.
75. Orgel LE. The origin of life - a review of facts and speculations *TIBS* 23: 491-495, 1998.
76. Pääbo S, Gifford JA, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences from 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res* 16: 9775-9787, 1988a.
77. Pääbo S, Wilson AC. Polymerase Chain Reaction reveals cloning artefacts. *Nature* 334: 387-388, 1988b.
78. Pääbo S, Higuchi RG, Wilson AC. Ancient DNA and the polymerase Chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J Biol Chem* 246: 9709-9712, 1989a.
79. Pääbo S. Ancient DNA extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1939-1943, 1989b.
80. Pääbo S. Amplifying ancient DNA. In: Innis, J. ed. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego, Academic Press, 1990. p. 159-166.
81. Pääbo S. Amplifying DNA from archaeological remains: a meeting report. *PCR Methods Appl* 1: 107-110, 1991.
82. Palhano Silva CS, Nogueira JMR. Novas possibilidades em estudos paleoparasitológicos. *Rev Soc Bras Med Trop* 38 (supl): 253, 2005.
83. 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.
84. Poinar HN, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed PR, Possnert G, Pääbo S. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science* 281: 402-406, 1998.
85. Poulin R, Morand S. The diversity of parasites. *Q Rev Biol* 75: 277-293, 2000.
86. Powlledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ* 28: 44-50, 2004.
87. Prat JG, Mendonça de Souza SMF. Prehistoric Tuberculosis in America: Adding Comments to a literature Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 (Suppl 1): 151-159, 2003.
88. Rafi A, Spigelman M, Stanford J, Lemma E, Donoghue H, Zias J. *Mycobacterium leprae* DNA from ancient bone detected by PCR. *Lancet* 343: 1360-1361, 1994.
89. Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. The 1918 Spanish Influenza: Integrating history and biology. *Microbes Infect* 3: 81-87, 2001.
90. Reinhard KJ. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82: 145-163, 1990.
91. Reinhard KJ. Mummy studies and archeoparasitology. In: Cockburn A, Cockburn E, Reyman TA (eds), *Mummies Disease and Ancient Cultures*, Cambridge University Press, Cambridge, 1998. p 377-380.
92. Reinhard KJ, Confalonieri U, Ferreira LF, Herrmann B, Araújo AJG. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo* 37: 217-239, 1988.
93. Rollo F, Marota I. How microbial ancient DNA, found in association with human remains, can be interpreted. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354: 111-119, 1999.
94. Rollo F, Ubaldi M, Ermini L, Marota I. Ötzi's last meals: DNA analysis of the intestinal content of the neolithic glacier mummy from the Alps. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12594-12599, 2002.
95. Ruffer MA. *Studies in paleopathology of Egypt*. R Moodie, Ed. University of Chicago Press, Nova York- Chicago, 1921.
96. Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2091-2094, 1994.
97. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning – a Laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.
98. Santos AKCR. *Diversidade de linhagens de DNA mitocondrial de Ameríndios da Amazônia: populações contemporâneas e ancestrais*. Tese de Doutorado, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996.
99. Schaechter, M.; Engleberg, N.C.; Eisenstein, B.I.; Medoff, G. *Microbiologia, Mecanismo das doenças infecciosas*. 3ed. Guanabara Koogan, 2002.

100. Sianto L, Fernandes A, Lobo RL, Ferreira LF, Gonçalves MLC, Araújo AJG. Paleoparasitologia – uma nova ciência para interpretar o passado. Ciência – Arqueologia e Sítios arqueológicos. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/arqueologia/arq14.shtml>, 2003.
101. Spigelman M, Lemma E. The use of Polymerase Chain Reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in ancient skeletons. *Int J Osteoarchaeology* 3: 137-143, 1993.
102. Szidat L. Über die Erhaltungsfähigkeit von Helmintheneiern in Vor- und frühgeschichtlichen Moorleichen. *Zeitsch Parasiten* 13: 265-274, 1944.
103. Taylor EL. Parasitic helminths in mediaeval remains. *Vet Rec* 67: 216-218, 1955.
104. Taylor GM, Rutland P, Molleson T. A sensitive polymerase chain reaction method for the detection of *Plasmodium* species DNA in ancient human remains. *Ancient Biomolecules* 1: 193-203, 1997.
105. Ubaldi M, Luciani S, Marota I, Fornaciari G, Cano RJ, Rollo F. Sequence Analysis of Bacterial DNA in the Colon of an Andean Mummy. *Am J Phys Anthropol* 107: 285–295, 1998.
106. Voller A, Bidwell DE, Bartlett ANN. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull World Health Organ* 53: 55-65, 1976.
107. Vray B. Relationships of molecular biology with paleoparasitology. *Vesalius* 8: 45-52, 2002.
108. Vreeland RH, Rosenzweig WD. The question of uniqueness of ancient bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28: 32-41, 2002.
109. Waggoner BM. Molecular Palaeontology. In: *Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing group, London* 12: 227-232, 2002.
110. Wilke PJ, Hall HJ. *Analysis of ancient feces: a discussion and annotated bibliography*. University of California, Archaeological Research Facility, Department of Anthropology, Berkeley. 1975.
111. Willcox AW. Mummies and Molecules: Molecular Biology Meets Paleopathology. *Elsevier USA* 24: 57-60, 2002.
112. Willerslev E, Hansen AJ, Rønn R, Brand TB, Barnes I, Wiuf C, Gilichinsky D, Mitchell D, Cooper A. Long-term persistence of bacterial DNA. *Curr Biol* 14: R9-R10, 2004.
113. WHO, Water Sanitation and Health: Water Related Diseases. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/diarrhoea/en/, 2000.
114. Zink A, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. Molecular evidence of bacteremia by gastrointestinal pathogenic bacteria in an infant mummy from ancient Egypt. *Arch Pathol Lab Med* 124: 1614-1618, 2000.