



PROTOCOLO

Manual resumido para recolha de amostras para estudos paleoparasitológicos e de paleodieta

Luciana Sianto^{a,b*}, Ana Luísa Santos^a

^aCIAS – Centro de Investigação em Antropologia e Saúde, Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Apartado 3046, P- 3001 401 Coimbra, Portugal.

^bEscola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Cep: 21041-210 RJ, Brasil.

*Corresponding author: lucianasianto@gmail.com

RESUMO

A Paleoparasitologia pesquisa evidências de endo e ectoparasitas que auxiliam na identificação de patologias e migrações. O sucesso destas análises é influenciado pela forma como são recolhidos os vestígios, pelo que este manual tem como objetivo orientar a recolha de amostras para estudos de parasitas e de vestígios alimentares em materiais antigos. Tem como público-alvo antropólogos, arqueólogos, paleontólogos e demais profissionais que realizam escavações e/ou gerem coleções museológicas. Fornece informações sobre a recolha de coprólitos e sedimentos em enterramentos humanos e de outros animais, em estruturas para despejo de dejetos e esqueletos depositados em coleções. Orienta o investigador para evitar contaminação e como armazenar corretamente as amostras. A estreita colaboração entre os procedimentos de amostragem e o estudo laboratorial permitirá ampliar o conhecimento sobre as condições de vida no passado.

Palavras-chave: Paleoparasitologia; Paleopatologia; doenças infecciosas; Península Ibérica; migrações humanas; Arqueologia.

ABSTRACT

Paleoparasitology is a discipline that search for endo and ectoparasites helping in the identification of disease and migration. The success of these analyses is influenced by the quality of the samples. Thus, this manual aims to guide anthropologists, archaeologists, paleontologists and other professionals involved in excavations and / or curators of museum collections to collect samples for studies of parasites and food remains in old materials. This text provides the guidelines to collect coprolites and sediments from human burials, fauna, structures used to dump waste and skeletal collections, and how to avoid contamination and to store samples. The close collaboration between sampling procedures and laboratory study will have as consequence better information to help in the reconstruction of past living conditions.

Keywords: Paleoparasitology; Palaeopathology; infectious diseases; Iberian Peninsula; human migration, Archaeology.

RESUMEN

La Paleoparasitología, es la disciplina que se encarga de estudiar las evidencias dejadas por endo y ectoparásitos, para ayudar en la identificación de enfermedades y migraciones. El éxito de estos análisis se ve influenciado por la forma en que estos vestigios son recogidos, pretendiendo con este manual dirigir la recogida de muestras para estudios parasíticos y de restos alimenticios en material antiguo. Tiene como meta orientar a antropólogos, arqueólogos, paleontólogos, y otros profesionales que realicen excavaciones o generen colecciones museológicas. Proporciona información sobre la recogida de coprolitos y sedimentos en enterramientos humanos y animales, en estructuras de descarga de desechos, y en esqueletos depositados en colecciones. Guía al investigador para evitar la contaminación, y cómo almacenar correctamente las muestras. La estrecha colaboración entre los procedimientos de muestreo y el estudio de laboratorio, ampliará el conocimiento sobre las condiciones de vida en el pasado.

Palabras clave: Paleoparasitología; Paleopatología; enfermedades infecciosas; Península Ibérica; migraciones humanas; Arqueología.

Introdução

A Paleoparasitologia tem origem na Paleopatologia e pode ser definida como a

disciplina que procura e analisa parasitas em material arqueológico e paleontológico. Pelo estudo de parasitas internos, especialmente

os intestinais e ectoparasitas, é possível identificar a que infeções as populações se encontravam expostas ao longo da evolução ([Araújo et al., 2003](#)). Pelo estudo de coprólitos e sedimentos associados a esqueletos e a estruturas utilizadas para despejo de dejetos como redes de esgoto, latrinas ou bacias, é possível identificar helmintos e protozoários intestinais. Para além de endoparasitos, piolhos e carraças podem ser observados em cabelos e pele conservada de diversos animais incluindo de seres humanos ([Araújo et al., 2011](#)).

Os estudos desenvolvidos, especialmente nos últimos 35 anos, ampliaram o conhecimento sobre as relações parasita-hospedeiro nos diversos ambientes inclusive no entendimento da origem das zoonoses e outras doenças ([Sianto et al., 2009](#); [Faulkner e Reinhard, 2014](#)). Ajudaram também a revelar hábitos alimentares e culturais desconhecidos além de contribuir com teorias de migração humana, nomeadamente de rotas marítimas ([Sianto et al., 2012b](#); [Reinhard et al., 2013](#)).

Apesar de existirem estudos paleoparasitológicos na Europa, os dados relativos à Península Ibérica são escassos. No sentido de aprofundar este tipo de investigação recentemente foi preparado um laboratório no Centro de Investigação em Antropologia e Saúde (CIAS), localizado no Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra. Com o objetivo de divulgar a possibilidade de se realizarem estas análises e de facultar indicações para uma recolha mais eficiente de amostras foi elaborado este manual.

Recolha de Amostra

Durante a escavação de enterramentos humanos e de outros animais

Pesquisar quais os parasitas que infetavam um individuo ou grupo de individuos pode ser realizado de maneira simples pela recolha de sedimentos em esqueletos. Para avaliar parasitas intestinais deve-se recolher sedimento associado à cavidade pélvica do esqueleto, levando sempre em consideração a posição de inumação. Isto é importante pois a deposição de parasitas no sedimento associado ao esqueleto segue o sentido provável de deposição das vísceras durante os processos taxonómicos. Assim, por exemplo num individuo inumado em decúbito lateral deve-se considerar o sentido de deposição provável das vísceras e parasitas nos ossos pélvicos e no solo local (Figura 1, ponto 1). Se o esqueleto está posicionado em decúbito dorsal tende a acumular os restos parasitários na parte posterior da pélvis e *foramina* do sacro (Figura 1, pontos 2 e 3).

Seja qual for o caso, é importante recolher também duas amostras para controlo negativo (Figura 1, pontos 4 e 5) para atestar que os achados de parasitas intestinais não são resultado de contaminação do solo onde o enterramento foi realizado. Estas amostras podem ser recolhidas em outros pontos próximos ao esqueleto caso os assinalados não estejam disponíveis.

Já que várias amostras podem dar resultado negativo para parasitas, é interessante recolher o máximo de amostras possível num conjunto de esqueletos. Quanto maior o número de amostras, maior a hipótese de serem realizados estudos mais abrangentes ao nível populacional. Contudo se isso não for possível, devem ser recolhidos

preferencialmente um conjunto de amostras de indivíduos de diferentes faixas etárias

(infante [0-3 anos], criança [3-12 anos]), adolescente e adulto (masculino e feminino).

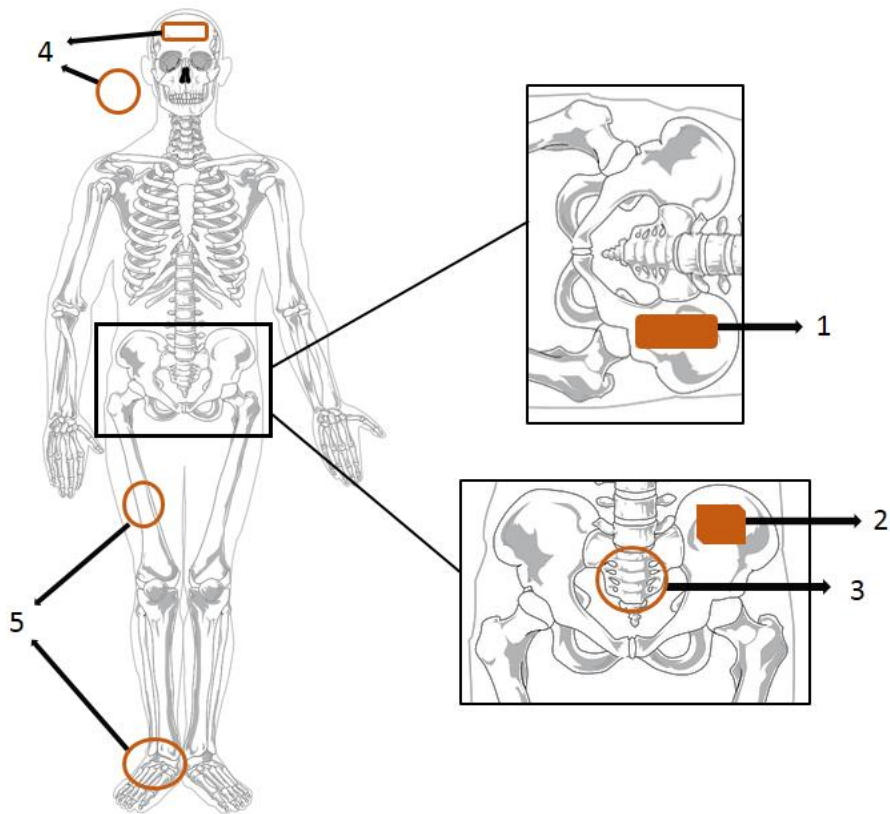


Figura 1 - Pontos de recolha de amostras em sepultamentos e esqueletos: 1) Região da pélvis; 2) Superfície do ílio; 3) Sacro e interior dos *foramina* sacrais; 4) Amostra de controlo com solo recolhido junto ao crânio; 5) Solo retirado junto ao membro inferior. Imagem retirada de Pixabay.com e adaptada com base em Sianto et al. (2013).

Nos enterramentos de fauna utiliza-se a mesma lógica adotada nas inumações de humanos. Estudar os parasitas que infetavam animais que conviviam ou não com populações humanas ajuda a revelar parasitos desconhecidos (Araújo et al., 1989; Sianto et al., 2012a) e a identificar quais parasitos foram adquiridos da fauna ou

transmitidos durante o processo evolutivo (Leles et al., 2012). Registos para períodos anteriores ao surgimento da espécie humana também podem ser feitos como no caso dos estudos de parasitas em coprólitos de animais extintos (Dentzien-Dias et al., 2013; Hugot et al., 2014).

Esqueletos anteriormente escavados

As coletas em esqueletos podem ser realizadas mesmo quando estes já se encontram depositados em coleções, nomeadamente recolhendo os sedimentos aderentes aos ossos pélvicos e no interior dos *foramina* do sacro. Nestes casos é importante a recolha de amostras de controlo negativo do próprio esqueleto ou, quando estas não estiverem disponíveis, do solo do sítio arqueológico.

Em estruturas e vasilhames (latrinas e outros sistemas de despejo de dejetos, potes, cerâmicas, etc.)

Estruturas e vasilhames podem ter vestígios de alimentação e parasitas de humanos e de outros animais ([Harter et al., 2003](#); [Bayman et al., 1996](#)). No caso de latrinas, cloacas romanas e outras estruturas com dejetos, a recolha de amostras deve ser feita em camadas levando-se em consideração a estratigrafia do sistema em questão. Assim, em algumas situações, várias amostras são recolhidas da mesma estrutura e podem revelar diferenças nos perfis parasitológicos e alimentares ao longo do tempo.

Em situações específicas, como por exemplo nos processos de mumificação e/ou embalsamento de corpos, as vísceras eram guardadas em potes ([Aufderheide, 2003](#)). Nestes casos, mesmo que aparentemente não contenham vestígios visíveis de tecidos e de outros restos orgânicos, deve-se recolher o sedimento acumulado no fundo. A mesma lógica aplica-se a outros vasilhames que possam ter contido restos de alimentos ou

tecidos intestinais depositados. Por vezes é necessário remover vestígios muito finos com soluções ácidas especialmente preparadas e nestes casos é aconselhável entrar em contacto com a equipe de análise antes de efetuar a recolha do material.

Os controlos negativos associados a estruturas e vasilhames dependem do tipo de sítio e de escavação. Como regra deve-se recolher amostras não associadas ao material das estruturas e vasilhas mas de um contexto parecido, ou seja, mesma camada ou datação.

Coprólitos

Os coprólitos fornecem informação direta sobre alimentação e parasitas. Podem ser recuperados diretamente do interior de corpos preservados ou livres no solo em escavações. Nestas circunstâncias devem ser fotografados *in situ*, retirados inteiros e com o máximo de cuidado para não comprometer a morfologia e morfometria originais que vão auxiliar na identificação da sua origem zoológica ([Chame e Sianto, 2011](#)).

Todos os coprólitos devem ser recolhidos e embalados separadamente, a menos que sejam encontrados em grupos e neste caso podem ser acondicionados juntos. É importante detalhar as condições em que os coprólitos foram encontrados e se estavam associados a outras estruturas ou materiais. Controlos negativos não são necessários para cada coprólito mas é recomendável a recolha de uma amostra de controlo da superfície do sítio, uma do ponto mais fundo da escavação

e outra num ponto intermediário, caso alguma dúvida surja durante as análises.

Instruções Gerais

Identificação

As amostras devem ser acompanhadas das seguintes informações: acrónimo do local de escavação, data da coleta, identificação do indivíduo. Ao conjunto de amostras de um mesmo local deverão ser indicadas as coordenadas GPS do sítio arqueológico, o tipo de estrutura funerária, a cronologia (e o método de obtenção relativa ou absoluta). Efetuar fotos das regiões anatómicas antes de retirar as amostras.

Quantidade da amostra a ser recolhida

É importante que se colete em média 50 ml de sedimento, tanto para análise de parasitas quanto para cada controlo negativo. É possível contudo, realizar análises em quantidades menores de material. Deve-se utilizar luvas sem pó para coletar as amostras (o pó das luvas interfere nas análises de vestígios alimentares). Utilizar materiais descartáveis em cada amostra: palitos e colheres de plástico ou similares.

Armazenamento das amostras

As amostras podem ser acondicionadas em sacos plásticos ou outro tipo de recipiente individual. Para remessa de coprólitos é recomendável envolver os sacos em plástico com bolhas de ar ou similar para preservar a

forma dos mesmos até a chegada ao laboratório. Não se deve colocar papel, algodão ou qualquer outro tipo de material junto com a amostra para não prejudicar a análise em laboratório. A identificação das amostras deve ser individual e acompanhada de informações que ajudem da interpretação dos resultados tais como número do esqueleto ou enterramento, ponto de recolha, materiais visíveis associados, perturbações observadas, etc. No caso de amostras húmidas é importante refrigerar as mesmas até a chegada ao laboratório para evitar a proliferação de fungos que prejudicam as análises paleoparasitológicas. Outra opção é adicionar um líquido conservante à amostra como álcool 70% ou solução de formol a 10%. Nestes casos a amostra deve conter informação sobre o conservante usado.

Estudos de ADN antigo (aADN)

É possível a realização de estudos moleculares em amostras antigas para detetar fragmentos de ADN parasitário, por exemplo. Estes estudos geralmente requerem maior cuidado na recolha e armazenamento das amostras além de restrições quanto ao uso de líquidos de conservação. De modo geral, as recolhas requerem o dobro de cuidado com contaminação e uso de materiais descartáveis completos tais como luvas, bata, touca, máscara e outros, dependendo do objetivo do estudo. As amostras devem ser armazenadas em potes estéreis e mantidas refrigeradas desde a retirada em campo até chegar ao laboratório que realizará as

análises. Para além disto, cada laboratório pode ter protocolos específicos para o recebimento e processamento das amostras, o que requer contato prévio para maiores esclarecimentos ([Iñiguez, 2011](#)).

Considerações Finais

Os estudos parasitários demandam tempo para que sejam proveitosos. O tempo médio para análise de cada amostra é de 120 horas, do processamento ao resultado, com variações dependendo do tipo de amostra e resultados. Nem todas as amostras analisadas revelam parasitas ou vestígios alimentares que auxiliem na interpretação de doenças do passado. No entanto, bons resultados têm sido obtidos nos últimos anos e a colaboração dos investigadores na partilha de amostra de vários locais e cronologias levará à intensificação destes estudos com repercussões no conhecimento da saúde e da doença e da alimentação no passado.

Agradecimentos

Ao CIAS (Centro de Investigação em Antropologia e Saúde), Fundos Nacionais PEst-OE/SADG/UI0283/2013 da FCT, CNPq processo 201416/2014-0, e ao Alvaro Monge.

Bibliografia

Araújo, A.; Reinhard, K.; Leles, D.; Sianto, L.; Iñiguez, A.; Fugassa, M.; Arriaza, B. T.; Orellana, N. C.; Ferreira, L. F. 2011. Paleoepidemiology of intestinal parasites and lice in pre-Colombian South America. *Chungara, Revista de Antropologia Chilena*, 43: 303-313.

Araújo, A. J. G.; Ferreira, L. F.; Confalonieri, U. E. C.; Chame, M.; Ribeiro-Filho, B. M. 1989. *Strongyloides ferreirai* Rodrigues, Vicente & Gomes, 1985 (Nematoda, Rhabdiasoidea) in rodent coprolites (8.000-2.000 years BP), from archaeological sites from Piauí, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84 (4): 493-496.

Araújo, A. J. G.; Jansen, A. M.; Bouchet, F.; Reinhard, K.; Ferreira, L. F. 2003. Parasitism, the diversity of life, and paleoparasitology. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl.1): 5-11.

Aufderheide, A. C. 2003. *The scientific study of mummies*. Cambridge, Cambridge University Press.

Bayman, J.; Hevly, R.; Johnson, B.; Reinhard, K. J.; Ryan, R. 1996. Analytical perspectives on a protohistoric cache of ceramic jars from the Lower Colorado Desert. *Journal of California and Great Basin Anthropology*, 18 (1): 131-154.

Chame, M.; Sianto, L. 2011. Diagnóstico de coprólitos, ou quem fez o coprólito? In: Ferreira, L. F.; Araújo, A.; Reinhard, K. J. (Eds.) *Fundamentos da paleoparasitologia*. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz: 263-281.

Dentzien-Dias, P. C.; Poinar Jr, G.; Figueiredo, A. E. Q. D.; Pacheco, A. C. L.; Horn, B. L. D.; Schultz, C. L. 2013. Tapeworm eggs in a 270 million-year-old shark coprolite. *Plos One*, 8 (1): 1-4.

Faulkner, C. T.; Reinhard, K. J. 2014. A retrospective examination of paleoparasitology and its establishment in The Journal of Parasitology. *The Journal of Parasitology*, 100 (3): 253-9.

Harter, S.; Le Bailly, M.; Janot, F.; Bouchet, F. 2003. First paleoparasitological study of an embalming rejects jar found in Saqqara, Egypt. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98 (Suppl 1): 119-21.

Hugot, J. P.; Gardner, S. L.; Borba, V.; Araujo, P.; Leles, D.; Stock Da-Rosa, A. A.; Dutra, J.; Ferreira, L. F.; Araujo, A. 2014. Discovery of a 240 million year old Nematode parasite egg in a Cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates. *Parasites & Vectors*, 7: 486.

Iñiguez, A. M. 2011. Paleoparasitologia molecular. In: Ferreira, L. F.; Araújo, A.; Reinhard, K. J. (Eds.) *Fundamentos da paleoparasitologia*. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz: 301-316.

Leles, D.; Gardner, S.; Reinhard, K.; Araujo, A. 2012. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? *Parasites & Vectors*, 5: 42.

Reinhard, K. J.; Ferreira, L. F.; Bouchet, F.; Sianto, L.; Dutra, J. M. F.; Iñiguez, A.; Leles, D.; Le Bailly, M.; Fugassa, M.; Pucu, E.; Araujo, A. 2013. Food, parasites, and epidemiological

transitions: a broad perspective. *International Journal of Paleopathology*, 3 (3): 150-157.

Sianto, L.; Chame, M.; Silva, C. S. P.; Gonçalves, M.; Reinhard, K.; Fugassa, M.; Araújo, A. J. G. 2009. Animal helminths in human archaeological remains: a review of zoonoses in the past. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 51 (3): 119-130.

Sianto, L.; Duarte, A. N.; Chame, M.; Magalhães, J.; Souza, M. V. D.; Ferreira, L. F.; Araújo, A. 2012a. *Trichuris* sp. from 1,040 +/- 50-year-old Cervidae coprolites from the

archaeological site Furna do Estrago, Pernambuco, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107: 273-274.

Sianto, L.; Lelles, D.; Teixeira-Santos, I.; Camacho, M.; Iñiguez, A. M.; Araujo, A. 2013. Coleta de amostras para exames paleoparasitológicos. In: Gaspar, M. D.; Souza, S. M. D. (Eds.) *Abordagens estratégicas em sambaquis*. Erechin, RS, Habilis: 251-265.

Sianto, L.; Teixeira-Santos, I.; Chame, M.; Chaves, S. M.; Souza, S. M.; Ferreira, L. F.; Reinhard, K.; Araujo, A. 2012b. Eating lizards: a millenary habit evidenced by paleoparasitology. *BMC Research Notes*, 5: 586.