

Las aplicaciones de la Paleoparasitología en la detección de parásitos humanos y animales

A propósito del yacimiento del Turuñuelo.

sanidad y producción animal

REGIDOR, L.¹; BRAVO-BARRIGA, D. ¹; MARTÍN-CUERVO, M.²; LIRA GARRIDO, J. ²; JIMÉNEZ, J. ²; REINA, D. ¹; FRONTERA, E. ¹

¹ Departamento de Sanidad Animal (Área de Parasitología), Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura

² Departamento de Medicina Animal (Área de Medicina y Cirugía Animal), Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura



Figura 5. Ejemplar de *Culex malariager* descubierto en ámbar en la República Dominicana de hace 15-20 millones de años (Fotografía de George Poinar, Jr., cortesía de Oregon State University).

1. Introducción

La Paleoparasitología es el estudio de los materiales arqueológicos y paleontológicos, ya sean sedimentos, tejidos momificados, huesos, coprolitos, etc., con el fin de estudiar y analizar tanto el origen como la evolución de los parásitos del pasado (Beltrame et al., 2011).

El origen de esta ciencia como un campo de conocimiento separado de la paleopatología, se inicia con el hallazgo de formas parasitarias en material arqueológico por parte de Sir Marc Armand Ruffer (1910), concretamente, la presencia de huevos de *Schistosoma haematobium* en el tejido renal de momias egipcias (Ferreira, 2014). Tras este trabajo pionero, otros autores siguieron esta línea, permitiendo el desarrollo de esta disciplina hasta la actualidad.

En cuanto a sus aplicaciones, el análisis paleoparasitológico permite evidenciar la presencia de huevos y larvas de helmintos, quistes de protozoos, y ectoparásitos (Fugassa y Guichón, 2005). También constituye el punto de partida para estudios de parásitos preservados en ámbar, tanto de vectores parasitarios como de los propios parásitos, así como para estudios en coprolitos de reptiles extintos (Ferreira, 2014). Todos estos datos, unidos a los estudios realizados por otras disciplinas, permiten reconstruir aspectos culturales, como los hábitos higiénicos, el uso de plantas medicinales, la alimentación, el uso del espacio, la asociación con otras especies, los grados de agregación en las poblaciones, la dispersión de las enfermedades, e

incluso, las relaciones de simbiosis entre parásitos y hospedadores (Fugassa y Guichón, 2005).

2. Técnicas disponibles para detección de parásitos en muestras arqueológicas antiguas

2.1 Tipos de muestras

Antes de comenzar un análisis paleoparasitológico, se debe realizar la toma de muestras en los yacimientos arqueológicos o en otros lugares de estudio (como dependencias de museos o centros de investigación donde estén las muestras alojadas). Hay varias fuentes a emplear, pero las más comunes son restos momificados, coprolitos (Figura 1) y/o sedimentos.

Los **tejidos momificados** fueron las primeras muestras en las que se hallaron parásitos (Ruffer, 1910), y a pesar de que la mayor parte de los trabajos posteriores se realizaron sobre coprolitos, diversos estudios se han basado en los mencionados tejidos. De hecho, el hallazgo de formas adultas de *Ancylostoma duodenale* en una momia de Tiahuanaco de

alrededor del 900 d.C., es uno de los más conocidos en este tipo de muestras, ya que su buen estado de conservación permitió realizar secciones histológicas de los vermes antiguos que se alimentaban de la mucosa intestinal de la momia (Allison et al., 1974). Años más tarde, un grupo de científicos (Ferreira et al., 1983) fue el primero en emplear un rectosigmoidoscopio para obtener tejidos y sedimentos sin dañar de los restos momificados de un niño, los cuales databan del 3.490 ± 120 a 430 ± 70 BP (Before Present, antes del presente tomando como año de referencia 1950). Con esta técnica, pudieron observar helmintos intestinales como *Taenia solium* o *Echinococcus* sp., y musculares, como *Trichinella spiralis*, a los que se practicó posteriormente un examen histológico detallado. También se han encontrado restos fosilizados de posible presencia de quistes hidatídicos en tejidos (Figura 2) (Mowlavi et al. 2014).

Los **coprolitos** son nódulos fecales fosilizados que se forman por deshidratación o mineraliza-



Figura 1. Coprolito humano hallado en la Cueva Mammoth, Kentucky, USA. Autor: James St. John. Imagen bajo licencia Creative Commons "CC BY 2.0"

ción de la materia fecal (Fugasa, 2006). Cuando se analizan este tipo de muestras, en primer lugar, se realiza un examen y una descripción macroscópica del propio nódulo fecal. Es importante recoger muestras tanto del interior como de la superficie del coprolito, puesto que los huevos de los parásitos que se encuentren en la porción superior del colon o aquellos presentes en el alimento ingerido se distribuirán uniformemente por el mismo (Ye et al., 1997). Por su parte, las formas parasitarias de dispersión de los parásitos situados en la zona distal del tracto digestivo se colocarán en su mayoría en la superficie del coprolito (Fugassa, 2014).

El análisis paleoparasitológico de sedimentos en depósitos como letrinas, basureros, silos, etc., ha facilitado la comprensión de los hábitos higiénicos de los habitantes, así como del uso del espacio (Bouchet, 1995; Fugassa, 2014). Por su parte, los estudios realizados sobre sedimentos de la cavidad pélvica de esqueletos tanto humanos como animales, han revelado la presencia de huevos de parásitos y restos de comida, así como de coprolitos dentro de cuerpos momificados. Antes de tomar las muestras, se debe observar el sedimento a simple vista, ya que puede contener restos macroscópicos interesantes que también habrá que examinar; y es recomendable el uso de controles (muestras de las áreas adyacentes) que facilita la discusión sobre posibles fuentes de contaminación (Fugassa, 2014).

Otro tipo de muestras para analizar restos parasitarios antiguos son las **egagrópilas**, formaciones típicas, entre otras, de aves rapaces que primero se tragan la presa, y después regurgitan los restos no digeridos a través de sus picos,

incluyendo pelos, plumas, escamas y/o huesos. Al principio se empleaban como fuente de información para las reconstrucciones paleoambientales (Beltrame et al., 2011), pero posteriormente se ha demostrado que pueden servir como fuentes de restos parasitarios, así como aportar información sobre el estado parasitario de la presa (Beltrame et al., 2011).

Por último, otra fuente de muestras, si bien poco común, es el **ámbar**, una resina fosilizada producida por diversas especies vegetales que existieron en la antigüedad. Desde un punto de vista paleoparasitológico, el ámbar es un material muy interesante para la conservación e identificación de fósiles de animales, especialmente de pequeños artrópodos, que normalmente no se conservan bien en rocas sedimentarias, como son los vectores biológicos de parásitos (Brazil y Andrade, 2014). De hecho, se ha hallado un fósil miocénico de *Triatoma dominicana* (un tipo de insecto) en concreto la muda del quinto estado larvario de una ninfa, que al quedar atrapado en la resina liberó una gota de heces que contenía un tripanosomátido, concretamente *Trypanosoma antiquus* (Poinar, 2005a). Además, el autor sugirió que el hospedador de ambos parásitos podría ser un murciélago, ya que había pelos de este animal cerca del insecto. Del mismo modo, en otras muestras de ámbar se han observado mosquitos de la familia *Culicidae* en distintas partes del mundo (Harbach y Greenwalt, 2012).

2.2 Manejo y procesado de las muestras

Debido a las condiciones de conservación de este tipo de muestras paleoparasitológicas, estas

estudios realizados sobre sedimentos de la cavidad pélvica de esqueletos tanto humanos como animales, han revelado la presencia de huevos de parásitos y restos de comida, así como de coprolitos dentro de cuerpos momificados

deben ser tomadas y manipuladas en condiciones de asepsia, pues los estudios ópticos y moleculares de microfósiles encierran un riesgo de contaminación, tanto de fuentes actuales como antiguas. Las muestras deben ser medidas y fotografiadas y, además, se debe realizar una descripción exhaustiva de las mismas, detallando su color, su forma, su tamaño y la presencia o no de restos macroscópicos como pelos, quitinas de insectos, semillas, huesos, etc. (Fugassa y Guichón, 2005).

Rehidratación:

Los sedimentos orgánicos suelen estar agregados, por lo que en primer lugar se deben disgregar y desflocular con una solución detergente (Reinhard et al., 1986). Seguidamente, la muestra ha de rehidratarse con fosfato trisódico acuoso al 0,5%, durante 3-7 días, vigilando durante este tiempo que no haya proliferación de hongos y bacterias (Fugassa y Guichón, 2005; Jaeger et al., 2016). Una vez rehidratada, la muestra debe tamizarse para separar las partículas de más de 300 µm, que sirven para estudios de dieta y sedimentología, de aquellas que puedan contener restos de parásitos.

Enriquecimiento:

Como ya se ha mencionado, los estudios coproparasitológicos evidencian la presencia de parásitos (larvas, huevos y quistes) en los restos fecales. Entre las técnicas que se utilizan se encuentran la flotación y la sedimentación, que permiten concentrar los elementos del parásito en una pequeña fracción de materia fecal. A pesar de ser técnicas muy utilizadas en la actualidad, en contextos arqueológicos, a veces no es recomendable emplear ambas técnicas, puesto que supone un mayor consumo de sedimento, y solo podría sugerirse en situaciones puntuales, por ejemplo,



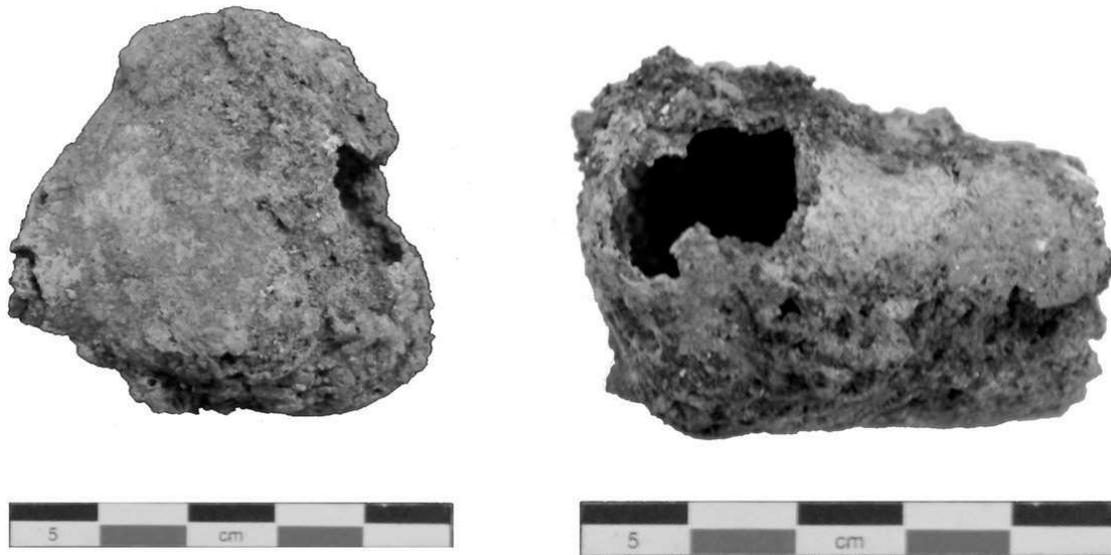


Figura 2. Restos de posibles quistes hidatídicos obtenidos en una tumba de un adolescente en la época romana tardía en Amiens, Francia. Imagen tomada de Mowlavi et al. 2014.

con resultados negativos y abundante cantidad de sedimentos (Fugassa, 2014).

Por otro lado, la **sedimentación** consiste en concentrar todos los posibles elementos parasitarios existentes en las heces por gravedad, para lo que será necesario emplear una solución acuosa menos densa que los huevos u otras formas parasitarias. Por el contrario, la técnica de flotación se basa en concentrar los restos parasitarios mediante su introducción en una solución más densa que los propios restos (Serrano et al., 2010). Para llevar a cabo esta técnica se utilizan diversas soluciones saturadas, en las que se introduce la materia fecal previamente rehidratada y tamizada en una pantalla o gasa, en el caso de estudios paleoparasitológicos.

2.3 Técnicas de detección

En los estudios paleoparasitológicos consultados en la bibliografía científica, la detección de parásitos en muestras arqueológicas antiguas se realiza fundamentalmente mediante el uso de diversas técnicas, como son: la detección directa mediante microscopía,

las técnicas serológicas y las técnicas moleculares.

2.3.1 Detección directa mediante microscopía

La paleoparasitología se originó empleando técnicas de microscopía óptica, y aunque actualmente existen muchas herramientas disponibles, la detección directa sigue siendo el método más usado para el examen paleoparasitológico y el estudio de microfósiles.

Una vez que se han sometido las muestras a procesos de concentración y enriquecimiento, hay que observar las muestras al microscopio. Si se ha empleado flotación, simplemente tomamos el cubreobjetos y lo colocamos sobre el portaobjetos; si en cambio se optó por la sedimentación, tomamos una alícuota del material sedimentado y se coloca junto a una gota de glicerina sobre un portaobjetos. Finalmente, estos preparados se observan al microscopio óptico con 100 aumentos y los cuerpos hallados se miden y fotografian (Fugassa y Guichón, 2005; Jaeger et al., 2016).

2.3.2. Detección de ADN antiguo de parásitos (Técnicas moleculares)

El término "ADN antiguo" (ADNa) es la denominación que recibe el ADN procedente de restos fósiles o subfósiles. Debido a esta procedencia, no se trata de ADN moderno, sino de ADN recuperado de organismos que han sufrido una historia particular desde que murieron, se enterraron y posteriormente fueron recuperados por excavadores. Durante el proceso de diagénesis (que recoge todos los cambios físicos, químicos y biológicos que puede sufrir el organismo desde su deposición inicial en el medio), el material genético asociado a este organismo sufrirá diversos fenómenos y grados de alteración (Hofreiter et al. 2001). Por eso, el "ADN antiguo" hace mención a un material genético degradado, químicamente modificado y donde su recuperación debe realizarse utilizando unos protocolos y unos laboratorios especialmente diseñados para la obtención de ADN antiguo. Desde el punto de vista paleoparasitológico, las técnicas moleculares permiten detectar secuencias específicas de ADN o ARN parasitario para proporcionar evidencias de su presencia en las muestras analizadas (Figueiredo, 2014). Este ADNa se puede obtener a partir de tejidos, huesos o dientes, siendo los coprolitos, igualmente, una fuente valiosa (Loreille et al., 2001).

En cuanto a la técnica, se realiza a partir de una alícuota de la muestra enriquecida (Jaeger et al., 2016), la cual se someterá a los pasos habitua-

les de la PCR: desnaturalización, reconocimiento y amplificación (Dittmar, 2014), por los cuales el parásito presente en la muestra se lisa, y su ácido nucleico es liberado y desnaturalizado. A continuación, se amplifica un segmento de ADN específico del taxón que estamos buscando. Para poder recuperar este ADN de interés mediante PCR, es necesario diseñar una pareja de cebadores (o primers) específicos que solamente reconozcan el material genético de ese taxón que estamos buscando. Estos cebadores deberán flanquear la región de ADN de interés y, una vez hibridados en sus posiciones correspondientes, el enzima polimerasa se encargará de sintetizar copias nuevas, todas idénticas, a la molécula de ADN de partida. De esta manera, se pueden sintetizar millones de copias de un segmento de ADN (Araújo et al., 2008).

La ventaja que presenta esta técnica es que permite rastrear enfermedades parasitarias a nivel molecular y que durante la identificación visual no se pueden detectar (Dittmar, 2014).

Además, durante los últimos 15 años esta disciplina ha sido protagonista de grandes avances acuñando el término de "Paleogenómica", la cual hace mención al estudio de los cambios en el ADN de los organismos a lo largo del tiempo. Este objetivo se consigue combinando el desarrollo de nuevos protocolos de extracción de ADN antiguo, las nuevas tecnologías de secuenciación masiva con sus novedosos diseños en la construcción de librerías genómicas optimizadas para ADN degradado y los nuevos métodos computacionales para el análisis del ADN recuperado de las muestras antiguas (Gansauge y Meyer

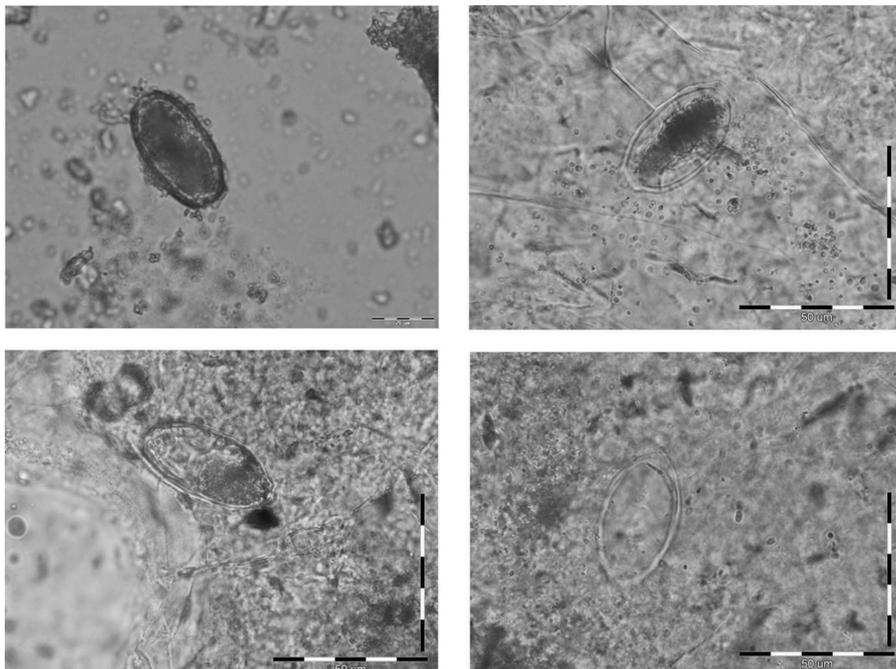


Figura 3. Huevos de *Calodium hepaticum* (= *Capillaria hepatica*) detectados sobre los restos de una tumba de un adolescente en Amiens (Norte de Francia) en el periodo de la época romana tardía. Imagen tomada de Mowlavi et al. 2014.

2013; Orlando et al. 2013; Meyer et al. 2014). De este modo, la Paleogenómica está revolucionando nuestro conocimiento sobre las relaciones evolutivas entre distintos taxones y sobre la dinámica poblacional de diferentes grupos de organismos a lo largo de un intervalo de tiempo concreto. También está permitiendo comprender mejor la acción de distintos eventos paleoclimáticos en las poblaciones de estudio o, está ofreciendo novedosa información sobre los movimientos migratorios llevados a cabo por esas poblaciones a través de diversas zonas geográficas (Shapiro y Hofreiter 2014; Pickrell y Reich 2014). Además, la Paleogenómica está permitiendo abordar el estudio genómico de la microbiota y de otros organismos asociados a individuos concretos. De este modo, en lugar de intentar recuperar un fragmento de ADN de un taxón parasitario específico (como se ha explicado en el párrafo anterior), mediante aproximaciones paleogenómicas ahora es posible recuperar el genoma de distintos parásitos que puedan estar asociados a un organismo determinado, abriendo novedosos campos de investigación.

2.3.3. Técnicas serológicas (Paleoserología)

Actualmente, entre las principales técnicas de inmunodetección se incluyen los ensayos inmu-

noenzimáticos, de inmunofluorescencia e inmunocromatografía (tira reactiva), siendo ELISA e inmunofluorescencia los más citados para identificar antígenos en material antiguo (Andrade, 2014).

La ventaja principal de este tipo de técnicas radica en la existencia de kits de diagnóstico, los cuales, mediante anticuerpos mono o policlonales dirigidos a un único epitopo antigénico (la zona por la que un antígeno se une a un anticuerpo), facilitan y agilizan los procedimientos de laboratorio, garantizando a la par una alta sensibilidad y especificidad.

En cuanto a la aplicación de estas técnicas, se han utilizado para el diagnóstico de enfermedades parasitarias y no parasitarias en material paleobiológico; así como para la identificación de moléculas antigénicas de parásitos, permitiendo el diagnóstico de infecciones existentes en estas poblaciones (Andrade, 2014).

3. Detección de protozoos en muestras antiguas

La detección de infecciones por protozoos en restos arqueológicos no es sencilla, y se ve dificultada aún más cuando se trata de protozoos tisulares (Ferreira et al., 1992). A pesar de ello, se han hallado este tipo de parásitos mediante exámenes histopatológicos y microscópicos, trabajo que se ha visto enormemente facilitado con el desarrollo y mejora de las técnicas moleculares y serológicas.

Como ejemplos de detección de protozoos tenemos:

- El trabajo de Gonçalves et al. (2002), los cuales examinaron heces encontradas en letrinas de yacimientos arqueológicos medievales en Francia y diagnosticaron la presencia de coproantígenos de *Giardia lamblia* mediante ELISA.
- La identificación, mediante inmunofluorescencia directa, de *Cryptosporidium sp.* y *Giardia sp.* en las heces del intestino de momias halladas entre los 500 y 3000 BP (Allison, Bergman y Gerszten, 1999).
- El hallazgo de un antígeno de *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la malaria en humanos) al realizar un ensayo inmunoenzimático de muestras de piel, músculos y huesos de momias egipcias del período predinástico (3200 a.C.) de la región de Gebelen (Cerutti et al., 1999).
- La obtención de quistes de *Entamoeba coli* en el contenido intestinal de una momia peruana y quistes protozoarios en coprolitos humanos que datan del 1800 BP.
- Hallazgo de ooquistes de *Eimeria sp.* en coprolitos de ciervos en

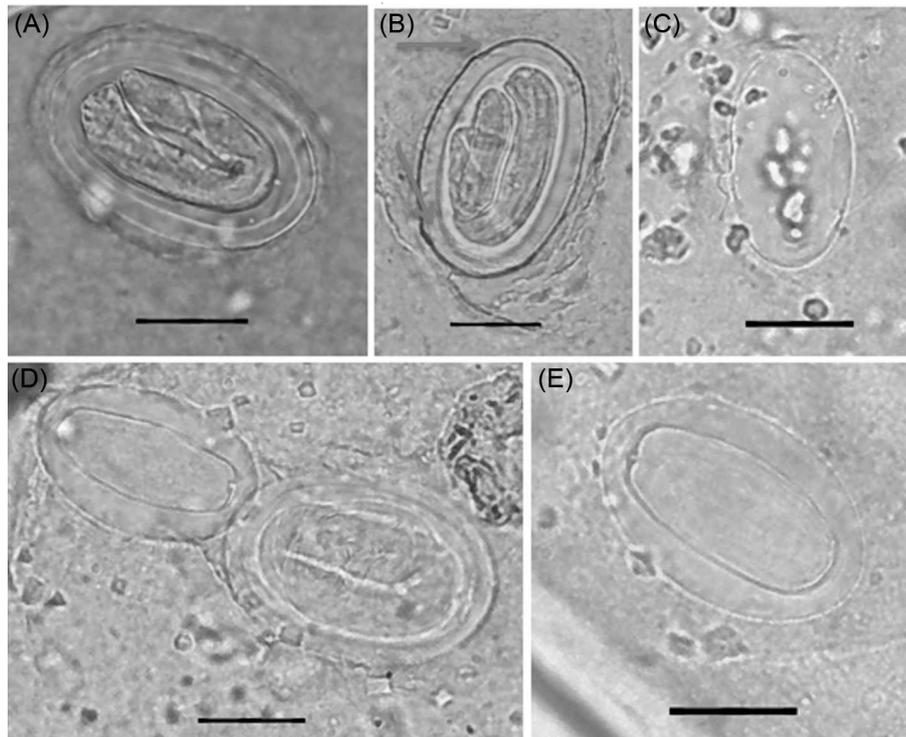


Figura 4. Huevos del espirúrido *Physaloptera spp.* encontrados en una tumba de la edad de Bronce (2800-2500 BC) en Irán. Imagen tomada de Makki et al. (2017).

Brasil, datados en el año 9000 BP (Ferreira et al., 1992).

4. Detección de helmintos en muestras antiguas

Los helmintos son los parásitos más comunes en el material arqueológico, ya que los huevos y las larvas pueden conservarse bien mediante la desecación o, en ocasiones, incluso mediante la mineralización (Araújo et al., 2008).

Sin embargo, a veces su identificación por microscopía se ve dificultada por la superposición de medidas en sus huevos y por ciertas características morfológicas, como la apariencia de la masa embrionaria y la presencia de larvas, el número de cutículas, el tipo de cáscara, la presencia de opérculo y otras estructuras internas (Chame y Sianto, 2014).

Como ejemplo de estos hallazgos de nematodos, la bibliografía nos muestra:

- La presencia de huevos de capiláridos compatibles con *Calodium hepaticum* en el interior de una egagrópila (Figura 3) datada sobre el 6540 ± 110 BP en la Patagonia Austral (Fugassa, Sardella y Denegri, 2007).
- La detección de ADN de *Ascaris sp.* en depósitos arqueológicos de letrinas del siglo XIV (Loreille et al., 2001).
- El hallazgo, en la localidad argentina de El Diquecito, de un huevo de *Heterakoidea* en los sedimentos pélvicos de un individuo humano de entre 2562 ± 47 y 533 ± 57 BP (Ramírez et al., 2021).
- La presencia de huevos de *Enterobius vermicularis* en un coprolito del 2000 a.C. (antes de Cristo) en Brasil (Lino et al., 2018).
- La visualización de huevos de *Toxocara* hallados en el enterramiento de un franciscano portugués del siglo XVIII (Sianto et al., 2017).
- Detección de huevos de *Physaloptera spp.* hallados en una tumba, sobre el 2800-2500 antes de Cristo (Figura 4) (Makki et al. 2017)

5. Detección de artrópodos en muestras antiguas

Como se ha mencionado anteriormente, en la detección e identificación de artrópodos, el ámbar es extremadamente importante, pues ofrece un buen medio de conservación de las muestras, las cuales en otras circunstancias podrían no preservarse.

Dentro de este grupo, los ácaros parásitos y las garrapatas tienen gran importancia por su papel en el escenario epidemiológico y su contribución para la reconstrucción de la paleofauna, tanto es así que se ha desarrollado la rama de la paleoacarología para su estudio específico (Rocha & Serra-Freire, 2014).

Algunos ejemplos de detección de artrópodos en muestras antiguas son:

- El hallazgo de *Dermacentor reticulatus* en el canal auditivo de un rinoceronte lanudo (*Rhinoceros antiquitatis* Blum), que quedó atrapado en unos pozos de nafta en Starunya (Ucrania) durante el Pleistoceno (Schille, 1916).
- La aparición de un ácaro del género *Demodex* sp. en una egagrópila de la Patagonia Austral dataada en el 6.540 ± 110 BP (Fugassa, Sardella y Denegri, 2007).
- El descubrimiento de cinco fósiles de “moscas de las arenas” (del género *Lutzomyia*) en ámbar miocénico (15-20 Ma de edad) la República Dominicana (Peñalver y Grimaldi, 2005).
- La presencia de tripomastigotes de *Trypanosoma antiquus* en las heces de *Triatoma dominicana*, un triatomino (chinche) de hace unos 20 millones de años (Poinar, 2005a).
- El hallazgo de un mosquito de la especie *Culex malariager* descu-

bierto en ámbar en la República Dominicana (Figura 5) de hace 15-20 millones de años (Poinar, 2005b).

- Detección de un *Protoculicoides* infectado con el parásito de la malaria *Paleohaemoproteus burmacis*, encontrado en ámbar hace 100 millones de años (Figura 6) (Poinar & Telford, 2005)

6. Aplicación de la Paleoparasitología en el yacimiento del Turuñuelo, Guareña (Badajoz).

Como ya se publicó en un artículo previo sobre el yacimiento arqueológico del Turuñuelo de Guareña (Badajoz) (Lira Garrido et al. 2020), la cantidad de animales hallados en este espacio arqueológico es realmente sorprendente. Son varios los estudios que se están realizando sobre los equidos y el resto de las especies encontradas, si bien, una parte importante del proyecto de investigación enmarcado en este yacimiento está centrada en el estudio de los coprolitos y sedimentos encontrados en el lugar.

Se han tomado unas 20 muestras de coprolitos, así como muestras control de los alrededores de los animales y a la redacción del presente artículo, estos restos fecales fosilizados se están analizando en los laboratorios de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Extremadura.

El análisis paleoparasitológico de estas muestras nos va a permitir determinar si estos animales estaban parasitados, qué especies parasitarias infectaban a estos animales, así como determinar otros aspectos evolutivos relacionados con la simbiosis parasitohospedador.

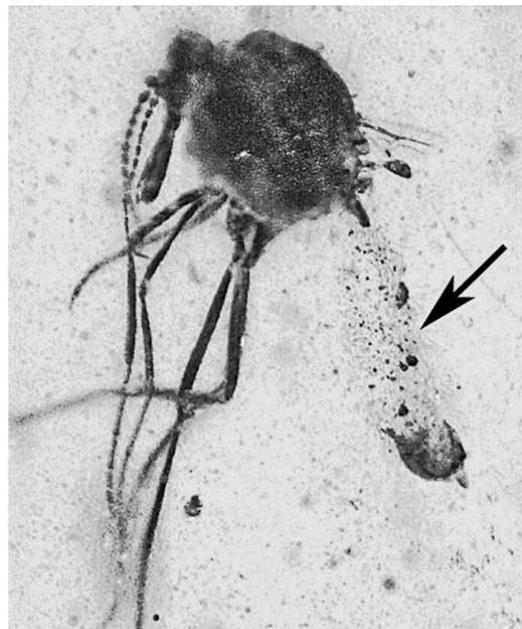


Figura 6. Imagen de un *Protoculicoides* conteniendo numerosos ooquistes del parásito malárico *Paleohaemoproteus burmacis* (flecha negra) localizado en ámbar en Myanmar, de hace unos 100 millones de años (Fotografía de George Poinar, Jr., cortesía de Oregon State University).

Los autores de este artículo esperan obtener en breve los resultados de los análisis, que serán dados a conocer a la comunidad científica y a la sociedad, y que, junto al resto de hallazgos y resultados científicos encontrados en estos animales, gracias a otras disciplinas, se espera pueda ofrecer una información realmente valiosa sobre el mundo de los caballos tartésicos y otras especies de época antigua.

Agradecimientos.

Esta revisión de la Paleoparasitología y los análisis parasitológicos sobre las muestras de coprolitos del yacimiento arqueológico del Turuñuelo se están llevando a cabo gracias a los proyectos de investigación con referencia IB10131 y IB18060, financiados por la “Consejería de Economía e Infraestructura de la Junta de Extremadura” y el “Fondo Europeo de Desarrollo Regional. Una manera de hacer Europa”.

Para más información:

En el Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz, se podrá consultar la bibliografía completa correspondiente a este artículo para todos aquellos interesados.

