

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA E BIOLOGIA EVOLUTIVA

CAROLINA SANTA ISABEL NASCIMENTO

CONTRIBUIÇÕES PALEOECOLÓGICAS PARA O ESTUDO DA
PALEOPARASITOLOGIA COM BASE NA ANÁLISE DE OSSOS,
OSTEODERMOS E COPRÓLITOS DE VERTEBRADOS

SÃO CARLOS - SP

2022

CAROLINA SANTA ISABEL NASCIMENTO

CONTRIBUIÇÕES PALEOECOLÓGICAS PARA O ESTUDO DA
PALEOPARASITOLOGIA COM BASE NA ANÁLISE DE OSSOS, OSTEODERMOS E
COPRÓLITOS DE VERTEBRADOS

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ecologia e Recursos
Naturais, da Universidade Federal de São
Carlos, para obtenção do título de
Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Adorna Fernandes

São Carlos-SP

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Carolina Santa Isabel Nascimento, realizada em 14/01/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Marcelo Adorna Fernandes (UFSCar)

Prof. Dr. Marcelo Nivert Schlindwein (UFSCar)

Prof. Dr. Jorge Felipe Moura de Jesus (PMEB-Praia Grande)

Prof. Dr. Heitor Roberto Dias Francischini (UFRGS)

Prof. Dr. Pedro Victor Buck (UEMG)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Onde você se sentir gente, participando com a sua contribuição pessoal na obra coletiva, aí
está o seu lugar.

(Helvécio M. P. Neves)

DEDICATÓRIA

Aos colegas de laboratório, Jorge, Thândara, Thaís, Pedro, Bernardo, Bia, Camila e Alícia, pelas conversas e risadas, seja no campus, nas idas a campo ou nos nossos quintais em São Carlos.

À minha família, por todo o apoio, carinho e torcida em todos os momentos.

À Colônia querida, juntos desde 2008, mais um presente da minha amada UFSCar: Lineu, Bruna, Yohanna, Gabi, Leandro.

Aos amigos de Salvador, Sorocaba, São Paulo e mais recentemente (mas de jeito nenhum menos importante) de Porto Alegre, por dividirem tantos conhecimentos, risadas, experiências; pelos nossos debates e questionamentos que nunca acabam, o que é natural, diante da complexidade da vida e do mundo.

Ao Vassili - que me acompanha há anos nessa vida de incertezas acadêmicas, sempre me ajudando a lidar com minhas inseguranças, dúvidas, e me fazendo dar risada de tudo isso, tornando a vida muito mais leve e divertida – e aos nossos filhotes de quatro patas.

Aos governos brasileiros dos anos de 2003 a 2016 (governos Lula e Dilma, do Partido dos Trabalhadores), que possibilitaram às pessoas das baixas classes sociais entrarem e permanecerem nas Universidades. Infelizmente, esse país é tão desigual, que mesmo os direitos básicos haviam sido negados à boa parte dos cidadãos, por toda a história deste país, até então. Em especial, dedico este trabalho à ciência brasileira e a cada pesquisadora e pesquisador que segue firme, mesmo diante das constantes incertezas e desvalorização do seu trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu orientador Marcelo Adorna, por ter me proporcionado a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP), trabalhando com os maravilhosos materiais deste laboratório. Abrir a porta do LPP é como entrar em um mundo à parte, cada espécime nos traz uma curiosidade de que histórias aquele material pode nos contar. Obrigada, Marcelo, por aceitar me orientar e conceder esta oportunidade.

Aos pesquisadores doutores Adauto Araújo e Luiz Fernando Ferreira (*in memoriam*), Dra. Márcia Chame e ao Laboratório de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro, por cederem as amostras de coprólitos e de dieta analisados neste trabalho.

À Profa. Dra. Ana Lombardi, do Laboratório de Biotecnologia de Algas da UFSCar, por ceder o espaço para as análises por microscopia óptica das lâminas das amostras.

Aos professores Heitor Francischini, Jorge Moura, Marcelo Nivert e Pedro Buck, por aceitarem o convite para compor a banca, contribuindo com preciosas críticas e sugestões à tese.

Aos meus colegas de laboratório que contribuíram com críticas, discussões e observações aos trabalhos.

Ao Vassili Piiadov, pelo auxílio em parte das análises e das ilustrações.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN), pelo espaço e suporte à pesquisa.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo financiamento e pela bolsa de pesquisa (processo número 426410/2019-01), que permitiram que todo este trabalho de doutorado fosse realizado.

RESUMO

Os estudos em Paleoparasitologia são ainda escassos em todo o mundo. Interdisciplinares, utilizam técnicas de diversas áreas do conhecimento, tais como Paleontologia, Arqueologia, Medicina, Epidemiologia, Biologia Molecular, Biologia Evolutiva e Ecologia. As informações obtidas nos estudos paleoparasitológicos dizem respeito não apenas aos organismos e às parasitoses, mas também fornecem informações sobre o paleoambiente e sobre as relações paleoecológicas envolvidas em tais interações. Neste trabalho, foram analisados três diferentes tipos de materiais da coleção paleontológica do Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP), da Universidade Federal de São Carlos, em São Carlos-SP. Estes foram coletados em outros contextos de trabalho de Graduação e Pós-graduação no LPP, e estudados no presente Doutorado por apresentarem algum tipo de evidência de endoparasitismo ou ectoparasitismo. Os materiais analisados foram: coprólitos de diferentes vertebrados, datados do Pleistoceno e Holoceno, provenientes da região Nordeste do Brasil. Eles foram coletados no sítio arqueológico e paleontológico Lagoa Uri de Cima, na região de Salgueiro, Pernambuco, em uma parceria com a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – Rio de Janeiro). Foram encontradas e registradas larvas de Nematoda em dois dos coprólitos. Apesar de não serem confirmadas como parasitas, o registro destes organismos é bastante importante para evitar a sua sub-representação no ambiente no passado. Além disso, foram encontrados restos de material vegetal (como grãos de pólen, amido e fitólitos) e de outros tipos de dieta, por meio de observação macroscópica da dieta dos animais, microscopia óptica e análise por meio de microtomografia computadorizada. Outro tipo de material analisado foram 1300 osteodermos de três indivíduos de pampatério *Holmesina Cryptae* (Xenarthra, Cingulata, Pampatheriidae), depositados na coleção do LPP. Esse material foi obtido após duas expedições, realizadas nos anos de 2012 e 2014, na Gruta da Lapinha, no município de Iramaia, Bahia. Os osteodermos que apresentavam marcas possivelmente relacionadas a parasitismo foram observados com microscópio estereoscópico e por microscopia eletrônica de varredura. As marcas foram divididas em três tipos: as causadas possivelmente por infecção fúngica, sendo a primeira descrição deste tipo em osteodermos fossilizados, as resultantes de infecção secundária, após uma lesão inicial, e as que foram causadas possivelmente por ação de Siphonaptera (pulgas), que, sendo assim, já se encontravam neste hospedeiro há pelo menos 20 mil anos. Por fim, foi estudada também a fíbula de um dinossauro saurópode do Cretáceo Superior, coletada no Noroeste do estado de São Paulo e depositada na referida coleção no ano de 2006. Ela foi retomada por pesquisadores de Pós-doutorado e Mestrado nos anos de 2017 e 2018, que

fizeram análises histológicas utilizando tomografia computadorizada, na Escola de Medicina da USP e por microscopia eletrônica de varredura, na Universidade Estadual de Campinas, chegando ao resultado de osteomielite aguda. A partir do estudo dessa lesão, foram encontrados microfósseis nos canais vasculares do indivíduo, o que levou a uma investigação por microscopia óptica, na Universidade Federal de São Carlos. Como resultado, foram observados cerca de 70 microrganismos preservados dentro dos canais vasculares do animal, que foram descritos como uma possível espécie de parasito sanguíneo, sendo o primeiro registro de parasitos dentro dos ossos desses animais. Além dos artigos científicos, os resultados destes trabalhos e as discussões resultantes foram ou serão apresentados também em um livro, em eventos de divulgação científica e em espaços fora das Universidades, com o objetivo de aumentar o diálogo e auxiliar a firmar a aproximação entre o meio acadêmico e o ambiente externo aos institutos de pesquisa, envolvendo a sociedade em geral.

Palavras-chave: Paleoecologia. Parasitologia. Ectoparasitos. *Tunga*. Siphonaptera. *Leishmania*. Megafauna. Pamphtheriidae. Divulgação científica.

ABSTRACT

Studies in Paleoparasitology are still scarce worldwide. Interdisciplinary, they can use techniques from different areas of knowledge, such as Paleontology, Archeology, Medicine, Epidemiology, Molecular Biology, Evolutionary Biology and Ecology. The information obtained in paleoparasitological studies concerns not only the organisms and parasitic diseases, but also can provide a lot of information about the paleoenvironment and about the paleoecological relationships involved in the interactions. In this work, different materials from the paleontological collection of the Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP), of the Universidade Federal de São Carlos, in São Carlos-SP were analyzed. Such materials were previously collected in other Undergraduate and Postgraduate research at the LPP and taken up again in the present Doctorate because they present some type of evidence of endoparasitism or ectoparasitism. The materials analyzed were coprolites of different vertebrates, from the Northeast region of Brazil, from the archaeological and paleontological site Lagoa Uri de Cima, located in the region of Salgueiro, Pernambuco, collected in a partnership with the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz do Rio de Janeiro). Dating back to the Pleistocene and Holocene, these materials have not confirmed evidence of parasites. However, nematode larvae, remains of plant (such as pollen grains, starch and phytoliths) and other types of diet were found through macroscopic observation of the diet of the animals, optical microscopy and analysis by computerized microtomography. Another material analyzed was 1300 osteoderms from three individuals of *Holmesina Cryptae* (Xenarthra, Cingulata, Pamphathiidae), deposited in the LPP collection. This material was obtained after two expeditions, carried out in 2012 and 2014, at Gruta da Lapinha, in the municipality of Iramaia, Bahia. Osteoderms that had marks possibly related to parasitism were observed by optical and scanning electron microscopy. The marks were divided into three types: they could have been caused by fungal infection, being the first description of this type in fossilized osteoderms, by secondary infection, after an initial injury, or by the action of Siphonaptera (fleas), which, therefore, already found in this host at least 20,000 years ago. Finally, the fibula of a sauropod dinosaur from the Upper Cretaceous was also studied, collected in the Northwest of the state of São Paulo and deposited in that collection in 2006. It was recovered by postdoctoral and master researchers in 2017 and 2018, who performed histological analyzes using computed tomography, at the Escola de Medicina da USP and by scanning electron microscopy, at the Universidade do Estado de Campinas, and obtained the result of acute osteomyelitis. In addition, microfossils were found in the vascular channels of the animal, which led to an investigation using optical microscopy at the

Universidade Federal de São Carlos. As a result, about 70 microorganisms were observed preserved inside the vascular channels of the animal, which were described as a possible species of blood parasite, being the first record of parasites inside the bones of these animals. The results of these works and the resulting discussions have been or will be presented in scientific articles, but also in a book, in scientific dissemination events and in locations outside the Universities, with the aim of increasing dialogue and helping to strengthen the approximation between the academic and the external environment research institutes, involving society in general.

Keyword: Paleoecology. Parasitology. Ectoparasites. *Tunga*. Siphonaptera. *Leishmania*. Megafauna. Pamphateriidae.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	9
SUMÁRIO	11
LISTA DE ABREVIATURAS	10
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 PARASITOLOGIA	11
1.2 PALEOPARASITOLOGIA	15
2 OBJETIVOS	18
3 COPRÓLITOS DE VERTEBRADOS	19
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1.1 ANÁLISES DOS COPRÓLITOS	29
3.1.1.1 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS E POR MICROSCOPIA ÓPTICA	33
3.1.1.2 TÉCNICAS MENOS INVASIVAS OU NÃO INVASIVAS	65
4 OSTEODERMOS DE PAMPATÉRIO <i>HOLMESINA CRYPTAE</i> (XENARTHRA, CINGULATA, PAMPATHERIIDAE)	69
4.1 ECTOPARASITOS E RELAÇÕES PALEOECOLÓGICAS	69
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	70
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5 OSSOS DE SAURÓPODES	72
5.1 PARASITAS SANGUÍNEOS E LEISHMANÍASES	72
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	73
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
6 TRANSMISSÃO DE PARASITOSE	75

6.1	SÍTIOS ARQUEOLÓGICOS E PALEONTOLÓGICOS PLEISTOCÊNICOS DA AMÉRICA DO SUL	76
7	DIVULGAÇÃO DOS TRABALHOS REALIZADOS	106
8	CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
	REFERÊNCIAS	108
	GLOSSÁRIO	114
	APÊNDICES.....	116
	PUBLICAÇÕES RESULTANTES DAS PESQUISAS DE DOUTORADO	117
	APÊNDICE A.....	117
	APÊNDICE B	123
	APÊNDICE C	140
	APÊNDICE D.....	152
	APÊNDICE E	156
	APÊNDICE F	157
	APÊNDICE G.....	158
	ANEXO A	161

LISTA DE ABREVIATURAS

AP – Antes do Presente

CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

DEBE – Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

GABI – Grande Intercâmbio Americano

IFSC – Instituto de Física da Universidade de São Paulo/São Carlos

IMX – Linha de Luz de Microtomografia por Raios-X

Lalgas – Laboratório de Biotecnologia de Algas

LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

LOE – Luminescência Opticamente Estimulada

LPP – Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

USP – Universidade de São Paulo

1 INTRODUÇÃO

1.1 PARASITOLOGIA

Parasitismo é definido por Neves (2005, p.10) como sendo um tipo de “associação entre seres vivos, na qual existe unilateralismo de benefícios, ou seja, o hospedeiro é espoliado pelo parasito, pois fornece alimento e abrigo para este” e por Rey (2015, p. 7) como “toda relação ecológica, desenvolvida entre indivíduos de espécies diferentes, em que se observa, além de associação íntima e duradoura, uma dependência metabólica de grau variável”. Sendo assim, nessas definições mais clássicas, é considerado que apenas um dos organismos envolvidos obtém benefícios ecológicos significativos, em alguns casos até mesmo dependendo totalmente do hospedeiro para sua sobrevivência (REY, 2015). É o caso, por exemplo, dos helmintos pertencentes à Classe Cestoda, que apresentam perda de parte do seu sistema digestório (NEVES, 2005) ou daqueles que ao longo do tempo chegaram a perder genes importantes, como os que codificam a síntese de certas enzimas, passando a depender das correspondentes encontradas no hospedeiro (REY, 2015). Por conta deste aspecto de extrema dependência, quando há tempo para ocorrência de eventos co-evolutivos, geralmente o parasito não leva o hospedeiro à morte, ou pelo menos não rapidamente.

Neves (2005) fornece o exemplo do *Trypanosoma cruzi*, que é o agente etiológico da Doença de Chagas. Em tatus, onde provavelmente ocorre já há algum tempo, um animal saudável pode viver por anos com o parasito sem desenvolver lesões incapacitantes. Entretanto, na espécie humana e em animais domésticos, como cães e gatos, se não houver interferência com algum tipo de tratamento, a expectativa de vida é reduzida abruptamente. Mesmo dentro da mesma espécie, mas entre populações sujeitas a diferentes condições ambientais durante sua história evolutiva (inclusive culturalmente, no caso dos humanos), a reação a um mesmo parasita pode ser diferente. Como exemplo destes casos, o mesmo autor cita as diferenças relacionadas à malária (doença causada por protozoários do gênero *Plasmodium*). De acordo com ele, essas variações populacionais do hospedeiro é que seriam a razão para que, em zonas endêmicas da doença, a população autóctone costume ser afetada com menos severidade e em menor porcentagem do que quando chegam pessoas de fora dessas regiões, que, ao adquirir o patógeno, frequentemente apresentam a doença de forma bastante patogênica.

Essas são definições mais clássicas e “práticas” de parasitismo. Se considerarmos as complexas interações que ocorrem entre possíveis hospedeiros, vetores, reservatórios e parasitas, bem como a influência do ambiente em que estão inseridos, as definições podem se tornar bem mais complicadas.

De qualquer forma, para chegar-se ao desenvolvimento da doença parasitária, são necessários os seguintes fatores (NEVES, 2005):

- a) Quanto ao hospedeiro: sua idade, estado de nutrição, ocorrência de outras doenças, condições da sua resposta imune;
- b) Quanto ao parasito: número de indivíduos, virulência da cepa, localização no corpo do hospedeiro, tipo de metabolismo, nível de interação com o corpo do hospedeiro.

A depender de como seja a combinação desses fatores, o hospedeiro pode ser considerado como portador assintomático, não parasitado ou, de fato, doente (NEVES, 2005).

As diversas interações que podem ocorrer entre os seres vivos e o meio não são estáticas, caracterizando-se por um dinamismo ao longo do tempo. No ambiente natural, as alterações estão permanentemente ocorrendo. Dentre os fatores responsáveis por essas alterações, podemos ter catástrofes naturais, ação antrópica ou inserção de novos fatores na dinâmica das populações – como a introdução de agentes infecciosos ou patogênicos. Nos casos em que as populações de possíveis hospedeiros já estejam mais suscetíveis, tais alterações ambientais podem acabar por criar condições propícias para multiplicação desproporcional dos parasitos ou dos vetores. Se as alterações ocorrerem de forma muito ampla, acentuada, rápida ou repentina, há chances de termos como resultado a extinção de algumas ou várias espécies de hospedeiros (NEVES, 2005).

A ação patogênica dos parasitos pode ocorrer de algumas diferentes formas, como demonstrado no Quadro 1:

Quadro 1. Formas de ação patogênica dos parasitos em relação aos seus hospedeiros.

TIPO DE AÇÃO	COMO É CAUSADA
Espoliativa	Absorção de nutrientes ou sangue do hospedeiro. Exemplo de helmintos que se fixam no intestino do seu hospedeiro, com aparato bucal modificado para fixação e sucção.
Mecânica	Pelo número de indivíduos ou pelo seu tamanho, o parasita pode acabar por obstruir o órgão onde está alojado, conseqüentemente impedindo o fluxo de alimento ou de sangue.
Traumática	Causada diretamente pela movimentação ou algum tipo de ação do parasita. Por exemplo, rompimento de hemácias após a multiplicação de uma das espécies de <i>Plasmodium</i> , ou as lesões causadas durante a migração pulmonar das larvas dos helmintos da família Ancylostomatidae.
Tóxica	Espécies que produzem metabólitos ou enzimas que causam lesões nos hospedeiros, seja por causar reações alérgicas, teciduais ou algum outro tipo de reposta do corpo do organismo.
Enzimática	Espécies que liberam enzimas que facilitam a penetração na pele do hospedeiro ou que causam lesões por onde são obtidos os nutrientes.
Irritativa	Causada pela própria presença do parasita, que acaba irritando o local afetado.

Fonte: informações adaptadas de Neves, 2005.

Carneiro e Antunes (2005) definem a epidemiologia como sendo “a ciência que estuda a distribuição de doenças ou enfermidades, assim como seus determinantes na população humana” (p. 15). Entretanto, apesar de originalmente a epidemiologia ter o foco na saúde humana, métodos e análises de estudos epidemiológicos podem ser utilizados para entender as relações de saúde-doença também do passado remoto, em animais humanos e não-humanos.

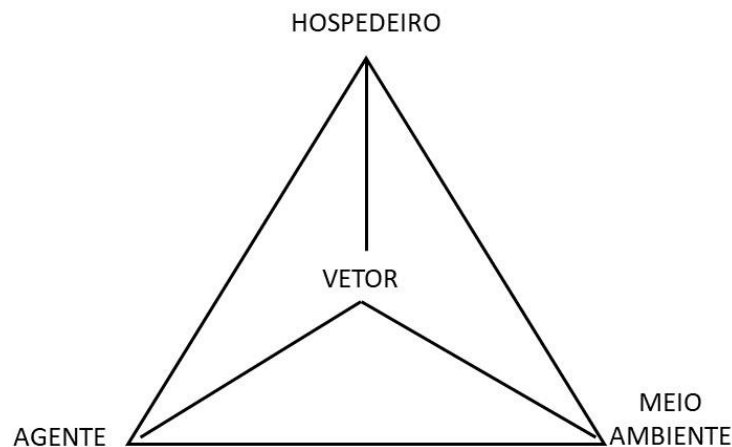
Os conceitos utilizados são os mesmos, porém com adaptações que refletem as limitações encontradas ao se trabalhar com as informações do registro fóssil.

Uma das premissas básicas da epidemiologia é que, em geral, as doenças não se distribuem de forma aleatória, mas sim de acordo com determinados fatores que propiciam uma maior propagação dos patógenos em populações mais vulneráveis a determinadas características. Desta forma, três perguntas são peças-chave nestes estudos (adaptado de CARNEIRO E ANTUNES, 2005):

- a) Por que certos indivíduos adoecem e outros não? Levando em consideração o ambiente em que se encontram, e características demográficas, biológicas e genéticas. Ou seja, considerando o indivíduo, quem adoece e por que adoece?
- b) Por que certas doenças ocorrem em determinadas regiões geográficas (sejam exclusivamente ou com maior frequência)? Por exemplo, pode ser por conta de limitações da distribuição geográfica dos vetores ou reservatórios? Aqui, portanto, é considerado o lugar.
- c) Por que a ocorrência das doenças varia ao longo do tempo? Ocorreu aumento ou redução na frequência da doença ao longo do tempo? Se sim, por que ocorreu essa variação? Neste caso, a referência é quanto ao tempo.

Quanto à transmissão e manutenção da doença, depende da interação daquilo que é chamado de tríade epidemiológica: ocorrências dos agentes causadores, das características do hospedeiro e do meio (CARNEIRO E ANTUNES, 2005) (Figura 1).

Figura 1. A chamada tríade epidemiológica de doenças, indicando os fatores cuja interação está relacionada à transmissão e manutenção das doenças.



Fonte: Modificado de Carneiro e Antunes (2005).

1.2 PALEOPARASITOLOGIA

Para a ocorrência de doenças no passado, podemos considerar os mesmos fatores. De acordo com Ferigolo (2007), a ciência que estuda estes eventos, a Paleopatologia, deve ser considerada parte da Paleoecologia, pois os patógenos seriam um dos principais elementos do ambiente, acarretando acentuada pressão nos processos adaptativos dos organismos. As doenças seriam “ecológico-dependentes” (p. 88), e a Paleopatologia teria como um dos principais objetivos elucidar as relações envolvidas entre os diferentes organismos, e destes com o meio, neste tipo de dinâmica. Neste mesmo trabalho, Ferigolo chega a afirmar que, para os mamíferos, os micro e macroparasitas seriam os principais reguladores “das populações, tanto hoje quanto no passado” (p. 88). Polêmicas à parte, é indiscutível a afirmação do referido autor de que uma das principais aplicações da Paleopatologia é a sua utilização como ferramenta para evitar incorreções em sistemática, detectando as patologias e diferenciando

anomalias, alterações degenerativas (causadas por traumas, sobrecarga ou infecções) ou senis (como artrose e discopatias) de características taxonômicas.

Mais especificamente, temos a paleoparasitologia, que pode ser definida como “o estudo dos parasitos encontrados em remanescentes da espécie humana e de outros animais recuperados de sítios arqueológicos, paleontológicos, ou de qualquer outra fonte em que se mantiveram preservados” (FERREIRA, 2011, p. 27). Como marco do avanço dos estudos paleoparasitológicos, destacam-se os trabalhos do médico francês sir Marc Armand Ruffer no início do Século XX, ao conseguir recuperar ovos de *Schistosoma haematobium* em múmias egípcias datadas em cerca de 1250-1100 anos a.C. (FERREIRA, 2011), desenvolvendo técnicas de reidratação de tecidos que foram sendo aperfeiçoadas nos anos posteriores. Nas décadas de 1950 e 1960, os botânicos Eric Callen e Thomas Cameron publicaram uma técnica de reidratação especificamente para coprólitos, constituindo de imersão em solução aquosa de fosfato trissódico (Na_3PO_4) por 72h, que trouxe excelentes resultados para recuperação de itens da dieta e parasitológicos contidos nas fezes, diminuindo efeitos de deformação ou perda de estruturas destes elementos (CALLEN E CAMERON, 1955; 1960). Essa técnica continua a ser utilizada atualmente, fazendo-se ajustes de acordo com as características específicas do coprólito, do seu processo de fossilização e dos elementos que se pretende recuperar (palinológicos, parasitológicos, dieta etc.).

É uma ciência interdisciplinar, que frequentemente envolve paleontologia, arqueologia, ecologia, biologia molecular, epidemiologia, além de biologia dos organismos e medicina (REINHARD et al., 1986; FERIGOLO, 2007; FERREIRA, 2011). A Paleoparasitologia beneficia-se dos avanços nessas diferentes áreas, permitindo a recuperação de informações cada vez mais detalhadas das amostras, à medida que novos métodos e tecnologias são desenvolvidos ou aprimorados.

No Brasil, a partir da década de 1970, Luiz Fernando Ferreira, pesquisador da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), do Rio de Janeiro, iniciou uma série de publicações com seus orientados e sua equipe de pesquisa, analisando material arqueológico e paleontológico (SIANTO et al., 2013) em busca de indícios de parasitas. Logo em seguida fundaram o primeiro laboratório especializado em estudos paleoparasitológicos do país, cunhando o termo Paleoparasitologia (FERREIRA, 2011). O referido laboratório continua ativo, e um dos principais materiais da sua coleção são os coprólitos – ou fezes fossilizadas.

Ainda atualmente há relativamente poucos estudos em paleoparasitologia no Brasil e no mundo. Nas coleções paleontológicas nos museus, laboratórios e instituições de pesquisa há diversos materiais que poderiam ser estudados sob este aspecto. Contudo, esta perspectiva muitas vezes não é considerada. Sendo assim, o presente trabalho de Doutorado se justifica pela importância deste tipo de estudo, que entretanto ainda é bastante escasso.

Para o desenvolvimento de tal trabalho, foram analisadas amostras de coprólitos de vertebrados, de ossos e de osteodermos fossilizados. Esses materiais haviam sido coletados anteriormente, durante outros trabalhos de graduação e pós-graduação realizados no Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP), da Universidade Federal de São Carlos, na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, e depositados na coleção do referido laboratório. Eles foram retomados e compuseram a presente pesquisa por apresentarem algum tipo de indício de ação de ectoparasitos ou endoparasitos.

2 OBJETIVOS

Os materiais analisados - coprólitos de vertebrados, osso de saurópode e osteodermos de pampatérios - foram coletados entre os anos de 2006 e 2019 em diversos contextos de trabalho de graduação e pós-graduação realizados no Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP), da Universidade Federal de São Carlos, na cidade de São Carlos, estado de São Paulo. Os espécimes que foram identificados como apresentando indicações de ação de ectoparasitos ou endoparasitos foram analisados no presente trabalho de Doutorado, com o objetivo geral de analisar esse material paleontológico, descrevendo a possível ação dos parasitas.

Os objetivos específicos foram:

- a) Analisar os espécimes que apresentavam tais indícios, determinando quais as melhores análises disponíveis, de acordo com as características do material e das evidências encontradas neles;
- b) Descrever as lesões encontradas e os possíveis parasitos que as poderiam ter causado; e
- c) Tentar compreender, comparando aos estudos em hospedeiros e parasitos atuais, quais efeitos essas possíveis parasitoses podem ter causado nos animais hospedeiros no passado.

3 COPRÓLITOS DE VERTEBRADOS

Os fósseis podem ser classificados em restos ou vestígios, de acordo com o material preservado. Souto (2017) relembra as definições na literatura de restos como a estrutura corporal total ou parcialmente preservada; e de vestígios como o molde ou alguma indicação da atividade vital do organismo.

Do grego *ikhnos* (vestígios) e *logos* (estudo), a Icnologia é definida por Ekdale et al. (1984, *apud* SEDORKO E FRANCISCHINI, 2020) como “a ciência que estuda as interações entre os organismos e os substratos, tendo enfoque tanto nos processos quanto nos produtos dessas interações, os traços ou estruturas biogênicas” (p. 15). São exemplos de vestígios os ninhos, pegadas e excrementos fossilizados. É possível que o icnofóssil seja encontrado longe do seu local de origem, tendo sido remobilizado, transportado e retrabalhado. Porém, em geral, o mais comum é que ele seja encontrado *in situ*, no local em que foi produzido (NETTO et al., 2020). Por este motivo, estes registros podem ser ótimos indicadores da interação dos organismos com o meio, auxiliando na reconstrução de informações paleobiológicas, paleoecológicas e paleoambientais (CARVALHO, 2007; FUGASSA et al., 2010; SEDORKO E FRANCISCHINI, 2020).

Uma das grandes vantagens dos icnofósseis é que, em geral, como eles derivam de comportamentos que se repetem inúmeras vezes ao longo da vida de cada indivíduo, eles podem ser encontrados em maior quantidade do que seus fósseis corporais. Por exemplo, um único indivíduo produz excrementos dezenas a milhares de vezes ao longo da sua vida. Sendo assim, pela sua quantidade (SOUTO, 2017), pode ocorrer de haver mais registros dos seus excrementos do que do próprio organismo. Há casos de sítios em que, até então, nunca foram encontrados fósseis corporais de certos animais, entretanto já foram encontrados seus vestígios. Ou casos em que a diversidade da fauna local pôde ser estimada em maiores detalhes pelos icnofósseis em comparação aos seus fósseis corporais.

Fezes fossilizadas são denominadas coprólitos. Termo derivado dos radicais gregos *Kópros* (excremento) e *lithos* (pedra), foi introduzido pelo geólogo britânico William Buckland em 1829, se referindo a excrementos fossilizados em geral (HUNT et al., 2012).

Em 2012, Hunt e Lucas publicaram uma revisão definindo o que seriam os bromálitos, um termo mais amplo que inclui os diversos tipos de excrementos fósseis, além de definições mais específicas de cada tipo de excremento, dentre eles, os coprólitos.

Os bromálitos seriam, portanto, todos os traços fósseis relacionados a alimentos ingeridos, que passaram pela cavidade oral e pelo trato gastrointestinal do seu produtor, sendo preservados após serem expelidos ou ainda na parte interna do animal. Os autores supracitados separaram-nos em diferentes tipos, de acordo com as características do material fossilizado. Um resumo dos principais tipos de bromálitos apresentados por eles encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Alguns dos bromálitos (resíduos fossilizados relacionados à alimentação) citados e definidos por Hunt e Lucas (2012).

Classificação	Definição
Coprólito	Material fecal evacuado, preservado fora do animal, após a expulsão pela porção final do trato gastrointestinal.
Latrinito	Acumulação de coprólitos. Pode ser caracterizado de acordo com as especificidades da sua formação, acumulação e preservação. Por exemplo, um depósito de guano fossilizado é chamado de guanólito. Se for guano proveniente de morcegos, trata-se de Chiropteraguanólito; se foi produzido por aves, é chamado de Ornithoguanólito.
Consumúlito	Alimento ingerido e preservado ainda na região interna do corpo do animal. Também apresenta classificações mais específicas, de acordo com a região do corpo em que ficou preservado (região oral, estômago, intestino etc.). Por exemplo, se a preservação ocorreu após passagem pelo estômago, o material constitui um colólito. Se o colólito foi formado dentro de uma válvula espiral, é chamado de enteróspira.
Regurgitólito	Alimento regurgitado (expelido pela cavidade oral), digerido total ou parcialmente. Pode apresentar subclassificações, de acordo com o animal produtor e de onde ele é derivado (antes ou depois do trato gastrointestinal*).
Purgólito	Acumulação de regurgitólito.

*O que, na verdade, poderia ainda ser diferenciado entre regurgito e vômito.

Fonte: Tabela modificada de Hunt e Lucas (2012), com informações adicionais de Sedorko e Francischini, 2020.

Sendo assim, os coprólitos - restos alimentares digeridos e expelidos - são a matéria fecal fossilizada. A formação do material fecal – chamada de coprogênese – sofre ação dos

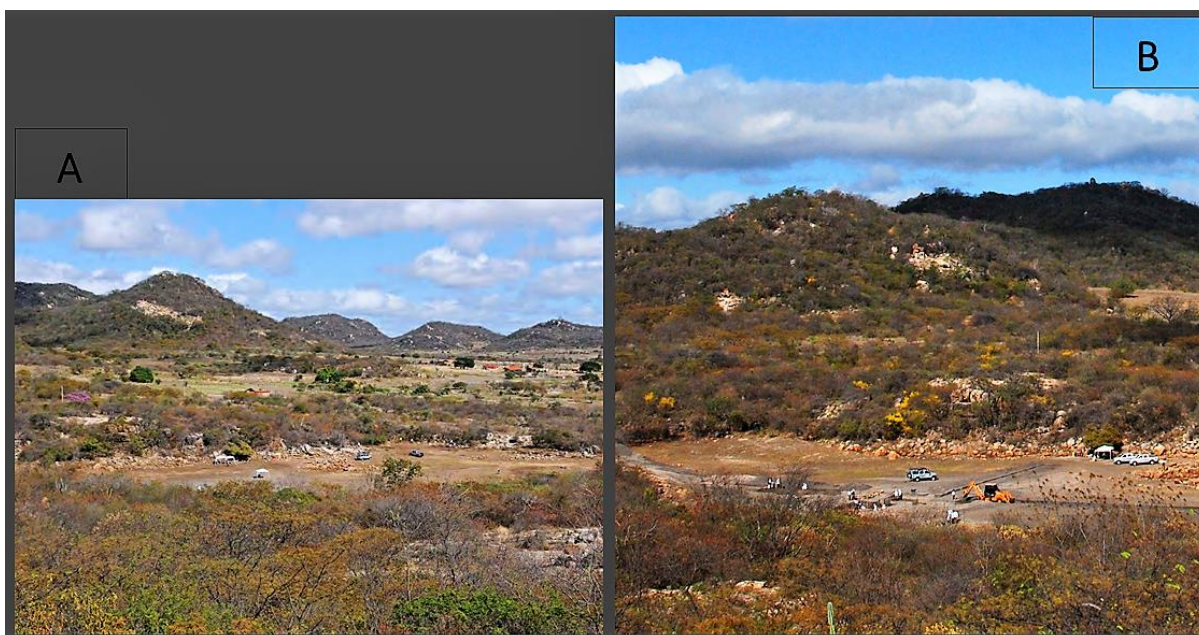
diversos elementos envolvidos desde a ingestão, passagem do alimento pelo trato digestório, digestão e extrusão. A ação das enzimas envolvidas nestes processos, os movimentos dos órgãos pelos quais o bolo alimentar e a massa fecal passam, o grau de compactação que eles sofrem e a velocidade do seu fluxo vão interferir diretamente na morfologia das fezes evacuadas, incluindo a formação de dobras, ranhuras e ornamentações na superfície (SOUTO, 2017). Desta forma, os coprólitos podem fornecer não apenas informações sobre os hábitos alimentares do animal produtor, mas também sobre características do seu sistema digestório, do seu processo de coprogênese, de evacuação, e de características ecológicas, como informações sobre presença de parasitos no sistema digestório do produtor, e possíveis relações de parasitismo.

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

As fezes fossilizadas analisadas neste estudo são originárias do sítio Lagoa Uri de Cima, localizado no Município de Salgueiro, região situada no Vale do Rio São Francisco, na margem do reservatório Negreiros, no Estado de Pernambuco, coordenadas 39°10'35"W e 8°04'42"S (MÜTZENBERG et al., 2013).

Com dimensões de 199 m de comprimento e 92 m de largura, o ambiente no seu entorno é caracterizado por solos arenosos, distróficos e de baixa fertilidade (MÜTZENBERG et al., 2013). Vários afloramentos rochosos são encontrados ao seu redor, sendo um sítio a céu aberto, rodeado de serras, com vegetação predominante de caatinga (SIANTO et al., 2013) (Figura 2).

Figura 2. Vista geral do entorno do Sítio Lagoa Uri de Cima (PE), demonstrando o seu contexto geoambiental.



Fonte: imagens A e B modificadas de Mützenber et al. (2013).

O Uri localiza-se em uma região onde se encontram *inselbergs* e maciços graníticos, com encostas acentuadas e intercaladas por solos arenosos em áreas pediplanadas e afloramentos rochosos em forma de lajedos. No depocentro da lagoa, a rocha-mãe apresenta-se acentuadamente intemperizada, formando isalterita de coloração esverdeada e textura argilosa. Canais temporários drenam as áreas mais baixas, sob caráter confinado e correndo sobre leito rochoso. A área do entorno da paleolagoa está inserida nos domínios da bacia hidrográfica do Rio Terra Nova, que apresenta regime intermitente (Mützenber et al., 2013).

A exploração do sítio ocorreu entre os anos de 2010 e 2013, mediante um projeto do Instituto de Arqueologia, Paleontologia e Ambiente do Semiárido (INCT/CNPq – INAPAS) inserido no Projeto de Integração do Rio São Francisco com as Bacias Hidrográficas do

Nordeste Setentrional (PISF), junto ao Ministério da Integração Nacional. Pesquisadores de diversas instituições de pesquisa do país trabalharam de forma multidisciplinar desde o planejamento operacional, no trabalho de campo e ainda atualmente em seus respectivos institutos de pesquisa (PESSIS et al., 2013).

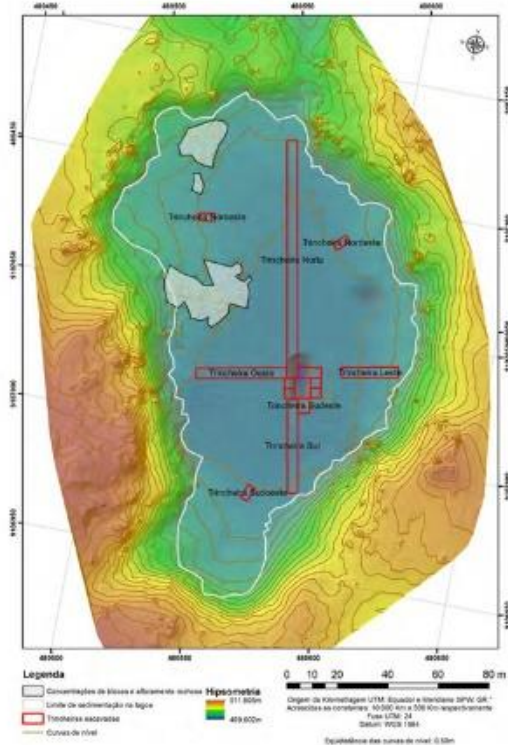
Para a prospecção, foram utilizadas como unidades básicas trincheiras de 4m x 2m, que depois originaram trincheiras maiores (Figuras 3 e 4), seccionando a paleolagoa de forma a gerar um perfil estratigráfico completo, tanto transversal como longitudinal (PESSIS et al., 2013).

Figura 3. Sítio Lagoa Uri de Cima (PE): A. Visão Geral do trabalho de prospecção; B e C. Abertura das trincheiras no início dos trabalhos de campo.



Fonte: Imagens modificadas de Pessis et al., 2013 (A e C) e Mützenberg et al., 2013 (B).

Figura 4. Posicionamento das trincheiras definidas para a prospecção do sítio. Fonte: modificado de Pessis et al. (2013) (imagem à esquerda) e Mützenberg et al. (2013) (imagem à direita).



Um dos trabalhos realizados foi a coleta de amostras de sedimento ao longo do perfil estratigráfico, utilizando cilindros de aço (Figura 5), para a datação por Luminescência Opticamente Estimulada (LOE) no Laboratório de Metrologia Arqueológica e Patrimonial da Universidade Federal de Pernambuco (para mais detalhes, ver MÜTZENBERG et al., 2013 e PESSIS et al., 2013).

Figura 5. Coleta de sedimento em tubos de aço para datação pelo método de Luminescência Opticamente Estimulada (LOE) (Imagem modificada de PESSIS et al. (2013). E Tabela (retirada e modificada de MÜTZENBERG et al., 2013) apresentando os resultados da datação para as deposições das camadas do sítio.

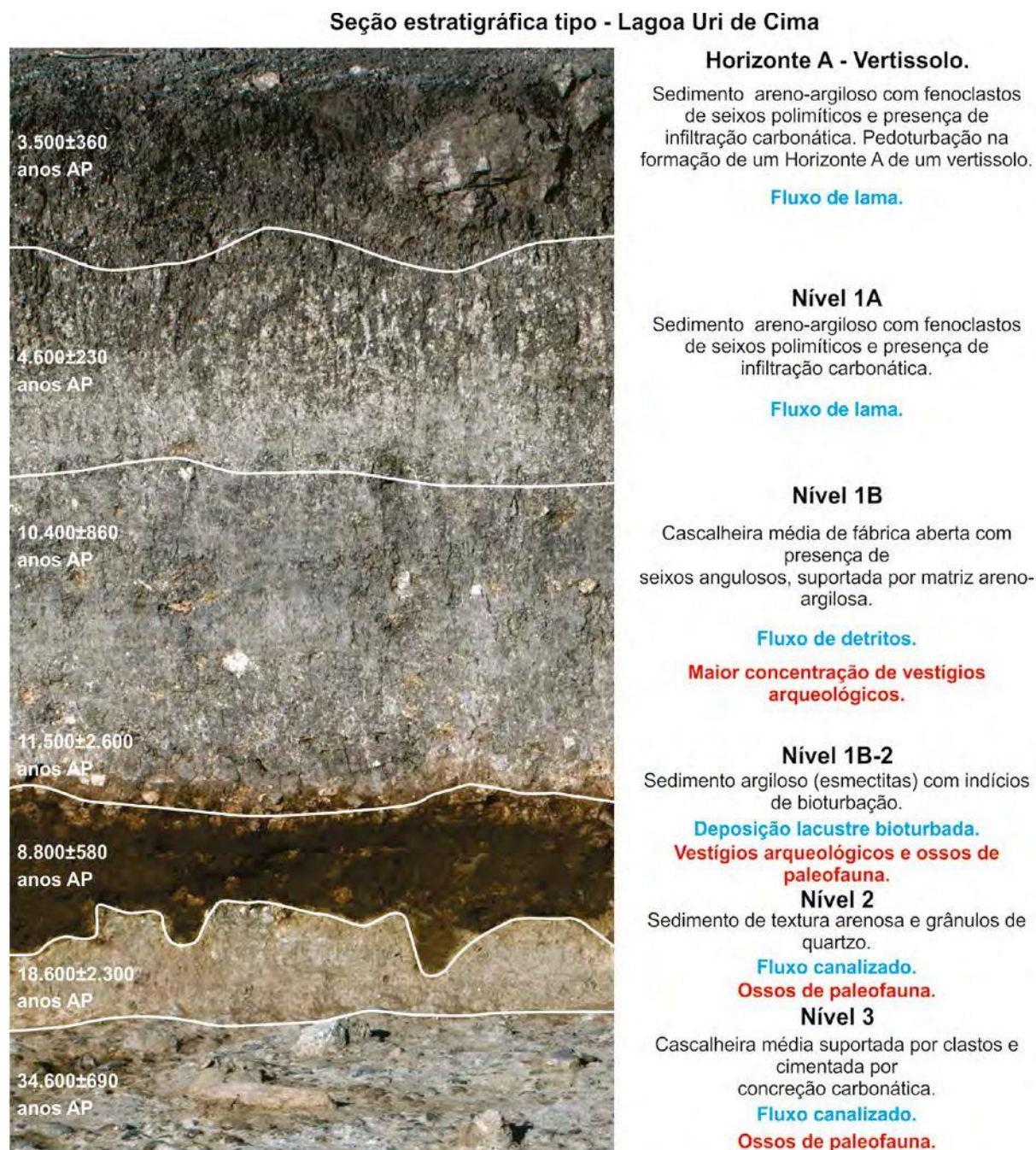


Camadas	Profundidade (m)	Taxa de dose anual (mGy/ano)	Dac (Gy)	E%	Idade LOE
Horizonte A	0,0 - 0,6	3,01	10,4	16,3	3.500 ± 340
Nível 1 ^a	0,6 - 1,0	2,86	13,1	19,6	4.600 ± 900
Nível 1B - 1º estrato	1,0 - 1,5	2,53	26,3	12	10.400 ± 1.250
Nível 1B - 4º estrato	1,5 - 1,7	3,7	42,6	4,6	11.500 ± 500
Nível 1B - 2	1,7 - 1,9	3,87	34	14	8.800 ± 1.320
Nível 2	1,9 - 2,1	3,86	67,5	6,9	18.600 ± 1.470
Nível 3	2,1 - 2,3	2,66	92	2	34.600 ± 690

Fonte: imagem modificada de Pessis et al. (2013) e Tabela modificada de Mützenberg et al. (2013).

Foram recuperados materiais arqueológicos (artefatos líticos) e paleontológicos (ossos, dentes e coprólitos de vertebrados), inclusive com concomitância dos dois tipos de registros em algumas camadas da escavação (ver Figura 6).

Figura 6. Seção estratigráfica da borda da Lagoa Uri de Cima.



Fonte: imagem de Mützenberg et al. (2013).

Durante todo o trabalho, as amostras semelhantes a coprólitos foram coletadas seguindo um protocolo pré-estabelecido e enviadas para o Laboratório de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro. Neste laboratório, as amostras passaram por uma primeira triagem, para separar os coprólitos dos pseudo coprólitos. Após as confirmações, as amostras foram medidas, reidratadas e submetidas às primeiras análises, que auxiliaram na identificação dos produtores de cada uma. Para mais detalhes, ver Sianto et al. (2013).

Figura 7. Coleta dos coprólitos e posterior análise no Laboratório de Paleoparasitologia da ENSP, na Fiocruz (Rio de Janeiro).



Fonte: ambas as imagens modificadas de Sianto et al. (2013).

No ano de 2016, foi firmada uma colaboração entre o referido laboratório da ENSP e o Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP) da UFSCar, quando foram cedidos três tipos de amostras relacionadas aos coprólitos coletados:

1. Porções de 0,5 mL de 24 coprólitos já reidratados e sedimentados;
2. Itens alimentares e restos macroscópicos recuperados em 48 coprólitos do sítio durante o processo de reidratação;
3. 17 fragmentos de coprólitos.

Parte desses materiais foi analisado no presente trabalho de Doutorado (Figura 8), como será detalhado adiante.

Figura 8. Rotina de análises nos Laboratórios de Microbiologia e Parasitologia (LMP), Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP) e de Biotecnologia de Algas (Lalgas), da UFSCar com as amostras cedidas pela Fiocruz. A. a autora no LPP; B. microscópio Nikon Eclipse Ni, no Lalgas; C. caixa com amostras de dieta de vertebrados; D. alguns dos coprólitos de vertebrados.



Fonte: elaborado pela autora.

3.1.1 ANÁLISES DOS COPRÓLITOS

Os coprólitos podem fornecer informações tanto sobre os hábitos alimentares do animal produtor quanto sobre o paleoambiente, permitindo reconstituições relacionadas a níveis tróficos, à cobertura vegetal e à distribuição geográfica no passado de todos os organismos envolvidos na interação.

Os coprólitos de herbívoros, por fornecerem recuperação de grãos de pólen, fitólitos, amido e outros materiais palinológicos, podem ser auxiliares na compreensão sobre a composição da paleoflora da região e os tipos de interação que os animais apresentavam com ela (SOUTO, 2017b). Podem fornecer inclusive elementos que não haviam sido recuperados no sedimento, sendo complementares na reconstituição do paleoambiente (SOUTO, 2017b).

Os alimentos são indispensáveis para os animais, para três principais fatores (SCHMIDT-NIELSEN, 2002):

1. Fornecimento de energia para todos os seus processos físicos, mesmo os mais básicos;
2. Permitirem o desenvolvimento e a reprodução dos organismos; e
3. Atuarem como matéria-prima de formação e manutenção dos mecanismos celulares e metabólicos.

Para esse fornecimento de energia e material estrutural, são utilizados os compostos químicos obtidos por meio da alimentação. São os processos de digestão que permitem que os alimentos sejam degradados em compostos de menor tamanho ou complexidade, ficando disponíveis para absorção e utilização pelos organismos, incluindo compostos orgânicos que estes não podem sintetizar, e necessitam adquirir por ingestão, tais como alguns aminoácidos e vitaminas (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

Os vertebrados foram ocupando diversos nichos ao longo da sua história evolutiva, propiciando uma alta diversidade de hábitos alimentares, relativos à obtenção, ingestão e digestão dos alimentos (DENTZIEN-DIAS E FRANCISCHINI, 2020).

Muitos vertebrados são herbívoros, o que traz a necessidade de lidar com a celulose, material estrutural dos vegetais, para utilizá-la como fonte energética. A celulose, um polímero formado por glicose, apresenta grandes dificuldades para ser digerida, por uma grande cadeia insolúvel e bastante resistente à ação de ataques químicos do corpo desses organismos. Diferente de muitos invertebrados, os vertebrados não produzem celulasas, enzimas que

digerem esse polímero, e por isso podem ser bastante dependentes de microrganismos simbióticos, tais como protozoários e bactérias, para esta ação (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

Há alguns grupos que apresentam especializações em seu trato digestivo, como é o caso dos mamíferos ruminantes atuais. Seu estômago possui quatro compartimentos, que vão apresentar diferentes características entre si (Figura 9). O maior deles, o rúmen, atua como um grande ambiente de fermentação, onde são encontradas inúmeras bactérias e protozoários, que degradam a celulose que chega nesse local junto com a saliva do animal, que é uma solução composta em parte por bicarbonato de sódio, e que atua como um tampão, permitindo um meio adequado para a manutenção dos microrganismos, mesmo que os produtos da fermentação sejam, em grande parte, diversos ácidos orgânicos, como ácidos butíricos, acético e propiônico. O bolo alimentar é então regurgitado, e sofre uma remastigação trabalhando novamente as substâncias fibrosas mais indigestas. Esse material é engolido novamente e volta para o rúmen, onde de novo passa por essa fermentação acentuada. Desta forma, a celulose, agora degradada, e outras partículas do alimento passam para os próximos compartimentos, onde sofrem a ação de sucos digestivos que continuam o processo de quebra desse material. Os produtos deste processo ficam disponíveis para serem absorvidos e utilizados, enquanto gases, como metano e dióxido de carbono, que podem chegar a 10% da energia do alimento digerido, são expelidos (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

No caso dos mamíferos herbívoros não-ruminantes, o auxílio dos microrganismos também é fundamental para a digestão. Além disso, os compartimentos múltiplos relacionados ao estômago também estão presentes, assim como em outros grupos com tipos de dieta semelhante, como nas preguiças. O intestino delgado também pode estar envolvido nesse processo, com a fermentação da celulose ocorrendo de forma bastante acentuada em uma das suas porções, o ceco. Entretanto, essa fermentação apresenta diferenças importantes em relação àquela que ocorre no rúmen dos ruminantes, e é por isso que a massa fecal de vacas, por exemplo, é bastante diferente daquela de não-ruminantes, como cavalos. A constante regurgitação e remastigação atuam permitindo que a fragmentação mecânica dos alimentos seja, em geral, bastante significativa, com partículas que vão se tornando cada vez menores. Além disso, os produtos da fermentação, após passarem pela última vez pelo rúmen, posteriormente ainda vão passar para o intestino grosso, onde sofrerão mais etapas da digestão antes da absorção. Desta forma, em geral, as fezes dos não-ruminantes podem apresentar fragmentos de alimentos maiores e visíveis a olho nu na sua massa fecal; enquanto a dos ruminantes pode

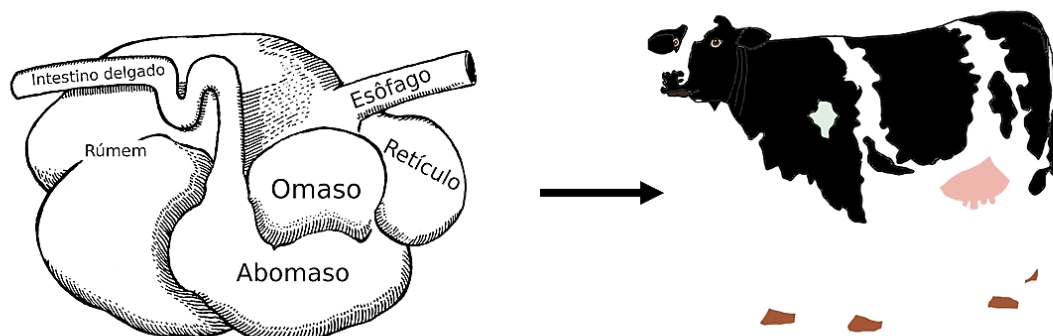
acabar por se apresentar por uma massa menos consistente, mais macerada, com fragmentos bem menores (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

Outra estratégia possível entre mamíferos não-ruminantes é a coprofagia, com a reingestão das próprias fezes. No caso dos lagomorfos, o material fermentado no ceco forma fezes mais moles, diferentes daquelas que já estão prontas para serem eliminadas. Esse material menos consistente é ingerido e não se mistura aos demais alimentos no estômago. Em vez disso, elas ficam cobertas por uma membrana e vão para o fundo do estômago, onde continuam a fermentar por algumas horas. Após finalizar as próximas etapas da digestão, finalmente são formadas as fezes comuns, em formato esférico, consistentes e mais escuras, que serão eliminadas. Em alguns marsupiais e prossímios já foram observados este mesmo tipo de comportamento, mas ainda atualmente não há estudos mais aprofundados sobre ele, demonstrando seus detalhes ou suas consequências nutricionais. Algumas espécies de aves e répteis também apresentam essa estratégia de fermentação no intestino posterior, com a atuação de microrganismos em seu intestino posterior. Entretanto, estudos deste tipo nestes grupos são ainda mais escassos (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

Sendo assim, o tipo de dieta do animal corresponde às possibilidades da fisiologia do seu aparelho digestivo, bem como os mecanismos digestivos disponíveis (tipos de enzimas presentes, microrganismos simbiotes, especializações do seu trato), para que as necessidades nutricionais e energéticas do animal possam ser supridas, permitindo sua manutenção, reprodução e desenvolvimento. Essas características podem mudar de grupo para grupo, tendo influência no produto, que são suas excretas.

O material que não pode ser digerido e absorvido, tais como fibras vegetais, microrganismos e células mortas do próprio organismo, é eliminado pelo intestino. Por conta dos pigmentos biliares que são excretados junto com este material, a cor das fezes saudáveis geralmente é marrom (SCHMIDT-NIELSEN, 1988).

Figura 9. Parte do trato digestivo de ruminantes, evidenciando compartimentos que são especializações relacionadas à digestão para o seu tipo de dieta.



Fonte: elaborado pela autora e Vasilii Piiadov, com imagens de livre utilização da internet¹.

Microrganismos podem ser encontrados nos coprólitos, o que é um resultado esperado, já que constituem de um material abundante em matéria orgânica. Dentzien-Dias e Francischini (2020) lembram que nem sempre esses microrganismos fazem parte diretamente da dieta do animal, mas sim podem ser ingeridos acidentalmente junto com o alimento ou com a água, ou podem ter contaminado as fezes após expelidas.

Por esse motivo, para evitar confundir o que passou pelo trato digestório do animal com o que ficou aderido posteriormente, após o depósito das fezes frescas no ambiente, os protocolos de análises recomendam buscar-se as porções mais internas do material, evitando contaminação com os microrganismos e elementos que se encontravam no solo e não internamente ao organismo. Entretanto, se o interesse do estudo for no paleoambiente, considerando quaisquer organismos, microrganismos, elementos e substâncias que estivessem presentes naquele momento no local, então todo o coprólito pode ser considerado essencial para as análises.

No presente trabalho, o objetivo foi analisar os coprólitos amostrados para observar se havia presença de parasitas intestinais nos organismos produtores. Os métodos utilizados foram como descritos adiante. Até o presente momento, com as análises que já foram concluídas, não foram recuperados indícios conclusivos da ação de parasitas nos vertebrados produtores das fezes, entretanto, diversos materiais palinológicos foram registrados, tais como grãos de pólen,

¹ Imagem de vaca obtida em <https://publicdomainvectors.org/pt/vetorial-gratis/Desenho-de-vaca/62941.html> e do estômago obtida em [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Abomasum_\(PSF\).png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Abomasum_(PSF).png).

fitólitos e grãos de amido, que foram devidamente registrados e armazenados para análises futuras.

3.1.1.1 OBSERVAÇÕES MACROSCÓPICAS E POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Além das amostras sedimentadas, foram fornecidos, pelo Laboratório de Paleoparasitologia da ENSP, quarenta e oito amostras de restos alimentares recuperados após a reidratação dos coprólitos da Lagoa Uri de Cima e de outros sítios estudados na Fiocruz.

Durante os anos de 2016 e 2017, a aluna de graduação em Ciências Biológicas no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar – São Carlos, Brasil, Thândara Jacob desenvolveu um Projeto de Iniciação Científica e Tecnológica, com o título “Inferências paleoambientais com base na análise da dieta macroscópica em coprólitos pleistocênicos do sítio Lagoa Uri de Cima-PE”. Realizando observações com a utilização de um microscópio estereoscópico, o objetivo principal do trabalho foi identificar os itens alimentares macroscópicos de origem vegetal e animal presentes nos coprólitos, auxiliando na identificação dos animais produtores e na compreensão dos seus hábitos alimentares.

Os dados obtidos por Thândara Jacob foram reunidos aos obtidos no presente trabalho, e descritos no manuscrito a seguir, em fase de elaboração.

FEZES FOSSILIZADAS DE MAMÍFEROS DA LAGOA URI DE CIMA
(PLEISTOCENO FINAL E HOLOCENO DO BRASIL) – CORRELAÇÃO ENTRE TIPO
DE DIETA E RECUPERAÇÃO DE INCLUSÕES E MICROINCLUSÕES

Carolina S. I. Nascimento^a, Thândara Jacob^b, Vasilii Piiadov^c, Clovis W. O. de Souza^d,
Marcia Chame^e; Marcelo A. Fernandes^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Geociências, Laboratório de Paleontologia de Vertebrados, Departamento de Paleontologia e Estratigrafia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

^c Programa Integrado de Pós-Graduação em Bioenergia, Laboratório de Biomolecular, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, Brasil

^d Laboratório de Microbiologia e Parasitologia, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil

^e Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

Nove coprólitos (fezes fossilizadas) do sítio paleontológico e arqueológico Lagoa Uri de Cima (Estado de Pernambuco, semiárido do Nordeste do Brasil) foram analisados com auxílio de microscopia óptica e microscópio estereoscópico em busca de microinclusões relacionadas a parasitoses intestinais e à dieta do vertebrado produtor. Como resultado, não foram recuperados vestígios de parasitas em nenhuma das amostras. Entretanto, pode-se observar uma diferença no padrão de recuperação de itens com possibilidade de identificação, de acordo com o tipo de dieta dos animais. Os coprólitos provenientes de vertebrados com dieta herbívora ou onívora podem revelar, não apenas macroscopicamente, mas também pela microscopia óptica, diversos itens da dieta do animal, além de possíveis ingestões acidentais (espículas de esponjas e diatomáceas). A posterior identificação de todos esses elementos pode auxiliar em inferências paleoambientais, fornecendo informações fundamentais sobre o cenário em que esses organismos ocupavam no passado. Nos animais que apresentam dieta carnívora foram

recuperados diversos fragmentos macroscópicos de ossos. Entretanto, a análise microscópica revelou apenas em algumas amostras e em baixa número outros itens que estivessem íntegros o suficiente para permitirem identificação e conseqüentemente mais informações sobre a dieta ou o paleoambiente. Desta forma, a comparação dos coprólitos analisados forneceram *insights* quanto à recuperação de microinclusões de acordo com o tipo geral de dieta do produtor do excremento, e a utilização desses itens para reconstituições paleoecológicas e paleoambientais.

KEYWORDS: Paleodieta; coprólitos; megafauna; Nordeste do Brasil

1. INTRODUÇÃO

Os organismos necessitam de alimentos por três principais razões: provisão de energia para suas atividades metabólicas, para o seu desenvolvimento e reprodução, e para síntese de substâncias relacionadas à formação e manutenção dos mecanismos celulares e metabólicos do seu corpo (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). No caso dos animais, tanto o material para essa síntese quanto a energia que necessitam são obtidos por meio da oxidação de substâncias orgânicas (RAMSAY, 1968). Análises de coprólitos (fezes fossilizadas) em busca de indícios sobre paleodieta acabam por obter informações relacionadas não apenas a inclusões alimentares, mas também informações auxiliares na reconstituição de cadeias alimentares e níveis tróficos (SOUTO, 2012). Para além disso, podem preservar inclusive elementos que não haviam sido recuperados no sedimento (SOUTO, 2017), sendo complementares na reconstituição do paleoambiente (como exemplos, ver CARRIÓN et al., 2001 e WOOD et al., 2012).

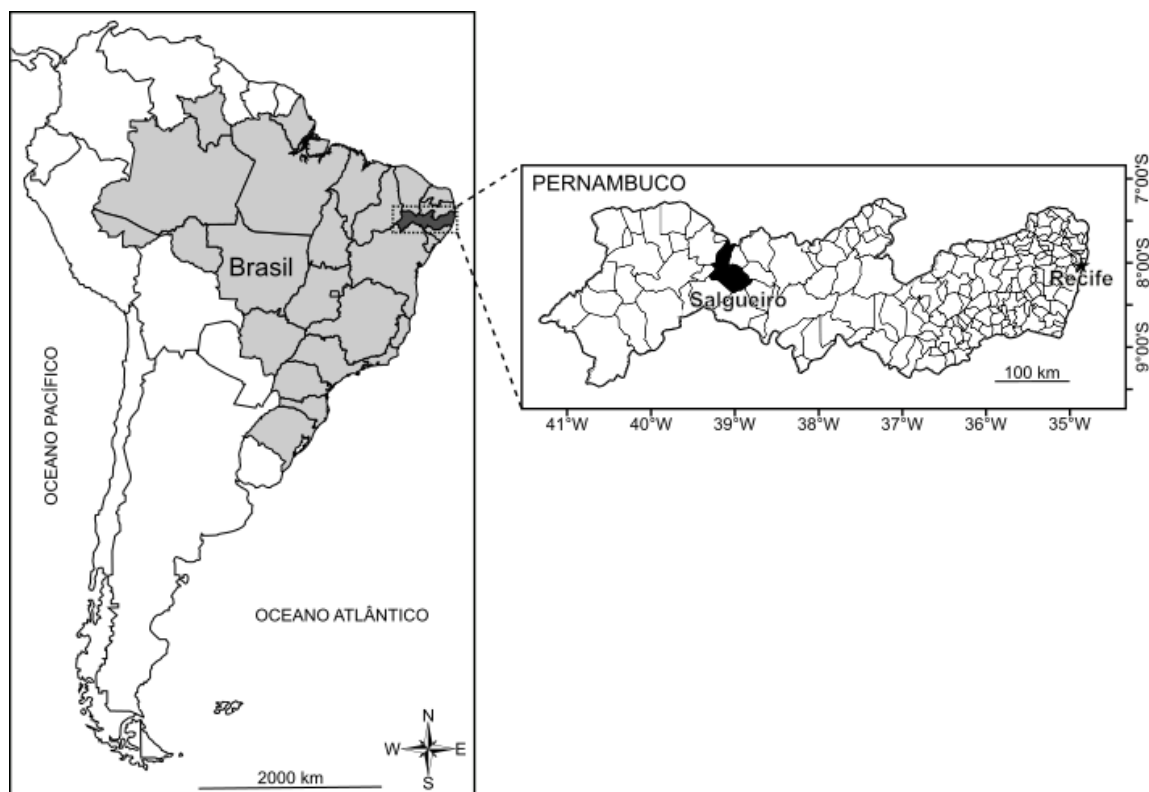
Neste trabalho foram analisadas nove fezes fossilizadas coletadas no sítio Lagoa Uri de Cima. Cinco amostras estão relacionadas a animais com dieta possivelmente onívora, três a animais com dieta carnívora, e uma amostra é possivelmente de um herbívoro. Todas foram submetidas a observação macroscópica e microscópica, e seus itens alimentares forneceram *insights* sobre as diferenças de preservação de inclusões em coprólitos de acordo com o tipo de dieta do animal produtor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Contexto Geográfico

As amostras foram coletadas no sítio Lagoa Uri de Cima, um sítio arqueológico e paleontológico situado na região do município de Salgueiro, Estado de Pernambuco (Brasil) (Figura 10). Localizado nas coordenadas $39^{\circ}10'35''\text{W}$ e $8^{\circ}04'42''\text{S}$, apresenta 199 m de comprimento, 92 m de largura e um hectare de área escavável, sendo atualmente uma lagoa efêmera, que se encontra seca a maior parte do ano (VALLI e MUTZENBERG, 2016). Situado no semiárido no Nordeste do Brasil, na região predominam maciços graníticos e *inselbergs*, com encostas acentuadas e intercaladas por solos arenosos em áreas pediplanadas e afloramentos rochosos em forma de lajedos (MÜTZENBERG et al., 2013).

Figura 10. Localização geográfica do sítio Lagoa Uri de Cima, no Estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil).



Fonte: Mapa elaborado e cedido por Jorge Felipe Moura de Jesus.

O sítio teve seus níveis de escavação datados em um trabalho prévio de Mützenberg et al. (2013) pelo método de Luminescência Opticamente Estimulada (LOE), informação que foi considerada para determinar a antiguidade dos coprólitos, de acordo com o nível estratigráfico em que foram coletados. Um total de 24 fezes fossilizadas foram coletadas, e analisadas em ambas as instituições. As análises de nove destas amostras, listadas na Tabela 2, serão discutidas aqui.

Tabela 2. Coprólitos de vertebrados do Pleistoceno e Holoceno, coletados no sítio Lagoa Uri de Cima – Pernambuco, e utilizados neste estudo.

AMOSTRA	TIPO DE DIETA	DATAÇÃO
A2654	Onívora	18.600±1470
A2667	Carnívora	18.600±1470
A2679*	Carnívora	18.600±1470
A2661	Onívora	8.800±1320
A2675	Onívora	8.800±1320
A2681*	Carnívora	8.800±1320
A2713	Onívora	8.800±1320
A2717**	Onívora	8.800±1320
A2712	Herbívora	4.600±900

* Coprólitos de mamíferos da família Felidae.

** Coprólito possivelmente humano, aguardando novas análises para confirmação.

2.2. Reidratação das amostras

Os coprólitos coletados no Uri foram enviados para o Laboratório de Paleoparasitologia da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), Fiocruz (Rio de Janeiro, Estado do Rio de Janeiro, Brasil). Neste laboratório foram fotografados, e suas características morfológicas foram utilizadas para identificar a possível origem zoológica do produtor (segundo o método de Chame, 2003). Em seguida, 5g de cada amostra foram reidratadas, de acordo com Callen e Cameron (1960), ficando em solução aquosa de fosfato trissódico (Na_3PO_4) a 0,5% por 72 horas. A amostra A2712 precisou passar por uma etapa adicional para a reidratação (modificado de Reinhard et. al., 1986), sendo adicionado ácido clorídrico 10% em pequenas quantidades, fornecendo tempos de pausa de 30 minutos, utilizando agitador magnético por 2 minutos para auxiliar na desagregação. Após passar por tamisação, o restante da amostra permaneceu no cálice, sedimentando, por no máximo duas horas, para evitar maior tempo de exposição ao ácido clorídrico. Após esse período, o conteúdo foi centrifugado por cinco minutos a 2500 rpm, para concentração dos vestígios microscópicos. O líquido sobrenadante formado foi descartado, e mais três lavagens como essa foram realizadas. Ao final da última lavagem, foi acrescentada solução de formol acético 40% para preservação da amostra. Para mais informações, ver Sianto et al. (2013).

2.3. Análise da dieta e microscopia óptica

Em uma parceria com a Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (município de São Carlos, Estado de São Paulo, Brasil), as amostras reidratadas foram cedidas ao Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP). Na mesma instituição, no Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (Departamento de Morfologia e Patologia), os reidratados foram homogeneizados com auxílio de agitador automático por 5 segundos, e em seguida preparados

para observação por microscopia óptica, em lâminas de vidro de 26 x 76 mm, que receberam cada uma 10 µL da amostra e 10 µL de uma solução de glicerol 60% e fechados com lamínulas de 22 x 22 mm. As lâminas foram observadas em microscópio óptico Nikon Eclipse e fotografadas com uma câmera Nikon DS-Fi2, utilizando o software NIS-Elements F, v. 4.0, no Laboratório de Biotecnologia de Algas (Lalgas-UFSCar). Os itens observados foram medidos utilizando o software Image J.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No sítio Lagoa Uri de Cima foram encontrados fósseis corporais e registros icnológicos de mamíferos da megafauna atualmente extintos, sendo por isso um local de importância para estudos paleontológicos da América do Sul. Possivelmente, algumas das últimas populações desses gêneros foram encontradas neste sítio, indicando indivíduos remanescentes no final do Pleistoceno (VALLI E MUTZENBERG, 2016; AZEVEDO et al., 2019). A Tabela 3 apresenta uma lista dessas espécies registradas, e que podem ser alguns dos possíveis produtores dos coprólitos deste estudo.

Tabela 3. Fósseis de mamíferos atualmente extintos da megafauna quaternária da América do Sul encontrados no sítio Lagoa Uri de Cima (Salgueiro, Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil).

ORDEM/SUPERORDEM	ESPÉCIE
Artiodactyla	<i>Paleolama niedae</i> Guérin & Faure, 1999 ¹
Litopterna	<i>Macrauchenia patachonica</i> Owen, 1840 ¹ (<i>Xenorhinotherium bahiense</i> Cartelle & Lessa, 1988)
Notoungulata	<i>Toxodon platensis</i> Owen, 1840 ^{1,3}
Perissodactyla	<i>Hippidion bonaerensis</i> Ameghino, 1907 ¹
Proboscidea	<i>Haplomastodon waringi</i> Holland, 1920 ^{1,3}
Xenarthra	<i>Eremotherium</i> sp. Spillmann, 1948 ^{1,2} <i>Pampatherium humboldti</i> Lund, 1839 ¹ <i>Glyptodon</i> sp. Owen, 1839 ¹

Fonte: Tabela elaborada com material descrito em ¹Faure e Guérin (2013), ²Valli e Mutzenberg (2016) e ³Azevedo et al. (2019).

Para reconstituir os padrões de alimentação de um animal a partir de registros fósseis, observa-se a morfologia do animal, buscando informações que permitam inferir sobre sua dieta e estratégias de obtenção dos alimentos (DENTZIEN-DIAS E FRANCISCHINI, 2020). Desta forma, características cranianas, tais como dentição, locais de inserção de músculos e como seria a sua mastigação, dentre outras observações, são importantes parâmetros indiretos. Entretanto, os coprólitos podem fornecer indicações complementares para este tipo de estudo,

fornecendo inclusive informações mais diretas sobre alguns aspectos da alimentação do animal. A recuperação de fragmentos ósseos, penas, pelos, escamas, grãos de pólen e material palinológico em geral fornece indícios importantes sobre a dieta dos animais e seus hábitos alimentares, já que nas fezes aparecerá o que foi ingerido e passou pelo trato digestivo do indivíduo.

Além dos itens alimentares, as fezes fossilizadas podem propiciar um ambiente de preservação para outros itens e organismos. Parasitas intestinais, bactérias e protozoários integrantes do sistema digestório também frequentemente são recuperados neste tipo de material. Além de insetos, larvas de nematoides e microrganismos que não estavam presentes no animal produtor, mas chegaram após a deposição das fezes frescas, e que também podem fornecer informações sobre o ambiente. Sendo assim, mesmo elementos que não haviam sido recuperados no sedimento podem ser recuperados nos coprólitos, sendo complementares na reconstituição do paleoambiente (SOUTO, 2017).

Dentre as nove amostras analisadas, pôde-se observar um padrão na recuperação das macro e microinclusões, de acordo com a dieta do animal produtor das fezes. Nas observações por microscopia óptica, A2667, A2679 e A2681, coprólitos atribuídos a produtores de dieta carnívora, apresentaram alto grau de fragmentação nas lâminas observadas, com poucos itens com possibilidade de identificação. Enquanto A2654, A2661, A2675, A2713 e A2717 apresentaram campos de observação também fragmentados, porém com diversos itens íntegros, com possibilidade de identificação, como exemplo de material palinológico (fitólitos, grãos de pólen e amido) e elementos que possivelmente podem ter sido ingeridos acidentalmente, com alimentos ou com água, tais como espículas de esponja e diatomáceas. A2712 foi a única amostra confirmada como sendo de herbívoro, e foi a que mais apresentou inclusões íntegras, com preservação de características que possivelmente permitam a sua identificação. As

diferenças nos campos de visualização pela microscopia óptica estão exemplificadas pelas Figuras 11 e 12.

Figura 11. Campo de observação padrão, demonstrando alto grau de fragmentação das inclusões, nas análises por microscopia óptica de coprólitos de vertebrados carnívoros. A e B: amostra A2681, coprólito de Felidae, datado em 8.800 ± 1320 anos A.P., em aumento de 10x.

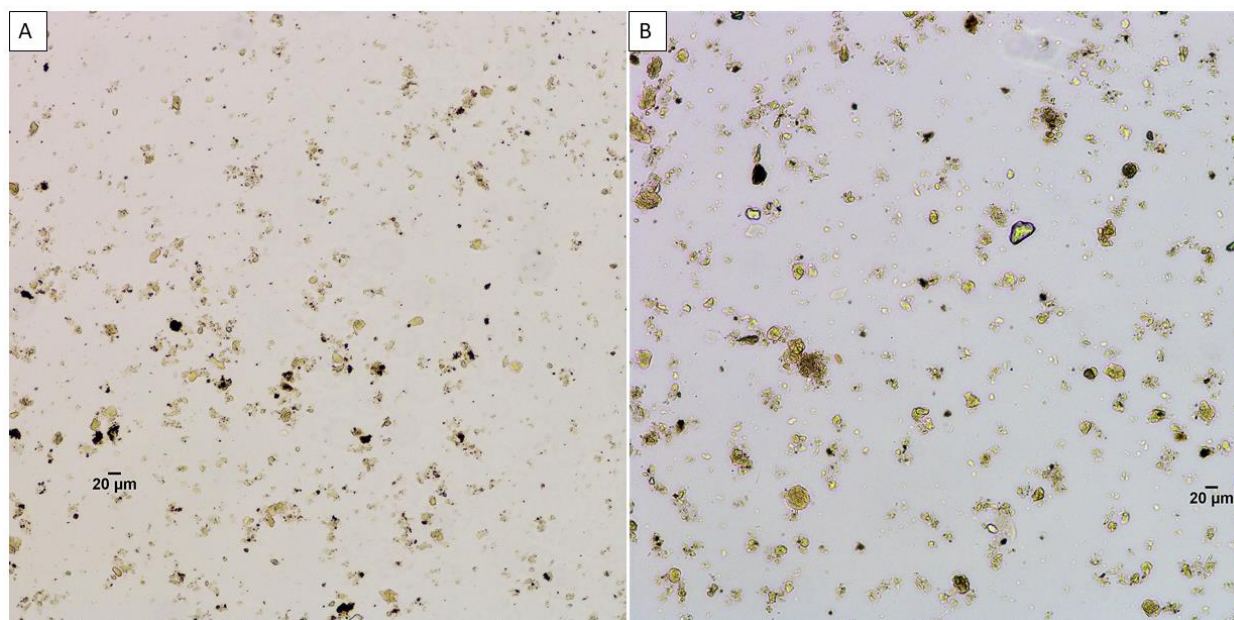


Figura 12. Itens palinológicos encontrados na amostra A2654, um coprólito de vertebrado com dieta onívora da Lagoa Uri de Cima (PE). Com este exemplo pode-se demonstrar uma observação típica nos coprólitos de onívoros, em que há alguma fragmentação das inclusões, porém há a recuperação de diversos itens bastante íntegros, mesmo nesta amostra que é uma das mais antigas entre todas as analisadas, com datação de 18.600 ± 1470 anos A.P.

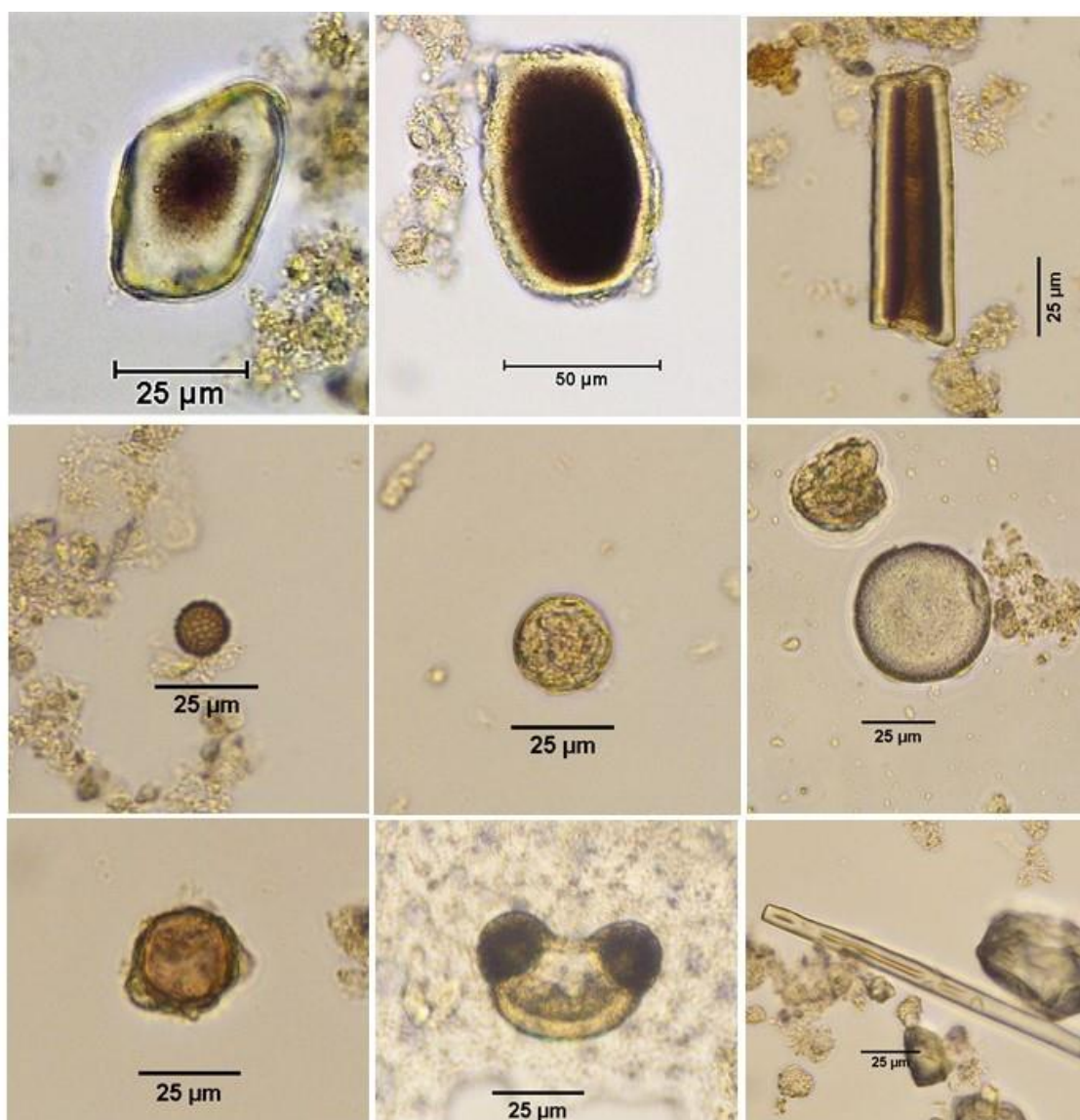


Figura 13. Fragmentos ósseos recuperados na amostra A2654. A barra corresponde a 1 cm.



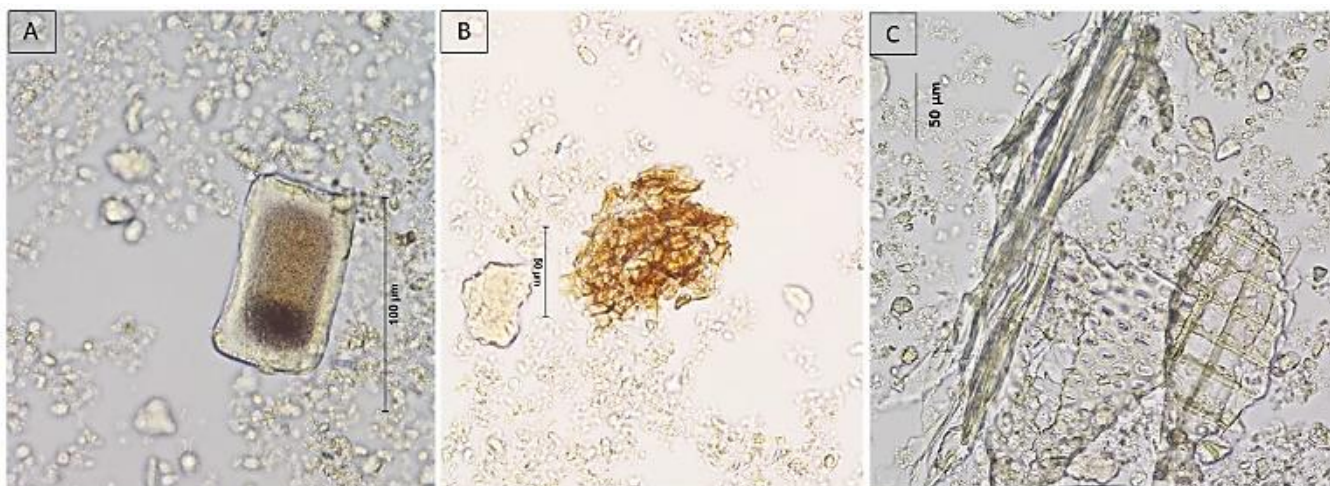
Nas análises iniciais na Fiocruz, a amostra A2667 foi atribuída a um produtor possivelmente com dieta carnívora, pelas observações referentes à sua morfologia e características macroscópicas. Nesta mesma instituição, nas análises preliminares pós-reidratação, essa suspeita foi fortalecida, assim como nas análises subsequentes na Universidade Federal de São Carlos (lupa e microscópio óptico). Os resultados indicam a possibilidade de este coprólito ter sido produzido por um animal que apresentava dieta carnívora. No caso desta amostra, além dos fragmentos ósseos observados na lupa (Figura 14), também foram recuperadas microscopicamente algumas inclusões: diatomáceas e fitólitos,

com a peculiaridade de estarem ainda articulados, apesar do alto grau de fragmentação encontrado nos campos de observação das lâminas desta amostra (Figura 15).

Figura 14. Fragmentos ósseos recuperados em A2667, coprólito de carnívoro, datado em 18.600 ± 1470 anos



Figura 15. Itens vegetais encontrados na amostra A2667, como exemplo de coprólito de vertebrado com dieta carnívora. Destaque para o fitólito com partes ainda articuladas (C).



Nos vertebrados, o trato digestivo é composto basicamente por cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino, reto e ânus, com uma preparação estrutural e funcional para digestão de grande variedade de alimentos (WITHERS, 1982). Já os detalhes fisiológicos dos processos digestivos estão relacionados à natureza química e física da dieta (MOYES E SCHULTE, 2007).

As enzimas digestivas permitem que macromoléculas complexas obtidas na dieta sejam modificadas em formas possíveis de serem absorvidas, entretanto, nem todos os itens ingeridos podem ser digeridos pelos animais (MOYES E SCHULTE, 2007). Em geral, os conjuntos de enzimas digestivas são bem conservados dentre os diversos grupos (HILDEBRAND E GOSLOW, 2006), porém, considerando a significativa diversidade de tipos de alimentação dos vertebrados, há algumas variações consideráveis (MOYES E SCHULTE, 2007). Há uma correlação entre o conteúdo enzimático encontrado em seu suco digestivo e o tipo de alimento consumido (RAMSAY, 1968). Assim, as enzimas proteolíticas extracelulares dos carnívoros são mais fortes do que as enzimas correspondentes dos herbívoros (RAMSAY, 1968). Por exemplo, em poucas horas após a ingestão de alimento, os carnívoros já conseguem degradar as proteínas ingeridas e oxidar os aminoácidos provenientes, obtendo 90% das suas necessidades energéticas, enquanto os herbívoros pouco conseguem obter energia de fontes proteicas (NELSON E COX, 2014).

Nos grupos que se alimentam de substâncias menos comuns, colônias de microrganismos, geralmente bactérias e fungos, podem viver como enterossimbiontes, permitindo que os animais realizem sua digestão (MOYES E SCHULTE, 2007). É o exemplo da associação entre algumas espécies de animais marinhos e determinadas bactérias, que permite que eles consigam digerir o exoesqueleto de quitina de organismos planctônicos.

Mamíferos ruminantes e outros animais pseudo ruminantes atuais apresentam a dificuldade de digerir o material vegetal – formado por polímeros complexos, tais como hemicelulose e lignina - que consomem em grandes quantidades diárias, já que vertebrados não produzem celulase (HILDEBRAND E GOSLOW, 2006). Por isso, além de regurgitarem o alimento para passarem novamente pelo processo de decomposição mecânica, esses animais podem apresentar especializações no seu trato gastrointestinal, abrigando bactérias que auxiliam na digestão química (RAMSAY, 1968; MOYES E SCHULTE, 2007). Eles possuem também um estômago digástrico, o que aumenta a sua eficiência.

A depender da dieta, a estrutura do estômago do animal pode ter significativas modificações (HILDEBRAND E GOSLOW, 2006). Geralmente, as fortes contrações rítmicas dos músculos do estômago, junto com ação do HCl e das enzimas proteolíticas liberadas por esse órgão, têm ação de triturar o alimento consumido, quebrando-o e até pulverizando-o (WITHERS, 1982). Entretanto, nos herbívoros, essas contrações não são tão poderosas a ponto de ter efeito de trituração tão efetiva (WITHERS, 1982). Parte dessa ação nos mamíferos herbívoros é realizada pelos dentes molares com adaptações morfológicas e estruturais que permitem trituração do material vegetal rígido (RAMSAY, 1968). Além disso, a estrutura do estômago do animal pode ter significativas modificações, chegando a ser tão complexo quanto o estômago digástrico de ruminantes (RAMSAY, 1968; WITHERS, 1982).

O comprimento do intestino também está relacionado ao tipo de alimentação. Em carnívoros, normalmente ele é mais curto e simples do que nos herbívoros, em que apresentam regiões de armazenamento e fermentativas (WITHERS, 1982). As proporções entre o estômago e o intestino grosso, em relação ao intestino delgado, caracterizam o coeficiente intestinal (do inglês “coefficient of gut differentiation”, COD), que também é diferente de acordo com o tipo de dieta do animal (WITHERS, 1982). Em carnívoros, essa taxa é de 0.1 a 0.4, enquanto em herbívoros é entre 2 e 6, ou seja, o intestino delgado é bem menor proporcionalmente do que em carnívoros (WITHERS, 1982). O intestino de animais piscívoros, necrófagos e carnívoros tende a ser mais curto, porém isso é compensado sendo mais distensível, permitindo a ingestão de grandes presas inteiras, se necessário, e uma estocagem temporária para posterior digestão de todo esse volume de alimento (HILDEBRAND E GOSLOW, 2006). Penas, pelos e escamas são evitados por alguns animais, mas quando ingeridos podem chegar ao intestino e serem excretados ou podem até mesmo ser digeridos (HILDEBRAND E GOSLOW, 2006). Nesses grupos com dieta essencialmente faunívora, as células gastrodérmicas do intestino secretam enzimas proteolíticas fortes, que conseguem decompor mais facilmente o tecido animal consumido (RAMSAY, 1968). Por esse motivo alguns predadores conseguem digerir a sua presa sem que seja imprescindível um acentuado esforço inicial de mastigação (RAMSAY, 1968), mesmo no caso de alguns carnívoros que apresentam o hábito de engolir a sua presa inteira (SCHMIDT-NIELSEN, 2002).

No caso dos onívoros (como humanos), as características do intestino são variáveis dentre os grupos, mas em geral é um pouco mais longo do que os faunívoros, e com maior

diferenciação entre suas diferentes porções (HILDEBRAND E GOSLOW, 2006), porém a digestão dos alimentos vegetais consumidos costuma ser mais lenta do que a dos alimentos de origem animal (HILDEBRAND E GOSLOW, 2006).

Apesar de serem conhecidos essas características mais gerais da digestão dos alimentos pelos vertebrados, muitos detalhes, especialmente bioquímicos, ainda precisam ser melhor estudados. Para ilustrar essa falta de informações em relação a certas especificidades, Nelson e Cox (2014) citam que mesmo a síntese de proteínas, um dos mais complexos mecanismos de biossíntese, é melhor compreendida do que a sua degradação.

No debate sobre o porquê de aparentemente os registros de coprólitos de carnívoros serem mais abundantes do que de herbívoros, Chin (2002) apontou a possibilidade de ser por conta da alimentação composta por carne e ossos, contendo componentes químicos (cálcio e fósforo) que precipitam, sob condições tafonômicas particulares, como fosfatos permineralizantes. Apontando, desta forma, que além do tipo de ambiente deposicional, o tipo de dieta também determinaria a preservação e disponibilidade das amostras fecais fossilizadas.

Sendo assim, conhecer melhor as características da alimentação e digestão dos animais atuais pode nos auxiliar a compreender os processos envolvidos na digestão de grupos de vertebrados antigos, bem como detalhes da preservação dos seus dejetos fossilizados.

Nas amostras analisadas foram encontradas também diatomáceas, espículas de esponjas (Porifera) e fungos. As diatomáceas e as espículas podem ter sido ingeridas acidentalmente, já que esses organismos muitas vezes se encontram aderidos à macrófitas aquáticas ingeridas pelos animais (MACHADO et al., 2016). A ingestão acidental também pode ter ocorrido ao ingerir a água da lagoa ou de outro corpo d'água próximo, já que, em certos casos, as espículas, que costumam ficar aderidas ao fundo dos lagos, podem acabar em suspensão (VOLKMER-RIBEIRO E BATISTA, 2007) e serem obtidas junto com a água ingerida.

Os fungos ocorrem também em maior quantidade nos coprólitos dos herbívoros, o que pode ser explicado pelo fato de as fezes desses animais apresentarem maior quantidade de matéria orgânica disponível, inclusive pela dificuldade de digerir parte do alimento ingerido. Essa matéria orgânica abundante atrai organismos necrófagos e detritívoros, como por exemplo fungos que se encontravam presentes no ambiente onde o animal circulava naquele momento.

Desta forma, os coprólitos de herbívoros podem fornecer diversas informações relacionadas ao paleoambiente. Os itens vegetais provenientes da dieta do animal, ao serem identificados, podem contribuir com informações sobre a flora da região e no entorno do sítio, por onde os animais circulavam. Diatomáceas e espículas de esponjas igualmente podem fornecer indicações paleolimnológicas, traçando um perfil dos corpos d'água da região, com características como temperatura da água, pH, níveis de oxigenação e grau de energia. Fungos e os demais microrganismos indicam sobre a comunidade detritívora.

Adicionalmente, ao se combinar as presentes análises dos coprólitos com os estudos de outros materiais retirados de diferentes níveis do sítio, podemos ter indicações sobre as alterações no paleoambiente ao longo do tempo.

REFERÊNCIAS

Azevedo, R.L., Asfora, V.K., Mützenber, D.S., Cisneiros, D., Sullasi, H.L., Kinoshita, A.M., Guzzo, P.L., Skinner, A.R., Baffa, O., Pessis, A.M., Khoury, H.J. 2019. ESR dating of megafauna enamel teeth from Lagoa Uri de Cima Archaeological Site (Pernambuco, Northeastern Brazil). *Quat. Int.* 1–11.

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

Cartelle, C. 1999. Pleistocene mammals of the Cerrado and Caatinga of Brazil. In: Eisenberg, J.F., Redford, K.H. (eds.). *Mammals of the Neotropics*. The University of Chicago Press, 27-46.

Carrión, J.; Riquelme, J.; Navarro, C.; Munuera, M. 2001. Pollen in hyaena coprolites reflects late glacial landscape in southern Spain. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 176(1-4), 193–205. doi:10.1016/s0031-0182(01)0033

Chame, M. 2003. Terrestrial Mammal feces: a morphometric summary and description. *Mem. do Inst. Oswaldo Cruz* 98 (Suppl. I): 71-94.

Chin, K., 2002. Analyses of coprolites produced by carnivorous vertebrates. *Paleontol. Soc. Pap.*, 8: 43–50.

Dantas, M.A.T., 2012. Contribuição ao conhecimento da megafauna pleistocênica da região intertropical brasileira. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte/MG.

Faure, M., Guérin, C., 2013. Les grands mammifères du Pléistocène Supérieur de la Lagoa Uri de Cima. FUMDHAMentos 10: 161–188.

Grund, B.S., Surovell, T.A., Lyons, K., 2012. Range sizes and shifts of North American Pleistocene mammals are not consistent with a climatic explanation for extinction. *World Archaeol.*, 44: 43-55.

Hildebrand, M., Goslow Jr., G.E., 2006. *Analysis of Vertebrate Structure*. John Wiley & Sons, New York.

Machado, V.S., Volkmer-Ribeiro, C., Iannuzzi, R., 2016. Investigation of freshwater sponges spicules deposits in a karstic lake in Brazil. *Braz. J. Biol.* 76: 36–44.

Martin, G., Pessis, A.M., 2013. Breve panorama da pré-história do Vale do São Francisco no Nordeste do Brasil. FUMDHAMentos 10: 9-29.

Mützenberg, D., Corrêa, A.C.B., Cisneiros, D., Vida, I.A., Felice, G.D., Silva, D.G., Khoury, H., Libonati, R. 2013. Sítio Arqueológico Lagoa Uri De Cima: cronoestratigrafia de eventos paleoambientais no semiárido nordestino. FUMDHAMentos 10: 50-67.

Nelson, D.L., Cox, M.M. 2014. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 1250p.

Ramsay, J.A. *Introdução à Fisiologia Animal*, São Paulo, Editora Polígono, 1973.

Reinhard, K.J., Confalonieri, U., Herrmann, B., Ferreira, L.F., Araújo, A., 1986. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. *Homo* 37: 217-239.

Sianto, L., Oliveira-Santos, J.D., Magalhães, J.G., Teixeira-Santos, I., Silva, L.H.S., Saldanha, B.M., Klein, E., Silva, P.A., Chame, M., 2013. Coprólitos, sedimentos e fezes de animais do Sítio arqueológico Lagoa Uri de Cima: Análise preliminar. FUMDHAMentos 10: 130-147.

Souto, P.R.F. 2012. *The Brazilian Coprolites: a journey in unexpected past*. Rio de Janeiro: Publit. 104p.

Souto, P.R.F. 2017. Coprólitos. In: SOUTO, P.R.F. Icnologia de paleovertebrados. Rio de Janeiro: Letra Capital, p. 57-92.

Wood, J.R., Wilmshurst, J.M., Wagstaff, S.J., Worthy, T.H., Rawlence, N.J., Cooper, A. 2012. High-Resolution Coproecology: using coprolites to reconstruct the habits and habitats of New Zealand's extinct upland Moa (*Megalapteryx didinus*). PLoS ONE 7(6): e40025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040025>

Valli, A.M.F., Mutzenberg, D., 2016. Remarks on the spatial arrangement of giant sloth fossil remains (genus *Eremotherium*) at Lagoa Uri de Cima, Pernambuco, Brazil. Rev. Bras. Paleontol. 19, 505–526. <https://doi.org/10.4072/rbp.2016.3.14>

INCLUSÕES DE NEMATOIDES

Por serem constituídos em sua maior parte por matéria orgânica, os excrementos, ao serem expelidos e passarem para o meio externo ao corpo do animal, podem sofrer a ação de diversos organismos coprófagos, que vão digerir essa matéria orgânica (SOUTO, 2017b). São insetos e suas larvas, nematoides, bactérias e fungos. Sua ação pode acabar por desagregar a massa fecal, que acaba incorporada ao sedimento (SOUTO, 2017b). Entretanto, sob certas condições, essa degradação pode ser interrompida, permitindo a preservação das fezes e posterior fossilização.

De acordo com Souto (2017b), o processo tafonômico dos coprólitos pode ser dividido em três estágios:

- 1º) da excreção ao soterramento;
- 2º) processos de alterações físicas e diagenéticas;
- 3º) a partir da sua exposição e da coleta.

No primeiro estágio, quando as fezes frescas são depositadas no sedimento, elas podem ter aderência de estruturas externas, tais como folhas e escamas (SOUTO, 2017b). Ainda com essa consistência fresca, pode também ocorrer entrada de organismos coprófagos, que vão se alimentar dos restos orgânicos dentro das fezes, são exemplos de besouros, fungos e nematoides. A diferenciação do que estava presente no trato digestivo do animal – e foi eliminado junto com as suas fezes – e dos organismos que chegaram depois, atraídos pela matéria orgânica fresca, muitas vezes é um trabalho complexo. Se houver possibilidade de identificação de tais organismos, pode-se observar os seus hábitos atuais, se são decompositores ou estão presentes no trato intestinal dos animais, como parasitas, por exemplo, e traçar inferências sobre as relações no passado entre os indivíduos envolvidos. Entretanto, quando há degradação e perda de partes essenciais para identificação dessas inclusões, outros aspectos devem ser observados para tentar compreender em que momento se iniciou a interação do organismo, se foi com o produtor do coprólito ou diretamente com as fezes, quando ainda frescas, pós-deposição no ambiente. Uma das observações é se há marcas de entrada desses organismos nas fezes, tais como perfurações, escavações e formação de túneis. Caso não haja este tipo de indício, e não seja possível a identificação do produtor utilizando características

específicas de sua morfologia, fica prejudicada a tentativa de estabelecer o tipo de relação entre os organismos.

Ainda assim, o registro dessas inclusões pode ser bastante informativo. O manuscrito seguinte registra o encontro de larvas de nematódeos em dois dos coprólitos analisados: amostra A2712 (coprólito de um possível herbívoro, datado em 4.600 ± 900 anos AP) e A2703 (coprólito de possível carnívoro, datado em 8.800 ± 1320 anos AP).

Registro de formas larvais de nematódeos em coprólitos de vertebrados do Quaternário

Carolina S. I. Nascimento^{1/*} Clovis W. O. de Souza², Marcia Chame³; Marcelo A. Fernandes⁴

¹Laboratório de Paleoeologia e Paleoicnologia, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos. * carolina.staisabel@gmail.com

²Laboratório de Microbiologia e Parasitologia, Departamento de Morfologia e Patologia. Universidade Federal de São Carlos

³Laboratório de Paleoparasitologia, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fiocruz

⁴Laboratório de Paleoeologia e Paleoicnologia, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos.

RESUMO

A recuperação de formas larvais de nematódeos em coprólitos (fezes fossilizadas) é menos comum do que a recuperação dos ovos desses organismos. Por esse motivo, trata-se de um estágio da sua vida que é sub-representado em material antigo. Até mesmo pela raridade, é importante que esses encontros sejam registrados, já que, mesmo naqueles casos em que a identificação da larva não é possível, ela pode indicar características paleoambientais, como temperatura e umidade, informações sobre processos tafonômicos e sobre quais organismos circulavam no ambiente quando as fezes foram depositadas. Para este trabalho, foram considerados coprólitos de sítios paleontológicos do Quaternário (Pleistoceno Final e Holoceno), por meio de uma revisão de literatura, além da análise de duas amostras referentes ao Nordeste do Brasil, do sítio Lagoa Uri de Cima, Estado de Pernambuco.

INTRODUÇÃO

Os nematoides são vermes, em sua maioria de formato filiforme, que apresentam variedade de tamanho, de tipos de vida e de habitats (COSTA, 2005). É estimado que existam cerca de 500 mil espécies destes organismos, a maioria de vida livre. Entretanto, as espécies parasitas são encontradas em todos os grupos de plantas e de animais, sendo cerca de 80 mil diferentes tipos apenas para vertebrados (REY, 2008).

Coprólitos (fezes fossilizadas) são um ambiente específico que pode permitir uma preservação excepcional de itens alimentares consumidos pelos animais (ROBIN et al., 2016). Após os processos de digestão, os restos não-digeridos ficam encapsulados no material fecal, protegidos da ação da luz solar direta e das flutuações externas de umidade e temperatura (SCOTT et al., 2003). Características tafonômicas, como diagênese e mineralização, podem acarretar perda de informações, dificultando o estudo dos coprólitos (ROBIN et al., 2016). Entretanto, em algumas condições específicas de preservação (por exemplo, dessecação), até mesmo tecidos moles dos organismos podem ser preservados (ROBIN et al., 2016).

Essa mesma proteção pode ocorrer com parasitas intestinais que sejam eliminados junto com as fezes – protozoários e helmintos podem ser recuperados de coprólitos fornecendo informações sobre doenças do passado. Embora sejam encontrados com mais frequência ovos de helmintos, outras estruturas também podem ser encontradas mais raramente, como cistos de protozoários e até mesmo fases larvais de parasitas. O que explicaria a preservação de tecidos moles de organismos como larvas de nematódeos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 4 apresenta os poucos trabalhos em que foram registradas larvas de Nematoda em coprólitos humanos e de outros animais em diversos sítios datados do Quaternário.

Tabela 4. Larvas de Nematoda encontradas em coprólitos de animais humanos e não-humanos, provenientes de sítios paleontológicos do Quaternário ao redor do mundo.

Sítio/Localidade	Hospedeiro	Datação do coprólito	Tipo de reidratação da amostra	Tipo de material recuperado	Referência
Diversos sítios em Wetherill Mesa,	<i>Homo sapiens</i> (Mammalia, Primates)		Solução alcalina quelante	Ovos de helmintos, larvas	Samuels, 1965

Sítio/Localidade	Hospedeiro	Datação do coprólito	Tipo de reidratação da amostra	Tipo de material recuperado	Referência
Montezuma, Colorado, EUA			adaptada, por 24 a 72 horas		
Lovelock Cave, Churchill, Nevada, EUA	<i>Homo sapiens</i> (Mammalia, Primates)	Cerca de 2000 anos AP	Callen e Cameron (1960)	Ovos de helmintos, larvas	Dunn & Watkins, 1970
Gruta do Gentio II, Unaí, Minas Gerais, Brasil	<i>Homo sapiens</i> (Mammalia, Primates)	Entre 360 e 3610 anos AP	Callen e Cameron (1960), por 72 horas	Ovos de helmintos, larvas	Ferreira et al., 1980
Big Bone Cave, Van Buren, Tennessee, EUA	<i>Homo sapiens</i> (Mammalia, Primates)	2177±145 anos AP	Callen & Cameron (1955)	Ovos de helmintos, larvas	Faulkner et al., 1989
Diversos sítios, São Raimundo Nonato, Piauí, Brasil	<i>Kerodon rupestris</i> (Mammalia, Rodentia)	Entre 2000 e 8000 anos AP	Callen e Cameron (1960), por 72 horas	Ovos de helmintos, larvas	Araújo et al., 1989
Diversos sítios, Itália Central	Hyaenidae (Mammalia, Carnivora)	1,5 milhão de anos AP e 65000 a 30000 anos AP	Jones (1983) e Reinhard et al. (1988)	Larvas	Ferreira et al., 1993
Cerro Casa de Piedra, Santa Cruz, Patagônia, Argentina	<i>Homo sapiens</i> (Mammalia, Primates) ou Canidae (Mammalia, Carnivora)	8920±200 anos AP	Callen e Cameron (1960), por 7 dias	Ovos de helmintos, larvas	Fugassa et al., 2010
Toca do Morcego, Serra da Capivara, Piauí, Nordeste do Brasil*	Felidae (Mammalia, Carnivora)	2840±100 anos AP	Adaptação de Callen e Cameron (1960), por 72h	Ovos de helmintos e larvas	Sianto et al., 2016

* Neste caso, trata-se de um sítio em um abrigo sob rocha, um ambiente que em geral proporciona boa preservação.

Neste trabalho também fornecemos uma contribuição com o registro de larvas encontradas em duas amostras:

- a) A2712, coprólito de herbívoro, datado em 4.600 ± 900 anos AP;
- b) A2703, coprólito de possível carnívoro, datado em 8.800 ± 1320 anos AP.

Em cada uma das amostras foi encontrada uma larva de nematódeo. Na amostra A2703, a larva (Figuras 16A e 16B) apresenta uma das extremidades arredondada, enquanto a outra extremidade se apresenta disforme, possivelmente uma deformação causada por alguma deterioração. Seu conteúdo interno está bastante degradado, não sendo possível diferenciar órgãos ou estruturas internas.

Figura 16. Larva de nematoide recuperada em coprólito de possível carnívoro, observada por meio de microscopia óptica. A: microscopia de campo claro (200x); B: observação com contraste de fase, evidenciando o conteúdo interno bastante degradado. As barras equivalem a $25\ \mu\text{m}$.



Em A2712 foi possível observar conteúdo interno, com preservação de parte dos órgãos, da porção final, arredondada (Figura 17) e da porção anterior, com visualização da boca (Figuras 18A, 18B e 18C). Entretanto, também não foi possível identificar esta larva, neste caso porque as estruturas observadas são mais gerais, sem características específicas que indicassem uma possível classificação taxonômica.

Figura 17. Larva de nematoide encontrada na amostra A2712, coprólito de possível herbívoro, observada com a utilização de microscopia óptica. A seta vermelha evidencia a região bucal da larva. Barra equivalente a 50 μm .

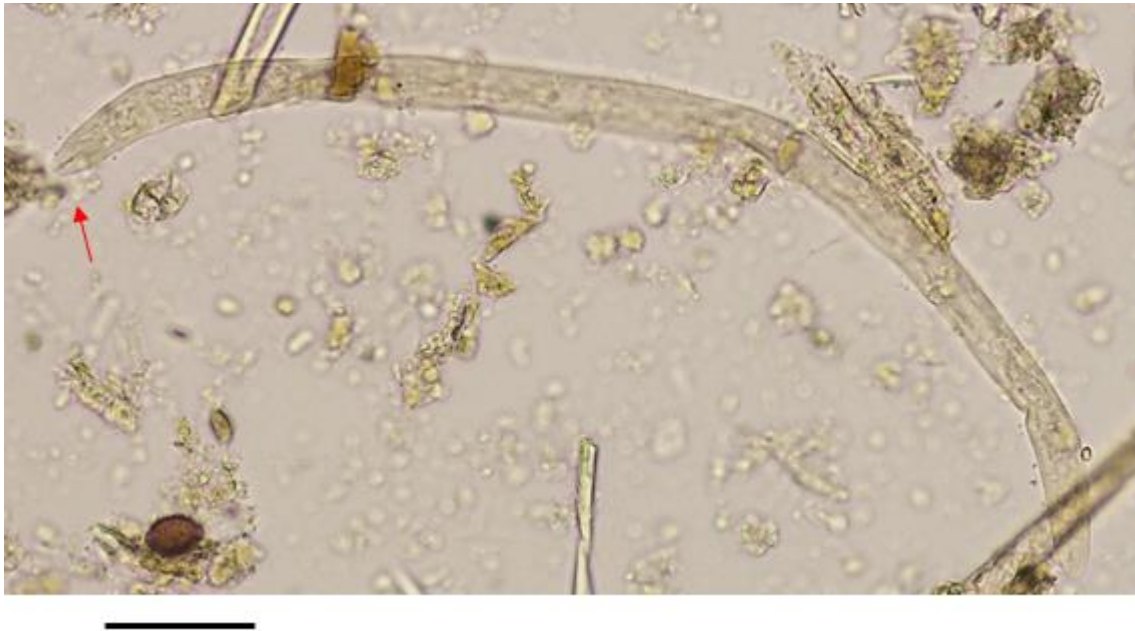
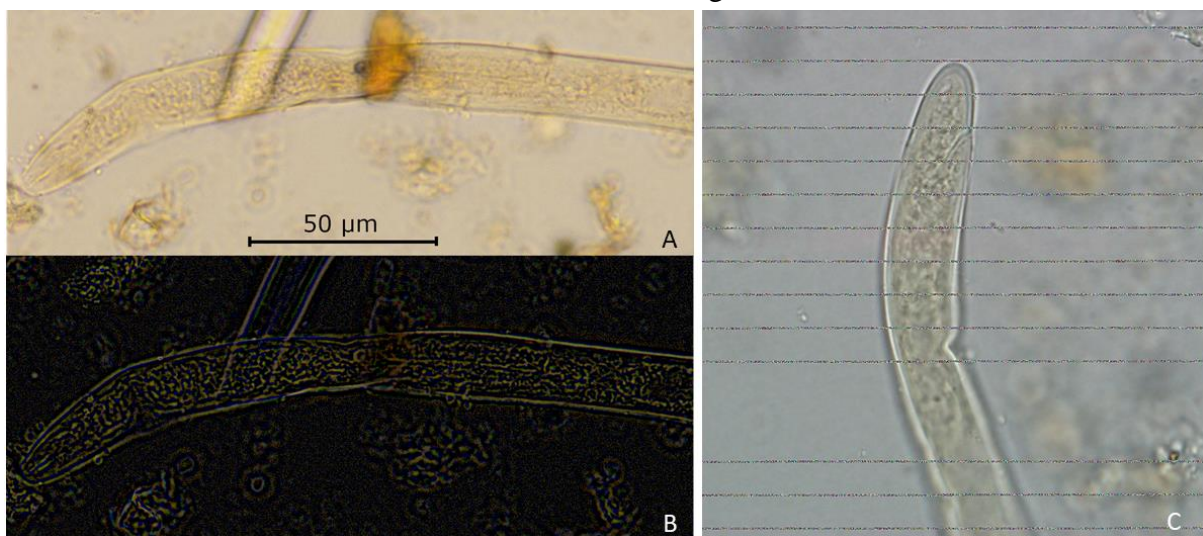


Figura 18. Detalhes da larva de nematoide encontrada em A2712. A: microscopia de campo claro (200x); B: observação com contraste de fase, evidenciando o conteúdo interno; C: detalhes da extremidade anterior, onde se encontra a região bucal da larva.



Quando não são encontrados outros estágios de desenvolvimento do helminto, só é possível a identificação das larvas nos casos em que elas apresentam características bastante específicas e diagnósticas. Ainda assim, é necessário considerar a diversidade encontrada nesse grupo de organismos. Apenas para mamíferos atuais do Brasil, por exemplo, há uma diversidade registrada de parasitos nematoides de cerca de 500 espécies, incluídos em 160 gêneros e 45 famílias (VICENTE et al., 1997). Se considerarmos material antigo, que pode inclusive apresentar espécies extintas, esse número e sua diversidade podem ser ainda maiores. Alguns nematoides apresentam larvas com morfologia bastante específica. Ainda assim, em diagnóstico de amostras atuais, além da fase larval sempre há tentativa de obtenção de ovos em amostras do hospedeiro ou outro tipo de diagnóstico auxiliar (imunofluorescência etc.). Entretanto, a dificuldade em amostras fossilizadas, como coprólitos, é que geralmente estas técnicas apresentam diversas limitações, não podendo ser utilizadas.

Ainda assim, a importância do registro é evitar a sub-representação, ignorando a presença de nematoides habitando os animais e circulando no ambiente no passado. Inclusive porque esses organismos dificilmente são encontrados por meio de análises em outro tipo de material, como fósseis corporais dos hospedeiros ou análise do sedimento ao seu redor. Uma das possibilidades da recuperação desses organismos nos coprólitos pode ser o fato de eles estarem presentes em alta quantidade, a ponto de, ainda que quase todos os indivíduos tenham sido perdidos nos processos tafonômicos, ainda assim alguns conseguiram ser preservados na amostra – uma questão estatística, portanto.

Outra dificuldade é na definição da origem da larva, identificando se é de fato um parasita ou um organismo de vida livre. Há também a possibilidade de serem encontradas formas parasitas de vegetais, ingeridas durante a alimentação do animal produtor do excremento (SAMUELS, 1965; DUNN E WATKINS, 1970). Para os casos dos parasitas, sua presença pode fornecer indicações sobre o ambiente onde as fezes foram depositadas. Trabalhos experimentais com nematoides estrogilídeos demonstraram que larvas infectantes de alguns grupos exigem condições climáticas específicas, em especial determinadas faixas de temperatura e umidade do ar e do solo para iniciar a migração do material fecal para o ambiente externo (por exemplo, FINCHER E STEWART, 1979; STROMBERG, 1997; COUTO et al., 2009). A umidade influencia no movimento e na motilidade das larvas (STROMBERG, 1997) e algumas delas chegam a utilizar a chuva como veículo de dispersão para a vegetação ou para o solo (COUTO et al., 2009). As fezes podem servir como reservatórios das larvas parasitas

(FINCHER E STEWART, 1979) durante períodos secos, que se abrigam nesse microambiente até que as condições externas sejam favoráveis (COUTO et al., 2009). À medida que o material fecal seca, as larvas podem acabar por dessecar e morrer (STROMBERG, 1997). A presença de uma larva infectante em coprólito preservado por dessecação pode indicar que, quando as fezes foram depositadas, o ambiente externo poderia não estar favorável para o seu desenvolvimento e migração. E à medida em que houve perda de umidade pelo bolo fecal, as larvas podem ter passado também por dessecação e terem morrido, sem oportunidade de sair do material.

A larva pode ser de um nematódeo necrófago, fazendo parte do chamado necrobioma (como definido por BENBOW, 2016), sendo nesse caso importante para entender o processo de decomposição do material.

Em geral, para recuperação de ovos de parasitos, é necessário um esforço de observação em microscopia óptica de dezenas a centenas de lâminas para cada amostra (exemplo de 550 lâminas em HUGOT et al., 2014). Entretanto, quando há o encontro das formas larvais, frequentemente essa recuperação ocorre já na preparação das primeiras lâminas para observação.

Além da antiguidade do material, é provável que os métodos de preparação das amostras também sejam um fator de grande influência para que haja recuperação de larvas. Métodos de reidratação devem levar em consideração o cuidado com itens recuperáveis que tenham maior comprimento do que a maioria dos ovos de helmintos ou que apresentem maior fragilidade a algumas etapas dos processos de reidratação, evitando que sejam fragmentados ou até perdidos. Em especial, nas etapas em que há utilização de ácidos, nos casos em que há dificuldade de dissolução da amostra, deve haver ajuste dos protocolos de acordo com as características do material, para que tenham o menor efeito destrutivo possível, começando com concentrações do HCl em valores abaixo de 5%, e aumentando gradativamente (o que em muitos protocolos já é previsto) até o mínimo necessário para desagregação da amostra ao ponto que seja possível a sua preparação posterior em lâminas para microscopia. Por fim, a centrifugação deve apresentar um valor máximo de 2000 rpm, para diminuir a quebra de estruturas mais frágeis ou mais longas, na tentativa de aumentar as chances de recuperação de itens como larvas.

CONCLUSÕES

O encontro de formas larvais em fezes fossilizadas ainda é raro, e embora a identificação seja dificultada nos casos em que não há preservação de características morfológicas diagnósticas, o registro desses organismos é importante para diminuir efeitos de sua sub-representação. Alterações em protocolos de reidratação e preparação das amostras podem ser uma boa tentativa para auxiliar na recuperação de maior número de estruturas frágeis, incluindo larvas.

REFERÊNCIAS

Almeida, L.R.; Castro, A.A.; Silva, F.J.M.; Fonseca, A.H. 2005. Desenvolvimento, sobrevivência e distribuição de larvas infectantes de nematóides gastrintestinais de ruminantes na estação seca da baixada fluminense, RJ. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 14 (3): 89-94.

Araújo, A.; Ferreira, L.F.; Confalonieri, U.; Chame, M.; Ribeiro, B. 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.

Callen E.O. & Cameron T.W.M. 1960. A prehistoric diet as revealed in coprolites. *New Scientist.*, 8: 35-40.

Chame M. 2003. Terrestrial Mammal Feces: a Morphometric Summary and Description. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 98 (Suppl. I): 71-94.

Costa, H.M.A. 2005. In: Neves, D. P. (Ed.) *Parasitologia Humana*. 11 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 185-192.

Couto, M.C.M.; Quinelato, S.; Souza, T.M.; Santos, C.N.; Bevilaqua, C.M.L; Anjos, G.H.S; Sampaio, I.B.M; Rodrigues, M.L.A. 2009. Desenvolvimento e migração de larvas infectantes de ciatostomíneos (Nematoda: Cyathostominae) em gramínea coast cross (*Cynodon dactylon*) em clima tropical, na Baixada Fluminense, RJ, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, (18) 2: 31-37.

Faulkner, C.T.; Patton, S.; Johnson, S.S. 1989. Prehistoric Parasitism in Tennessee: Evidence from the Analysis of Desiccated Fecal Material Collected from Big Bone Cave, Van Buren County, Tennessee. *The Journal of Parasitology*, (75) 3: 461-463.

Faure M., Guérin C. 2013. Les grands mammifères du Pléistocène Supérieur de la Lagoa Uri de Cima. *FUMDHAMENTOS* (1) 10: 161 – 188.

Ferreira L.F., Araújo A.J.G. & Confalonieri U.E.C. 1980. The finding of eggs and larvae of parasitic helminths in archaeological material from Unai, Minas Gerais, Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (74) 6.

Ferreira L.F., Araújo A. & Duarte A.N. 1993. Nematode Larvae in Fossilized Animal Coprolites from Lower and Middle Pleistocene Sites, Central Italy. *J. Parasitol*, 79(3): 440-442.

Fugassa M.H., Beltrame M.O., Sardella N.H., Civalero M.T. & Aschero C. 2010. Paleoparasitological results from coprolites dated at the Pleistocene–Holocene transition as source of paleoecological evidence in Patagonia. *J. Archaeol. Sci.* 37: 880–884.

Hugot J.P., Gardner S.L., Borba V., Araujo P., Leles D., Da-Rosa A.A.S, Dutra J., Ferreira L.F. & Araújo A. 2014. Discovery of a 240 million years old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates. *Parasitology Vectors* 7: 1.

Pettrigh RS, Martínez JG, Mondini M, Fugassa MH (2019). Ancient parasitic DNA reveals *Toxascaris leonina* presence in Final Pleistocene of South America. *Parasitology* 146, 1284–1288.

Rey, Luís. 2008. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed.

Robin et al. 2016. Scale insect larvae preserved in vertebrate coprolites (Le Quesnoy, France, Lower Eocene): paleoecological insights.

Samuels, R. 1965. Parasitological study of long-dried fecal samples. *Memoirs of the Society for American Archaeology*. p. 175-179.

Scott, L.; Fernández-Jalvo, Y.; Carrión J.; Brink, J. 2003. Preservation and interpretation of pollen in hyaena coprolites: taphonomic observations from Spain and southern Africa.

Sianto, L., de Souza, Mô.V., Chame, M., da Luz, M. de F., Guidon, N., Pessis, A.M., Araújo, A., 2014. Helminths in feline coprolites up to 9000 years in the Brazilian Northeast. *Parasitol. Int.* 63, 851–857. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.08.002>

Stromberg, B.E. 1997. Environmental factors influencing transmission. *Veterinary Parasitology*, (72) 3-4: 247–264.

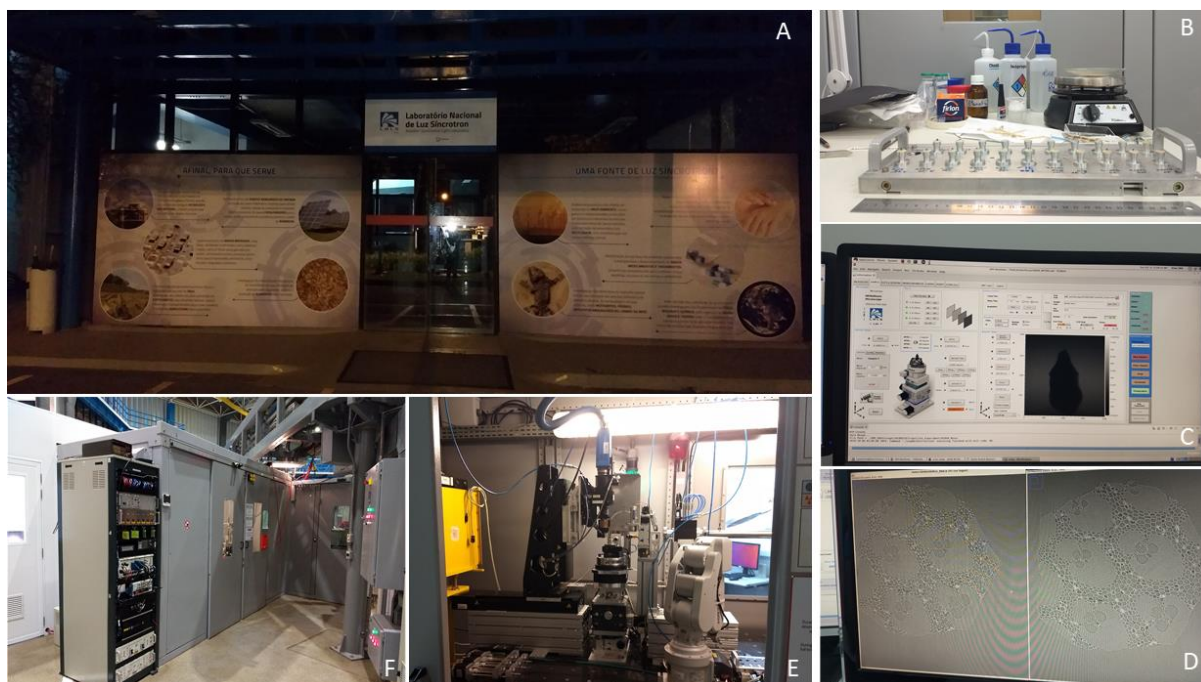
Vicente J.J., Rodrigues H.O., Gomes D.L. & Pinto R.M. 1997. Nematóides do Brasil. Parte V: Nematóides de Mamíferos. *Rev. Bras. de Zool.*, 14 (Suppl. 1):1-452.

3.1.1.2 TÉCNICAS MENOS INVASIVAS OU NÃO INVASIVAS

Ao analisar os coprólitos, o ideal é escolher técnicas que permitam a extração de informações sem perder irreversivelmente o material analisado (SOUTO, 2017b). Essas técnicas, menos invasivas ou não invasivas, permitem a preservação da amostra, bem como as inclusões contidas nelas (DENTZIEN-DIAS E FRANCISCHINI, 2020). Geralmente são análises utilizando técnicas de imageamento, que permitem a visualização das inclusões que compõem a estrutura interna do coprólito sem necessitar de algum tipo de preparação química ou destrutiva, tais como métodos de tomografia e microtomografia (ver QVARNSTRÖM et al., 2017 como exemplo).

Com o objetivo de realizar novas análises nos coprólitos da Lagoa Uri de Cima, desta vez com técnicas menos invasivas, que não necessitassem reidratação das amostras, foi realizada uma pesquisa no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS). O LNLS é um laboratório integrante do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), localizado na cidade de Campinas (estado de SP) e mantido pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). As fontes de luz síncrotron são disponibilizadas em diferentes linhas que são escolhidas e utilizadas de acordo com o interesse de pesquisa, permitindo uma utilização multiusuários das suas instalações.

Figura 19. Análise dos coprólitos no IMX: A. Instalações do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron; B. Amostras; C e D. Processo de coleta de imagens; E e F. Equipamentos para coleta de imagem.



Fonte: elaborado pela autora.

A finalidade da referida pesquisa foi compreender se esse tipo de análise pode fornecer novas informações, complementares àquelas já obtidas ou que pretendemos adquirir futuramente com as análises macroscópicas e por microscopia óptica. Desta forma, foi submetida em outubro de 2018, e aceita em seguida, uma solicitação de análise das amostras nas instalações do LNLS. A equipe foi composta por Carolina Santa Isabel Nascimento (LPP-UFSCar), Vasilii Piiadov e Evandro Ares de Araujo, ambos do Instituto de Física da USP São Carlos (IFSC), orientação do Prof. Dr. Marcelo Adorna, e colaboração de Dr. Douglas Galante (CNPEM) e Dra. Lara Maldanis Cerqueira Peres (Université Grenoble Alpes).

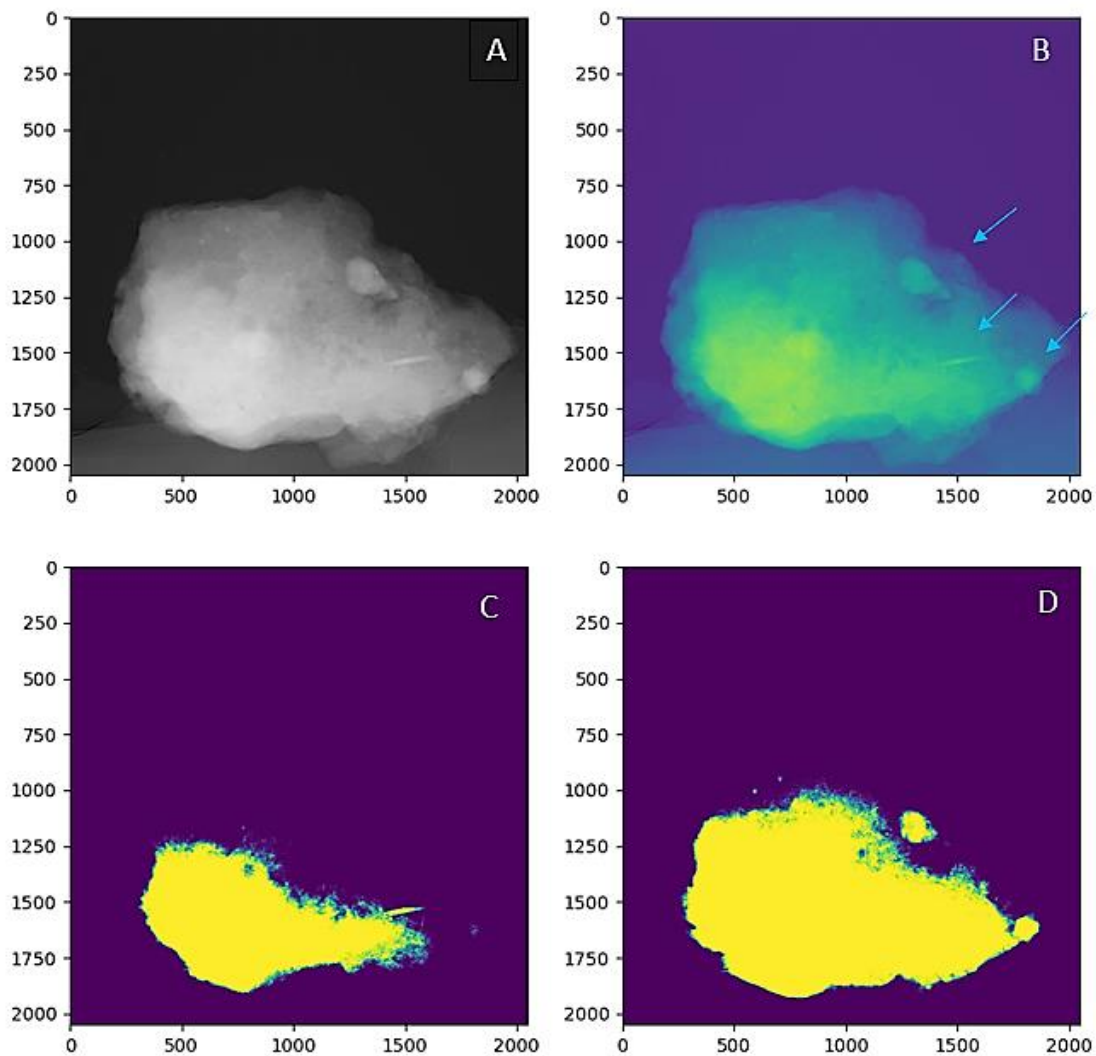
No apêndice G encontra-se a proposta de pesquisa intitulada “X-ray synchrotron microtomography applied to analyze microinclusions in coprolites”, submetida e aceita para ser desenvolvida na Linha de Luz de Microtomografia por Raios-X (IMX). O anexo A apresenta a entrevista concedida à revista Por Dentro do CNPEM, anuário de 2019, com o propósito de divulgar os trabalhos feitos na Instituição.

Foram selecionadas 11 amostras para coleta de imagens, dentre estas, 3 são do Uri de Cima (Tabela 5), e o tratamento dos dados encontra-se em elaboração, como demonstrado parcialmente na Figura 20.

Tabela 5. Coprólitos do sítio Lagoa Uri de Cima analisados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, na Linha de Luz de Microtomografia por Raios-X.

Amostra	Datação	Identificação do Produtor	Informações Recuperadas Anteriormente (Por outros tipos de análises)
A2726	8.800±1320	Possível carnívoro (a ser confirmado com análises complementares)	Material palinológico, possíveis parasitas intestinais (a serem confirmados com análises complementares) e diatomáceas
A2732	18.600 ± 1.470	?	Não analisado anteriormente
A2743	?	?	Não analisado anteriormente

Figura 20. Análise parcial da amostra A2726, observada por microtomografia computadorizada. Em A e B é possível observar a matriz (coprólito) e as suas microinclusões (indicadas pelas setas azuis em B). C e D ilustram algumas das inclusões sendo isoladas da matriz por imagem.



Fonte: elaborado por Carolina Nascimento e Vasili Piiadov.

4 OSTEODERMOS DE PAMPATÉRIO *HOLMESINA CRYPTAE* (XENARTHRA, CINGULATA, PAMPATHERIIDAE)

4.1 ECTOPARASITOS E RELAÇÕES PALEOECOLÓGICAS

Além dos parasitos intestinais, é possível recuperar em materiais fossilizados vestígios de ectoparasitos. A maioria dos ectoparasitos são artrópodes (REY, 2015). Eles vivem na superfície de seus hospedeiros, e embora alguns possam passar um período da vida de forma livre, ao menos em algum momento do seu ciclo vital necessitam do hospedeiro para sua sobrevivência, apresentando efeito prejudicial em sua saúde (GUIMARÃES et al., 2001).

Este efeito prejudicial pode ser devido à sua ação (LINARDI E GUIMARÃES, 2000):

- a) espoliadora: de acordo com a intensidade da infestação (número de parasitos por hospedeiro), pode ser que o animal tente retirar os indivíduos do seu corpo, com mordedura, arranhões ou esfregando a pele em superfícies e objetos, o que pode levar a lesões por conta deste comportamento. A quantidade de sangue retirado pela aglomeração de parasitos também pode ser um problema, por levar o organismo a quadros de anemia leve à severa; deixando-o debilitado e mais suscetível à ação de outros microrganismos patogênicos e à doenças;
- b) irritativa: reações alérgicas provocadas pela própria picada e inoculação da saliva do parasito. Pode haver uma dermatite alérgica ou mesmo uma reação generalizada pelo corpo, com reação de hipersensibilidade do hospedeiro;
- c) inflamatória: as lesões causadas pelo parasito para acessar o sangue do animal e/ou para se alojar no corpo do hospedeiro podem facilitar a entrada de microrganismos patogênicos posteriores, responsáveis por infecções secundárias, ou podem diretamente atuar como vetores destes patógenos (vírus, bactérias, helmintos e protozoários).

Sendo assim, a ação de um ectoparasito pode causar, no hospedeiro, anemias, alergias, hemorragias, dermatites, obstrução de orifícios (dutos e partes de órgãos) e necrose. Além disso, as ações listadas acima podem ser responsáveis por alterações comportamentais nos animais parasitados, como irritabilidade, falta de apetite e perda de peso.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

No ano de 2014, Dr. Jorge Felipe Moura de Jesus, então aluno de Mestrado, e posteriormente de Doutorado do referido Laboratório (LPP), coletou, em parceria com o Grupo Pierre Martin de Espeleologia (GPME), 1300 osteodermos, pertencentes a três diferentes indivíduos do pampatério *Holmesina cryptae* (Xenarthra, Cingulata, Pamphathiidae). A coleta foi feita no município de Iramaia, centro-sul do estado da Bahia, na Gruta da Lapinha, uma das maiores cavernas do estado.

Durante o trabalho de Doutorado, Jorge Felipe realizou a datação por ^{14}C de um dos indivíduos, obtendo um resultado de 20.970 ± 40 anos AP, sendo, portanto, datado do Pleistoceno.²

Ao estudar os osteodermos no LPP, Jorge Moura e a então aluna de graduação Beatriz Robbi visualizaram marcas em algumas das amostras. Ao notar que se assemelhavam a traços deixados por parasitas em osteodermos de animais atuais, fizemos análises macroscópicas e por meio de microscópio estereoscópico e microscopia eletrônica, com o objetivo de descrever e analisar as marcas encontradas.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os três indivíduos de pampatérios depositados na coleção do LPP apresentavam possíveis lesões nos seus osteodermos. Dos 1300 osteodermos analisados, 81 deles (portanto, correspondendo a 6,2% das amostras) apresentavam marcas. Alguns apresentavam mais de uma, totalizando 86 marcas analisadas e descritas. Essas possíveis lesões foram divididas em três diferentes tipos, de acordo com a origem que atribuímos à sua formação. Desta forma, propusemos divisão das lesões como sendo causadas:

1. Por ectoparasitas do tipo penetrante, semelhante à ação causada pelos Siphonaptera (Tungidae) atuais, inclusive em Xenarthra viventes.
2. Por infecções fúngicas, semelhante a dermatofitoses, sendo o primeiro registro deste tipo em osteodermos fossilizados;
3. Por infecções secundárias, por microrganismos como bactérias ou fungos, após uma lesão inicial.

² Para mais detalhes sobre a coleta, localidade, as amostras e a datação, consultar Jesus (2019).

As análises deste trabalho foram publicadas em duas revistas: na *Acta Tropica*, com o título “Lesions in osteoderms of pampatheres (Mammalia, Xenarthra, Cingulata) possibly caused by fleas” e na *Journal of South American Earth Sciences*, com o título “Damaged armour: Ichnotaxonomy and paleoparasitology of bioerosion lesions in osteoderms of Quaternary extinct armadillos” (respectivamente, apêndices A e B desta tese).

5 OSSOS DE SAURÓPODES

5.1 PARASITAS SANGUÍNEOS E LEISHMANÍASES

Os protozoários do gênero *Leishmania* são um dos mais comuns a parasitar animais. Há algumas dezenas de espécies dentro deste grupo, que podem provocar características clínicas e epidemiológicas distintas, sendo divididas de forma mais geral de acordo com os tipos de lesões que causam (REY, 2015). Essas divisões estão apresentadas no Quadro 2:

Quadro 2. Divisão dos tipos de leishmaníases de acordo com as lesões que são causadas pela ação do parasito no hospedeiro. Informações retiradas de Rey (2015).

Tipos de leishmaníase	Lesões características
Cutânea	Lesões cutâneas, que podem ou não ser ulcerosas
Mucocutânea ou cutâneo-mucosa	Pode haver complicações no quadro do doente, com lesões ulcerosas destrutivas nas mucosas da boca, nariz e laringe, podendo ser mutilante e desfigurante
Visceral ou calazar	Há um tropismo acentuado relacionado ao fígado, baço, tecidos linfoides e medula óssea do hospedeiro, causando lesões viscerais com alta mortalidade se não tratada
Cutâneo-difusa	Casos em que o hospedeiro não apresenta grande suscetibilidade à doença, apresentando apenas formas cutâneas não-ulcerosas

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Desde o ano de 2006, a Dra. Aline Ghilardi, junto com o Prof. Dr. Marcelo Adorna coletam fósseis de dinossauros herbívoros e carnívoros do Cretáceo, na região do Noroeste do estado de São Paulo. No ano de 2017, Aline, então pesquisadora no Pós-doutorado, retomou essa coleção do LPP para estudos. Em um dos materiais, um fragmento de fíbula de um dinossauro não-aviano (Sauropoda, Titanosauria) do Cretáceo Superior, ela percebeu uma protuberância de aspecto esponjoso na superfície do osso. No ano seguinte, o geólogo Tito Aureliano, durante o seu Mestrado na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob orientação da Profa. Dra. Fresia Ricardi-Branco, em colaboração com o LPP, estudou essas lesões. O material foi submetido a análises de Tomografia Computadorizada (na Escola de Medicina da USP – São Paulo) e a preparação de lâminas delgadas, que foram observadas por microscopia eletrônica e óptica na UNICAMP e na UFSCar. Por meio de estudos histológicos, Tito detectou que o animal sofria de osteomielite aguda. A professora Fresia, ao observar as lâminas delgadas, encontrou microfósseis dentro dos canais vasculares do indivíduo.

A partir de então, passamos a realizar as observações deste material no Laboratório de Biotecnologia de Algas (Lalgas-UFSCar), por meio de microscopia óptica (microscópio Nikon Eclipse Ni). Nos canais vasculares do indivíduo foram encontrados mais de 70 desses microfósseis, que foram fotografados com câmera Nikon DS-Fi2, utilizando o software NIS-Elements F, v. 4.0, medidos utilizando o software Image J e tiveram suas estruturas descritas.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os organismos encontrados assemelham-se – em morfologia e localização no corpo do hospedeiro – a parasitos sanguíneos do gênero *Leishmania*, protozoários que ainda atualmente são responsáveis por doenças em diversos animais, inclusive em humanos. Parasitas possivelmente relacionados à leishmaníases só haviam sido registrados até então preservados em âmbar. Pela primeira vez eles foram encontrados dentro do seu possível hospedeiro vertebrado. Outra novidade deste trabalho é que foi o primeiro registro de um possível parasito no interior de ossos de dinossauros.

As análises continuam a ser realizadas, e os resultados parciais deste trabalho foram publicados no periódico *Cretaceous Research*, com o título “Blood parasites and acute

osteomyelitis in a non-avian dinosaur (Sauropoda, Titanosauria) from the Upper Cretaceous Adamantina Formation, Bauru Basin, Southeast Brazil” (Apêndice C desta tese). Adicionalmente, para mais discussões sobre leishmaníases e evolução dessas doenças, ver o próximo capítulo.

6 TRANSMISSÃO DE PARASITOSES

A transmissão de um parasito entre diferentes hospedeiros pode ser um evento bastante complexo, dependendo das especificidades do ciclo de vida do parasito e das condições do ambiente para que essas especificidades tenham suas exigências atendidas (REY, 2015). Algumas dessas características necessárias estão apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3. Eventos necessários para que haja a possibilidade de haver focos naturais das parasitoses e que haja circulação entre os organismos. Logicamente, há uma interrelação entre os aspectos apresentados em ambas as colunas.

Exigências relacionadas ao ciclo de vida do parasito	Exigências relacionadas às características do ambiente e do hospedeiro
Saída do parasito, do hospedeiro atual, em momento propício à sua sobrevivência durante essa transferência.	Todos (hospedeiros, parasitos e vetores) precisam estar presentes no mesmo espaço e tempo, simultaneamente, para que a circulação possa ocorrer.
Deslocamento adequado, em segurança, até o próximo hospedeiro.	A densidade populacional, tanto dos hospedeiros definitivos e intermediários, quanto dos vetores deve ser o mínimo necessário para que esteja assegurada a passagem do parasito de um organismo a outro. Ou seja, deve ser possível que o parasito, ao sair do corpo de um hospedeiro, consiga encontrar outro viável.
Identificação de um próximo hospedeiro adequado, no qual o parasita possa acessar o seu organismo, penetrá-lo e manter-se alojado.	Condições ambientais adequadas para que, ao estar fora do corpo do hospedeiro, cumprindo parte do seu ciclo de vida (cistos, larvas, ovos em fase de desenvolvimento no sedimento) ou apenas em momento de migração para outro organismo, o parasito consiga se manter no ambiente. Além de garantir a longevidade dos outros organismos envolvidos na transmissão (reservatórios, vetores, hospedeiros intermediários e definitivos).
Capacidade de migração dentro do novo hospedeiro, identificando a localização ideal onde poderá completar o seu desenvolvimento (o órgão em que vai se fixar e se alojar).	Quando um parasito entra, inclusive naturalmente, em um novo ambiente, para manter-se é necessário que todas as demais condições sejam atendidas.

--	--

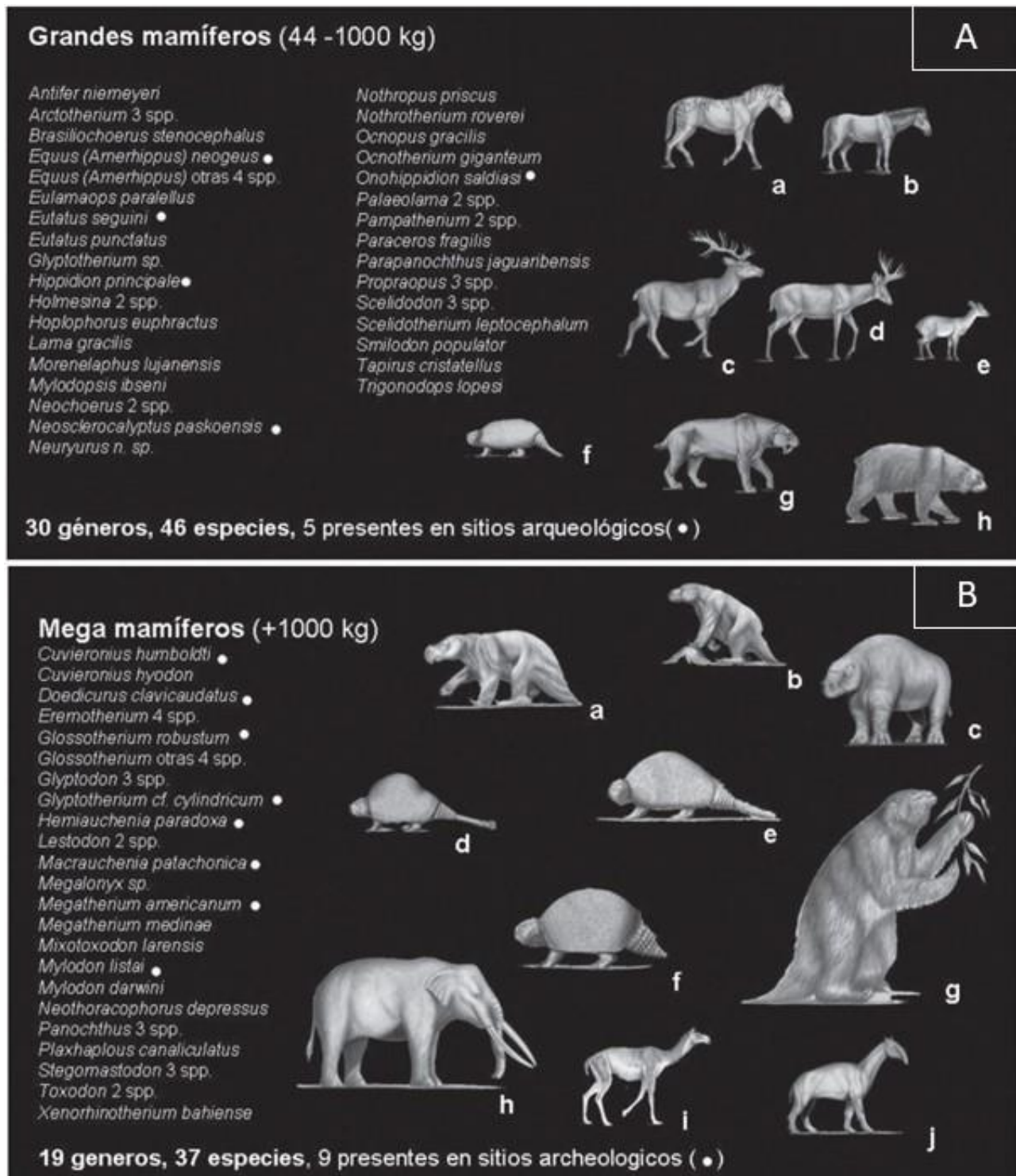
* Quadro elaborado com informações de Rey (2015).

6.1 SÍTIOS ARQUEOLÓGICOS E PALEONTOLÓGICOS PLEISTOCÊNICOS DA AMÉRICA DO SUL

Várias hipóteses já foram elaboradas como tentativa de explicar as possíveis causas da extinção de vários dos grandes animais do Quaternário (ADOVASIO, 2011). Uma delas foi a chamada de *Hyperdisease* ou Hipótese da Hiperdoença, que foi mais explorada nos anos 1990. De acordo com essa explicação, ao chegarem pela primeira vez no continente americano, os grupos humanos poderiam ter trazido vírus, bactérias e outros microrganismos, alguns deles com grande capacidade de disseminação e bastante patogênicos (PÉREZ E AGNOLIN, 2021). As populações dos megamamíferos deveriam ser altamente suscetíveis a esses patógenos, tanto por suas características biológicas (MACPHEE E MARX, 1997) quanto por já estarem fragilizadas pelas oscilações climáticas que vinham ocorrendo durante esse Período (SOIBELZON, 2008). Sendo assim, a chegada dos humanos teria sido uma pressão importante para essas diversas espécies (PÉREZ E AGNOLIN, 2021).

Entretanto, apesar de haver indícios da convivência e contato entre humanos e a megafauna (Figura 21), muitos autores questionam essa hipótese. Além de ser difícil comprovar que algumas doenças possam ter dizimado mais de 30 diferentes gêneros destes animais (ADOVASIO, 2011), também não há indícios de que antes de 10 mil anos as populações humanas se encontrassem com uma densidade demográfica tão significativa para disseminar tão severamente doenças para todos esses organismos.

Figura 21. Exemplos de grandes mamíferos (entre 44 a 1000 Kg), presentes na América do Sul durante o Pleistoceno. As espécies apresentadas com um ponto (•) ao lado foram encontradas em contemporaneidade com grupos humanos antigos, em sítios arqueológicos.



Fonte: ambas as imagens foram modificadas de Soibelzon (2008).

Atualmente, acredita-se que deva ter ocorrido uma combinação de fatores (CIONE et al., 2015). O texto seguinte discute os principais deles. Ele é um dos capítulos do livro “A origem e o desenvolvimento da arte na linhagem humana: uma abordagem biológico-evolutiva”³, de autoria de Carolina Santa Isabel Nascimento e Marcelo Nivert Schlindwein, com ilustrações de Thândara Jacob, aceito para publicação pela Editora Appris, e em fase de ajustes⁴.

Sítios arqueológicos e paleontológicos da América Do Sul - como a arte pode nos ajudar a desvendar grandes mistérios da história do continente

A chegada dos primeiros grupos humanos no continente americano ainda é um grande mistério, com muitos detalhes a serem desvendados. Na década de 1930 foram encontradas na cidade de Clóvis, no Novo México, Estados Unidos, diversas pontas de lança associadas a restos fossilizados de mamutes. Era uma indústria lítica com aspectos bastante específicos, especialmente quanto a uma característica concavidade localizada em sua base (Figura 22), e que ao longo das próximas décadas foi sendo encontrada em outros territórios, inclusive em sítios no México.

³ Por este motivo, alguns elementos de formatação diferem parcialmente do restante desta tese.

⁴ As imagens que serão utilizadas no livro estão em fase de desenvolvimento. Por isso, nesta versão apresentada aqui, estão sendo utilizadas imagens temporárias, apenas para ilustração do contexto.

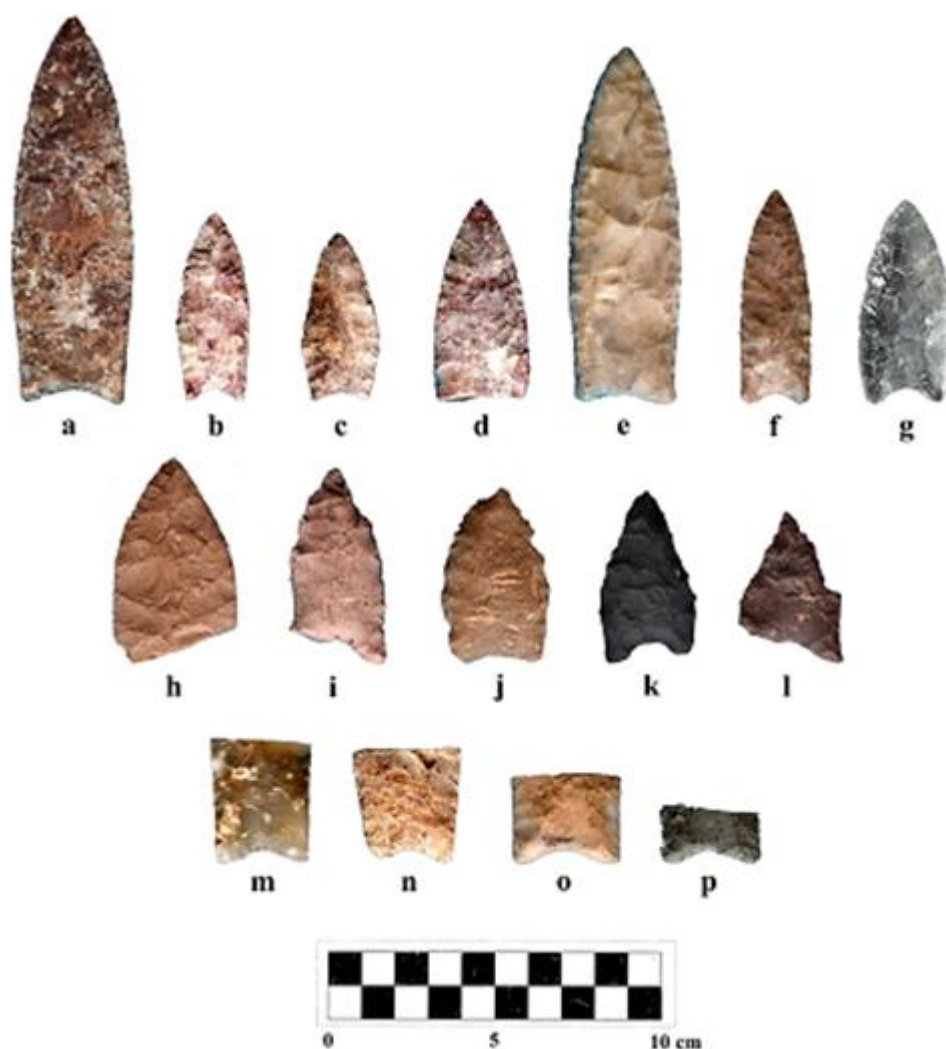


Figura 22. Exemplos de material lítico da cultura Clovis, encontrados no sítio arqueológico El Fin del Mundo, no deserto de Sonora, no México. Fonte: Modificado de Sánchez-Morales, 2018.

Com datações de cerca de 10 mil anos, eram até então as evidências mais antigas de ocupação humana na América. Surgiu a partir daí a imagem do Povo de Clóvis, e o dogma de que a entrada dos primeiros humanos no nosso território deveria ter ocorrido há, no máximo, cerca de 12 mil anos, durante o Último Máximo Glacial (LGM, do inglês “Last Glacial Maximum”). Durante esse período, devido às baixas temperaturas, parte da água dos oceanos ficou aprisionada nas geleiras, baixando assim os níveis do mar, e deixando exposta uma

porção terrestre que servia de passagem entre a parte asiática da Sibéria e a América do Norte: o estreito de Bering.

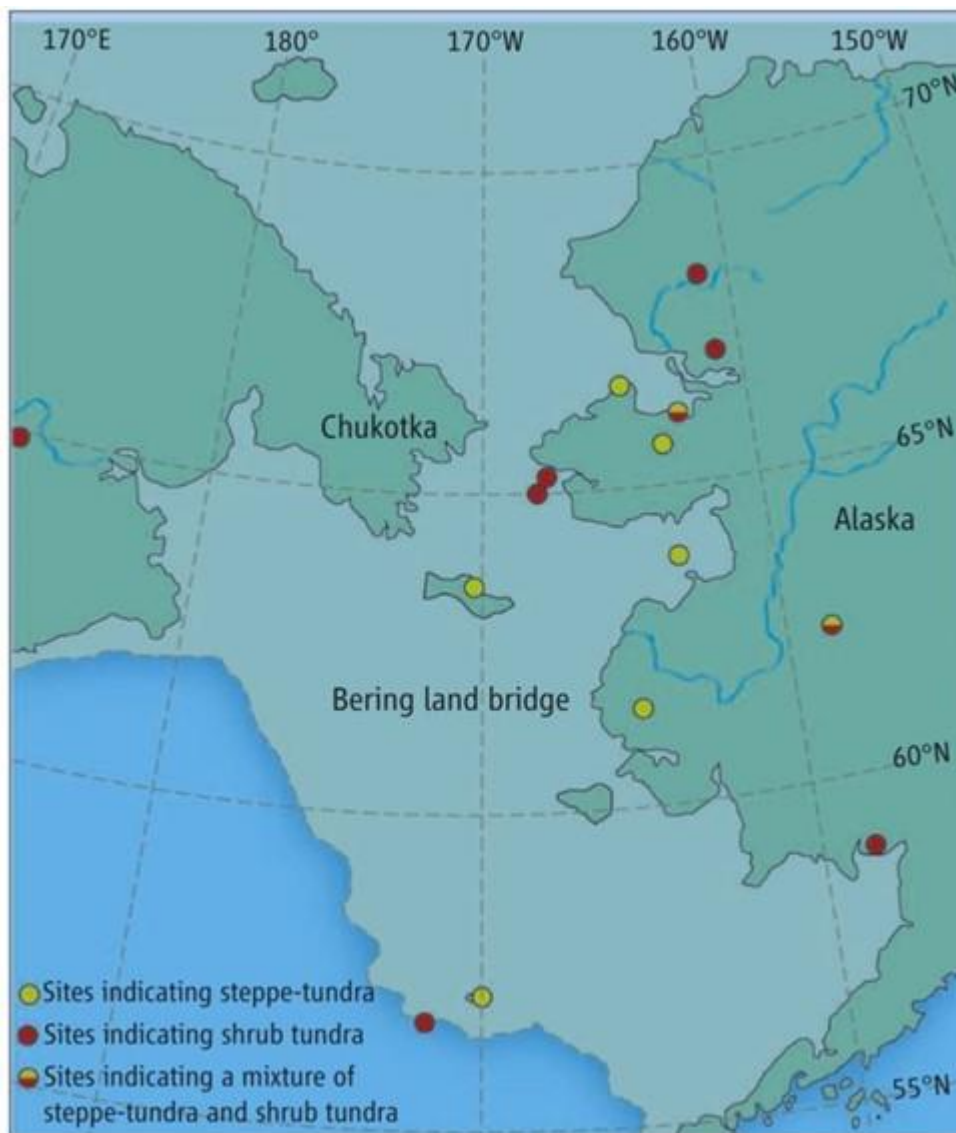


Figura 23. Região de Chukotka, extremo leste da Sibéria, e oeste Alasca, onde se formou a passagem do estreito de Bering, por onde devem ter migrado algumas das populações humanas que chegaram ao continente. Imagem modificada de Hoffecker, 2014.

De acordo com essa teoria, também conhecida como “Clovis-First”, os sítios da América do Norte seriam, então, os mais antigos do continente, com nenhuma datação podendo

ser anterior aos referidos 12 mil anos. Assim o paradigma se manteve até a década de 1970, quando inúmeros novos sítios com datações mais antigas começaram a fornecer crescentes indícios de que tínhamos chegado por aqui há bem mais do que dez milênios. Na verdade, diversos pesquisadores relacionados à arqueologia, à antropologia e à linguística⁵ questionavam essa teoria já há algum tempo, pois, analisando pinturas rupestres de diferentes tradições ao longo do continente, diferenças na indústria lítica e outros registros culturais, julgavam improvável que tamanha diversidade pudesse ter sido criada em tão pouco tempo. Os estudiosos das línguas ameríndias, por exemplo, há anos apontavam que 11.200 anos não seria um tempo suficiente para as mais de 900 línguas existentes quando os europeus chegaram no continente americano no século XV, especialmente se considerarmos a possibilidade de apenas um ou poucos pulsos de chegada, com quase todos os habitantes iniciais com as mesmas raízes linguísticas⁶. Esses cálculos são feitos rastreando-se a raiz das palavras utilizadas em um idioma (ou a “língua-mãe”), e estimando quanto tempo ela demoraria para sofrer tantas modificações até o ou os idiomas atuais estudados. O arqueólogo James M. Adovasio e o editor de revistas científicas Jake Page apresentam alguns exemplos:

Para citar apenas a América do Norte, havia aqui trezentas línguas derivadas de seis ou oito raízes chamadas *phyla*. Por exemplo, uma dessas raízes era o Macro-Siouan, que incluía não somente as línguas das tribos da planície, mas também dos *crow*, *mandan*, *omaha*, *winnebago*, *sioux*, e ainda *mohawks* e outras tribos iroquesas do Estado de Nova York e do Canadá, bem como *cheroquis*, que eram das Carolinas, *catawbas*, *caddoan* e *guchis*. Nos termos dos cálculos linguísticos - que medem o tempo necessário para que uma palavra, como “mãe” ou “sol”, se transforme a partir do original - estava claro que mesmo 15 mil anos não bastariam para explicar essa impressionante diversidade linguística.⁷

De fato, nas últimas décadas, avolumaram-se as evidências de que os primeiros grupos humanos devem ter chegado há mais tempo do que apontava a “Clovis-First”, e provavelmente

⁵ No caso da linguística, as evidências são bem mais recentes, trabalhando com os registros feitos a partir dos primeiros colonizadores europeus do século XVI, que ficaram impressionados com a diversidade de etnias que encontraram ao chegar no novo continente. Estima-se, baseando-se em tais relatos, que nesse período de chegada dos europeus, deveriam existir cerca de novecentas diferentes línguas entre os nativos americanos (Adovasio e Page, 2011). De acordo com diversos estudiosos dessa área, seriam necessários mais do que 10 mil anos para ocorrer tamanha diversificação.

⁶ Podem constituir, portanto, mais uma indicação da ocorrência de mais de um pulso de chegada no continente, por diferentes grupos humanos, com características culturais - inclusive linguísticas - distintas.

⁷ Adovasio e Page, 2011, p. 288.

em mais de um evento de chegada. Diversos sítios têm sido descritos em toda a América Latina e América do Sul, incluindo localidades no Nordeste e Centro-Oeste do Brasil, indicando nossa permanência no continente há pelo menos 25 mil anos. São sítios como Monte Verde (19 mil anos), no Chile, Arroyo del Vizcaíno (algumas polêmicas datações de 30 mil anos), no Uruguai, e sítios brasileiros (de até talvez cerca de 27 mil anos) estão entre alguns dos mais antigos descritos até então para o continente. É possível que grupos humanos tenham chegado por diferentes rotas, além das terrestres, também por marítimas, utilizando embarcações, e em vários momentos.



Figura 24. Alguns dos sítios mais antigos da América do Sul e de todo o continente americano, datados em mais de 12 mil anos, ou seja, Pré-Clóvis. Modificado de Lahaye, 2013.

Quando os primeiros humanos chegaram por aqui, se depararam com uma incrível fauna, incluindo enormes mamíferos⁸. A América do Sul havia ficado isolada desde que se separou da África, há cerca de 120 milhões de anos, e esse isolamento permitiu o desenvolvimento de uma fauna bastante diferente e única.

⁸ A esses animais de grandes proporções corporais, com mais de 44 Kg, que povoaram vários continentes durante o Cenozóico, muitos autores se referem como “megafauna”, um termo que não tem valor taxonômico, mas é utilizado para se referir genericamente a estes grandes animais, cujas dezenas de gêneros desapareceram até cerca de 10 mil anos atrás.

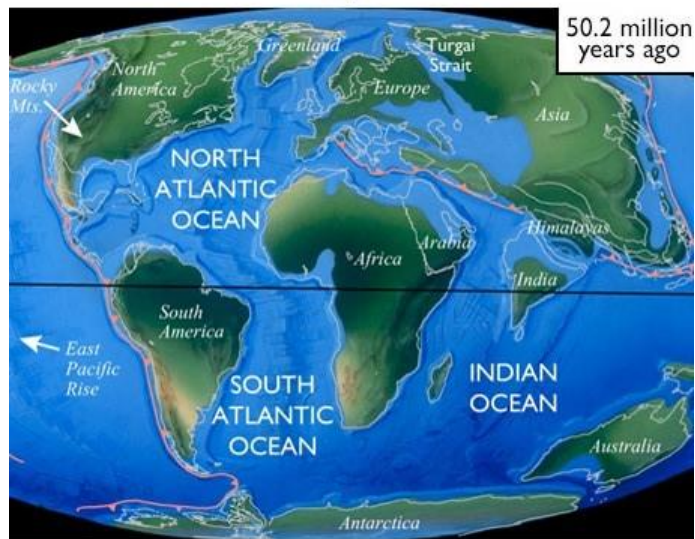
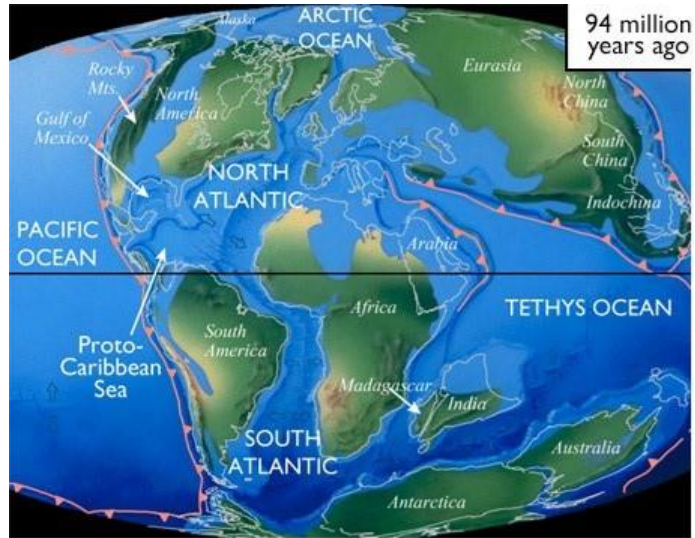


Figura 25. Movimento dos continentes entre 94 milhões de anos até 18 mil atrás (desde o Cretáceo Superior até o Mioceno), demonstrando as mudanças ocorridas na América do Sul ao longo do tempo. Imagens modificadas de paleoportal.org.

Alguns grupos de organismos conseguiram migrar entre as Américas, como roedores e primatas que podem ter chegado por balsas de vegetação, um tipo de aglomeração natural de vegetação e porções de terra, que se desprendem e por acidente transportam organismos atravessando rios e mares até o continente. Sendo um número de indivíduos suficiente para manter a espécie, eles se estabelecem no local, fundando ali uma nova população. Entretanto, foi provavelmente durante o Plioceno, entre 2,5 e 4 milhões de anos atrás, quando se formou o istmo do Panamá⁹, uma estreita porção de terra que tirou a América do Sul do seu isolamento, ligando-a à América do Norte, que uma grande mudança ocorreu. Com essa ligação, foi possível um significativo intercâmbio faunístico e de outros organismos, chamado de Grande Intercâmbio Americano (em inglês, "Great American Biotic Interchange" ou GABI). Sendo assim, todo o nosso continente já foi habitado por cavalos nativos¹⁰, ursídeos, tigres dentes-de-

⁹ Há controvérsias quanto a data dessa formação. Alguns autores chegam a falar em quase 30 milhões de anos em que essa passagem terrestre teria começado a se formar, e finalmente estaria formada entre 10 a 6 milhões de anos atrás. Entretanto, recentes estudos, incluindo análises moleculares de grupos animais atuais e fósseis, têm indicado datas mais recentes de divergência e especiação (ocorridas com a separação geográfica de populações de espécies marinhas após a formação do istmo, que se constituiu uma barreira, separando os oceanos Pacífico e Atlântico), de até cerca de 4 milhões de anos.

¹⁰ Os cavalos que encontramos atualmente na América foram trazidos pelos colonizadores europeus, não sendo, portanto, nativos. Entretanto, até cerca de 10 mil anos atrás, faziam parte da megafauna brasileira ao menos dois gêneros de cavalos nativos: os gêneros *Equus* e *Hippidion*.

sabre¹¹, proboscídeos¹², camelídeos¹³ e gigantes tatus¹⁴ e preguiças¹⁵, que se deslocaram entre a América do Norte e a América do Sul durante o Plioceno-Pleistoceno.

¹¹ Tanto os felídeos quanto os Thylacosmilidae, que eram marsupiais.

¹² Ordem dos elefantes atuais. Na América, essa ordem era representada pelos mamutes (que não cruzaram o istmo, sendo encontrados os seus fósseis apenas na América do Norte) e os mastodontes.

¹³ As extintas espécies de *Paleolama*.

¹⁴ Pertencentes à Ordem Cingulata, são parentes distantes dos tatus atuais. Incluindo os pampatérios e os gliptodontes, estes representantes antigos podiam chegar ao tamanho de carros do tipo fusca.

¹⁵ Diferentes das preguiças atuais, aquelas não viviam em árvores, tinham tamanho entre 2,5 a 6 metros e deviam chegar a pesar até 4 toneladas. Para exemplos e ilustrações de todos esses animais, consultar Cione et al. (2015).



Figura 26. Alguns dos grupos de vertebrados que se dispersaram entre a América do Norte e a América do Sul após a formação do istmo do Panamá, há cerca de 4 milhões de anos. Esse movimento é chamado de Grande Intercâmbio Americano (GABI). Modificado de Chávez, 2008.

O intrigante é que, acompanhando o registro fóssil, é possível notar que dezenas de gêneros (pelo menos 40) desses mamíferos do Quaternário foram sendo extintos desde então, com alguns últimos remanescentes resistindo até cerca de 8 mil anos. A causa (ou as causas) dessas extinções são ainda desconhecidas. Alguns autores defendem que boa parte do motivo pode ter sido a influência do próprio GABI. Isso porque algumas espécies podem ter encontrado nos novos ambientes uma vasta oportunidade de se multiplicarem, por não terem ainda predadores estabelecidos e encontrarem locais favoráveis para a sua sobrevivência e reprodução, se expandindo por algum tempo sem muito controle e modificando as paisagens. O fluxo de novos organismos permitiu também o intercâmbio de predadores, alterando as

populações de suas caças e trazendo novos tipos de interações entre as espécies. Assim, as alterações causadas pelo GABI podem também ter influenciado em algumas das extinções de grupos que ocorreram mais tarde, nos últimos milênios.

Outras possíveis explicações foram sendo elaboradas ao longo dos anos, muitas delas apontando para a influência dos grupos humanos recém-chegados ao continente. Uma delas foi mais aprofundada na década de 60, pelo paleobiólogo estadunidense Paul Martin e colaboradores: a Hipótese da Grande Matança ou extinção por caça (“Overkill”) considerava que os humanos teriam sido os principais responsáveis pela extinção desses grandes animais, por meio de uma pressão de caça extremamente acentuada, o que, de acordo com eles, seria comprovado pela indústria lítica de Clóvis, um indício do poder de caça desses grupos humanos. Já a Hipótese da Hiperdoença¹⁶, desenvolvida na década de 1990, aponta, como uma possibilidade, que a própria chegada destes grupos já poderia constituir um problema, por conta dos microrganismos que chegaram junto com eles. Por não terem tido ainda contato com esses parasitas e potenciais patógenos, os animais que já se encontravam no continente tornaram-se fragilizados por este contato, muitos deles se tornando bastante vulneráveis às doenças que passaram a circular entre os diversos organismos, tanto os novos quanto os que já habitavam esse território.

Entretanto, ainda atualmente, as evidências de caça são bastante escassas¹⁷, principalmente na América do Sul. Além disso, estudos paleodemográficos indicam que a densidade populacional dos primeiros grupos não deve ter sido muito alta, talvez até mesmo devido às condições difíceis do caminho percorrido até adentrarem o continente. Apenas entre 12 e 8 mil anos as evidências de atividades humanas se tornam mais abundantes em toda a América, indicando que nessa época já deveria estar mais densamente ocupada, com populações entre algumas centenas a algumas milhares de pessoas, nos locais com mais recursos.

Em 2008 foi publicado um trabalho sobre a Hipótese do Zig-Zag Interrompido ou Quebrado (“Broken Zig-Zag”), proposta por Alberto Luis Cione, Leopoldo Héctor Soibelzon e Eduardo Pedro Tonni, pesquisadores da División Paleontología Vertebrados do Museo de La

¹⁶ Em inglês, “Hyperdisease hypothesis”. Ver Macphee e Marx (1997) e Ferigolo (1999).

¹⁷ Como indícios de caça, são consideradas, por exemplo, pontas de lança fincadas em restos de animais, clara demonstração de raspagem dos ossos ou de queima e marcas de corte.

Plata. Essa hipótese retoma diversas das tentativas de explicação anteriores, demonstrando que elas não são excludentes. Assim, o objetivo dos autores foi combinar o que teriam sido os dois principais fatores responsáveis pelo desaparecimento da megafauna: as oscilações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno e a ação direta ou indireta dos grupos humanos.

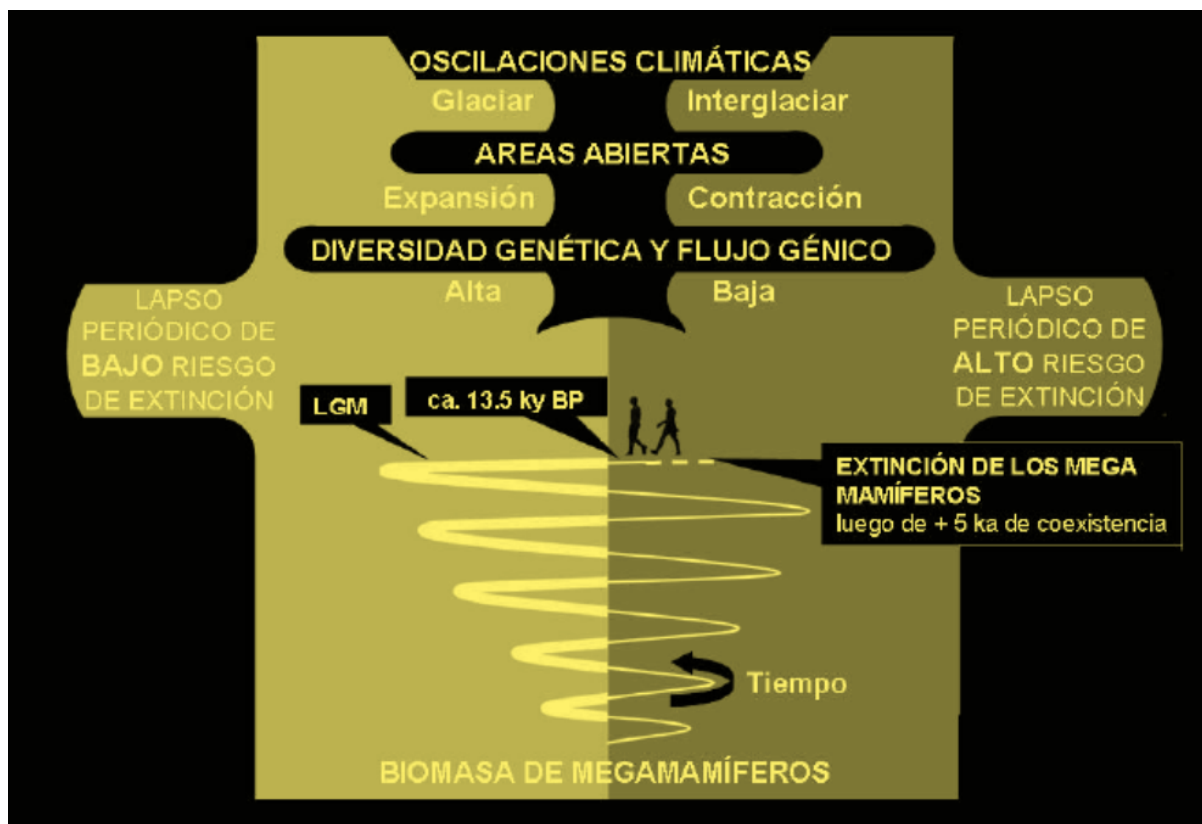


Figura 27. Desenho esquemático da hipótese do Zig-Zag interrompido, de acordo com a qual as oscilações climáticas do Pleistoceno e a ação dos grupos humanos, em conjunto, seriam responsáveis pela extinção das espécies de grandes mamíferos e outros vertebrados em vários lugares do mundo durante os últimos 20 mil anos. Modificado de Soibelzon, 2008.

As oscilações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno levaram a uma expansão e retração da vegetação nos ambientes por diversas vezes durante esta Época. As mudanças climáticas foram globais, mas as causas de extinção teriam sido eventos múltiplos, que variaram localmente. Na Austrália, por exemplo, onde também temos registros de grandes extinções da fauna nessa Época, tais ocorrências coincidem com a chegada dos humanos em

seu território, o que pode então ter sido um elemento crucial para tal evento. Já para a América, e em especial para a América do Sul, até então não temos evidências de caça em grandes proporções, que pudesse indicar que a ação humana, sozinha ou como fator principal, pudesse ter sido a causa do desaparecimento dessas espécies. Porém, pode sim ter sido uma influência adicional.

Nos últimos dois milhões de anos, as oscilações climáticas ocorridas globalmente levaram a várias flutuações na fauna e flora em diversas partes do mundo. No continente americano, essas flutuações levaram à extinção de diversos grupos, incluindo os enormes animais da megafauna. Na América do Sul, os últimos remanescentes sobreviveram até cerca de 8 mil anos atrás. O último período glacial se encerrou há cerca de 12 mil anos, iniciando-se um período interglacial no qual ainda estamos vivendo. Essas oscilações levam a mudanças na paisagem, com ambientes que se alternam entre mais abertos ou fechados, e com taxas de umidade e faixas de temperatura sofrendo mudanças e alterando completamente a composição da flora e da fauna associada, alternando, por exemplo, entre florestas, bosques, desertos, pampas, cuja composição de espécies é bastante distinta.

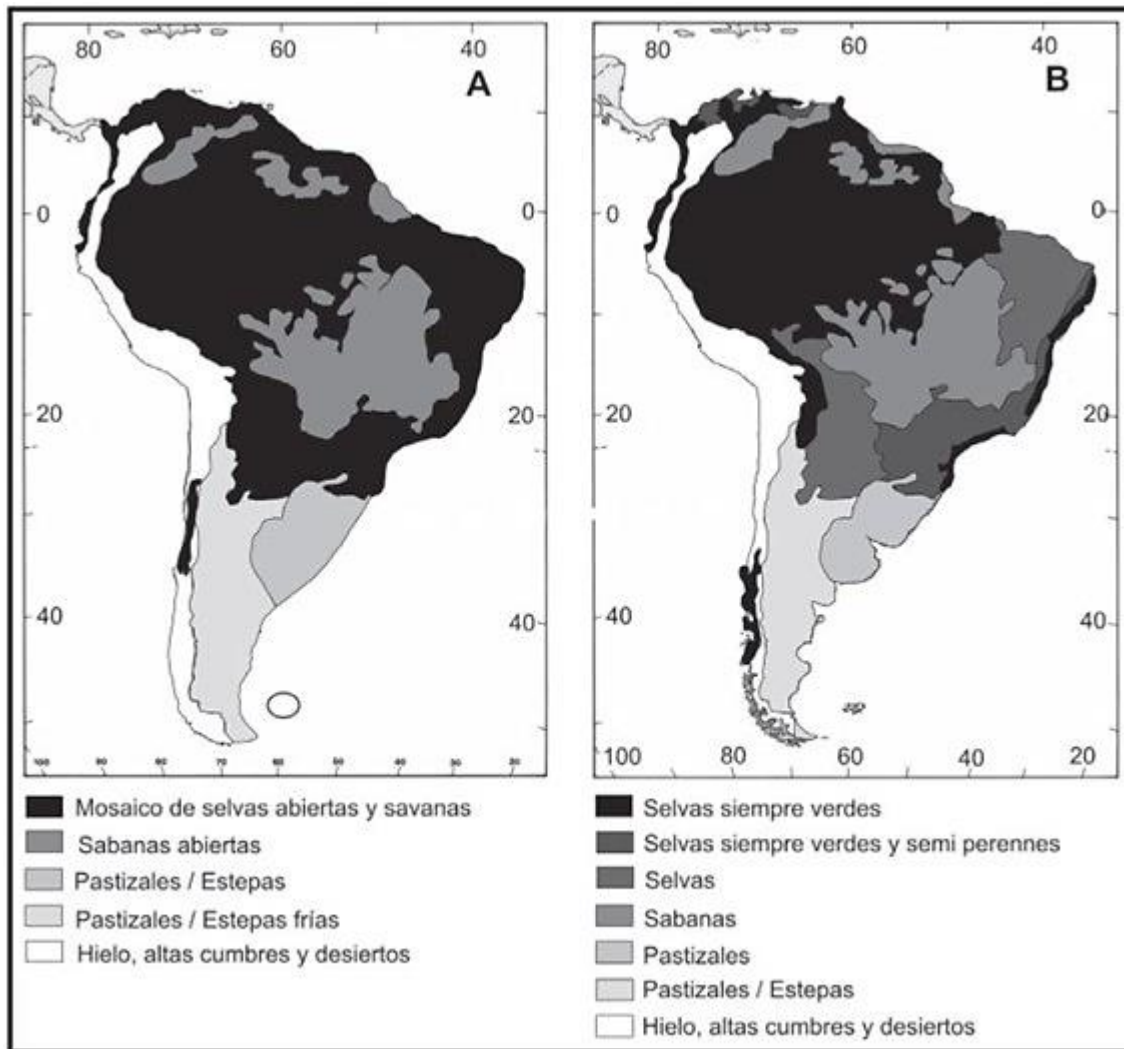


Figura 28. Alternância entre ambientes com vegetação mais aberta e mais fechada. A. durante o último período glacial, até cerca de 12 mil anos atrás; e B. no período interglacial atual. Modificado de Cione et al. (2009).

As oscilações climáticas ocorridas durante o Pleistoceno levaram a alterações sucessivas nas paisagens, que alternavam em ora mais fechadas, ora mais abertas, relacionadas às variações nas taxas de umidade e temperatura no ambiente. Assim, havia momentos de maior e outros de menor disponibilidade de recursos para os grandes mamíferos. O resultado com o tempo pode ter sido uma redução da sua biomassa, que é o número de indivíduos encontrados por área. As populações remanescentes ficavam restritas a ilhas de vegetação (Figura 28), que se expandiam ou retraíam de acordo com os períodos glaciais ou interglaciais. Essa restrição a

esses espaços menores, e com redução do número de indivíduos, deve ter trazido inúmeros problemas relacionados à diminuição populacional. No caso de os cruzamentos consanguíneos terem se tornado conseqüentemente mais frequentes, a diversidade genética das populações deve ter sido reduzida, com indivíduos com menor possibilidade de enfrentarem adversidades ambientais e mais suscetíveis a doenças relacionadas ao cruzamento entre indivíduos aparentados. Além disso, por estarem isolados nessas manchas de vegetação, o fluxo gênico (troca genética entre os indivíduos de diferentes populações) deve ter ficado bem mais difícil, o que também contribui muito para esse empobrecimento genético, deixando as populações com um menor repertório de resposta à patógenos e doenças em geral e à alterações no ambiente. Mesmo quando as áreas propícias à sua sobrevivência voltavam a se expandir, pode ser que a partir de algum momento essas populações já não fossem viáveis, até que não mais conseguiram se recuperar. O que os autores chamam de Zig-Zag é justamente essa alternância entre a biomassa das populações durante essas mudanças no ambiente, em que elas diminuem e depois voltavam a se recuperar e se estabelecer, quando o ambiente ficava de novo mais favorável. O que essa hipótese propõe é que ao introduzir um elemento novo nessa dinâmica, que foi a chegada¹⁸ dos grupos humanos, a condição de restabelecimento foi interrompida, pois as populações fragilizadas tiveram ainda mais indivíduos retirados, seja de forma direta, por caça, ou indiretamente, por meio de outros tipos de interação, até um ponto em que não conseguiram mais se recuperar.

Certas características biológicas das próprias espécies poderiam também influenciar na permanência das suas populações ao longo do tempo nestas condições aqui apontadas, dificultando a sua manutenção e sobrevivência, e aumentando a sua fragilidade. Tais características estariam relacionadas ao porte (tamanho e massa corporal) desses indivíduos. Nós as resumimos no Quadro 4, adaptado e modificado a partir de Soibelzon (2008):

¹⁸ Ou quem sabe o aumento no número de indivíduos nas populações humanas, aumentando a pressão de caça e as interações com as populações desses outros animais.

Quadro 4. Algumas características biológicas das espécies de grandes mamíferos atuais que poderiam estar presentes nos grupos antigos e aumentar a sua vulnerabilidade sob as condições desfavoráveis discutidas no capítulo. Modificado de Soibelzon (2008).

<p>TAXA REPRODUTIVA</p>	<p>A quantidade de vezes que uma fêmea consegue reproduzir por ano. Por conta dos longos períodos de gestação, de lactância e de anos necessários de cuidado parental que ocorrem com os grandes mamíferos atuais, e provavelmente deveriam ocorrer de forma semelhante na megafauna extinta, é possível que as fêmeas não dessem à luz mais de uma vez por ano, e possivelmente cerca de seis vezes durante toda a vida. Esse número baixo pode fazer com que o número de indivíduos na população não aumente muito ao longo dos anos, e que cada fêmea retirada (por caça ou outro fator que a leve à morte) tenha uma grande influência na viabilidade populacional.</p>
<p>IDADE EM QUE AS FÊMEAS ATINGEM A MATURIDADE SEXUAL</p>	<p>Com qual idade as fêmeas podem ter os seus primeiros filhotes. Nas espécies de mamíferos de médio porte atuais, essa idade pode ser a partir de 6 meses. Entretanto, no caso dos grandes mamíferos terrestres, como elefantes e rinocerontes, essa idade pode ser acima dos 10 anos. Isso significa que o indivíduo precisa sobreviver mais de uma década a todas as adversidades ambientais para começar a deixar seus primeiros descendentes.</p>

<p>DURAÇÃO DO PERÍODO DE GESTAÇÃO</p>	<p>É um período em que a fêmea se encontra mais vulnerável, e que nos megamamíferos atuais pode chegar a mais de 660 dias, como é o caso das espécies de elefantes.</p>
<p>DURAÇÃO DO PERÍODO DE LACTAÇÃO</p>	<p>É bastante variável entre as espécies. É também bastante custoso para a mãe, que precisa obter e alocar energia para a produção do leite, que vai nutrir e permitir o crescimento e desenvolvimento do filhote. Além de todas as alterações fisiológicas, morfológicas e comportamentais a que é submetida.</p>
<p>DURAÇÃO DO PERÍODO DO CUIDADO PARENTAL</p>	<p>É comum, entre os megamamíferos, uma dependência por anos por parte dos filhotes, sendo esse convívio também necessário para aprenderem como e onde buscar alimentos, água, abrigo e aprenderem sobre comportamento social do grupo. Desta forma, em muitas espécies, por mais de 2 a 3 anos a cria fica totalmente dependente do cuidado dos adultos, sendo extremamente vulnerável.</p>

Como já discutimos aqui, a chegada dos primeiros humanos deve ter ocorrido há pelo menos 20 mil anos. Esse evento pode ter aumentado a pressão sobre essas populações, fragilizadas pela diminuição do seu número populacional devido a todos os fatores apontados anteriormente. Assim, elas podem ter ficado ainda mais vulneráveis com a atuação dos humanos que chegaram e se estabeleceram no continente, seja por ação direta - por meio da caça, com a retirada de indivíduos - ou por ação indireta, com as alterações causadas na dinâmica dos ambientes. Por exemplo, com transmissão de patógenos e introdução de doenças para as quais esses indivíduos ainda não tinham defesa ou outro conjunto de fatores, que tenham causado ainda mais danos a essas populações já em declínio. Sendo assim, em resumo, as

mudanças climáticas devem ter sido uma das maiores causas do declínio dessas populações, e a atuação dos grupos humanos (por caça, por contaminação por parasitas ou patógenos em geral e por alterações no ambiente) pode ter sido mais um elemento, e talvez um acelerador, desses processos de extinção.

Foi ao analisar os fósseis da megafauna das Américas que o naturalista francês Georges Cuvier definiu, no final do século XVIII, o conceito de extinção de espécies, que não tinha uma caracterização bem estabelecida até então. Por meio da Anatomia Comparada, descreveu espécimes de proboscídeos, demonstrando que os mamutes encontrados no Novo Mundo, os elefantes asiáticos e os elefantes africanos eram espécies distintas. A inclusão dos organismos fósseis nos sistemas de classificação taxonômica, utilizando-os nas comparações com os organismos viventes, foi também uma importante novidade. Porém, a despeito da sua enorme contribuição para diversas áreas do conhecimento, em especial para a Paleontologia, Cuvier cometeu enormes erros. Um deles foi o fato de não aceitar a ideia de evolução biológica, e considerar que as extinções fossem sempre decorrentes de algum tipo de catástrofe (corrente de pensamento que ficou conhecida como Catastrofismo¹⁹), com espécies antigas, que então seriam eliminadas por tais eventos, sendo substituídas por espécies novas.

¹⁹ A teoria catastrofista afirmava que periodicamente eventos geológicos catastróficos (chamados por Cuvier de “revoluções”) ocorrem no planeta, causando grandes extinções que dizimam boa parte das espécies existentes. Após essa fase, novas espécies surgem, além das sobreviventes, que migram para os locais mais atingidos, repovoando esses ambientes. Para fortalecer sua teoria, Cuvier utilizou grandes animais fósseis do Novo e do Velho Mundo, como os proboscídeos aqui citados, afirmando que se não ocorressem tais substituições, ainda teríamos essa grande fauna existindo em algum lugar. O grande erro de Cuvier foi acreditar que apenas desta forma, pelas revoluções, é que haveria mudanças tanto nas características da superfície do planeta quanto na ocorrência de espécies biológicas. Vale lembrar que ele não acreditava na ideia de evolução biológica, mas sim defendia que as espécies eram fixas, imutáveis, ou seja, não sofreriam modificações ao longo do tempo. Sendo assim, não concebia a ideia, por exemplo, de que espécies fossilizadas poderiam ser ancestrais de espécies viventes. De acordo com as suas convicções, a modificação dos organismos ocorreria sempre por substituição das espécies antigas, dizimadas pelas revoluções, e não poderia ser de forma gradual, lenta e contínua, com pequenas alterações acumuladas ao longo do tempo, como era defendido por pesquisadores como Lamarck (a quem se opunha fortemente em várias discussões, chegando a ridicularizá-lo após a morte deste), como o geólogo britânico Charles Lyell (que utilizou a ideia de gradualismo na Geologia, para compor a sua tese do uniformitarismo), e como iria se popularizar essa ideia após a publicação dos trabalhos de Alfred Wallace e de Charles Darwin (este último em *A Origem das Espécies*), cinco décadas depois.

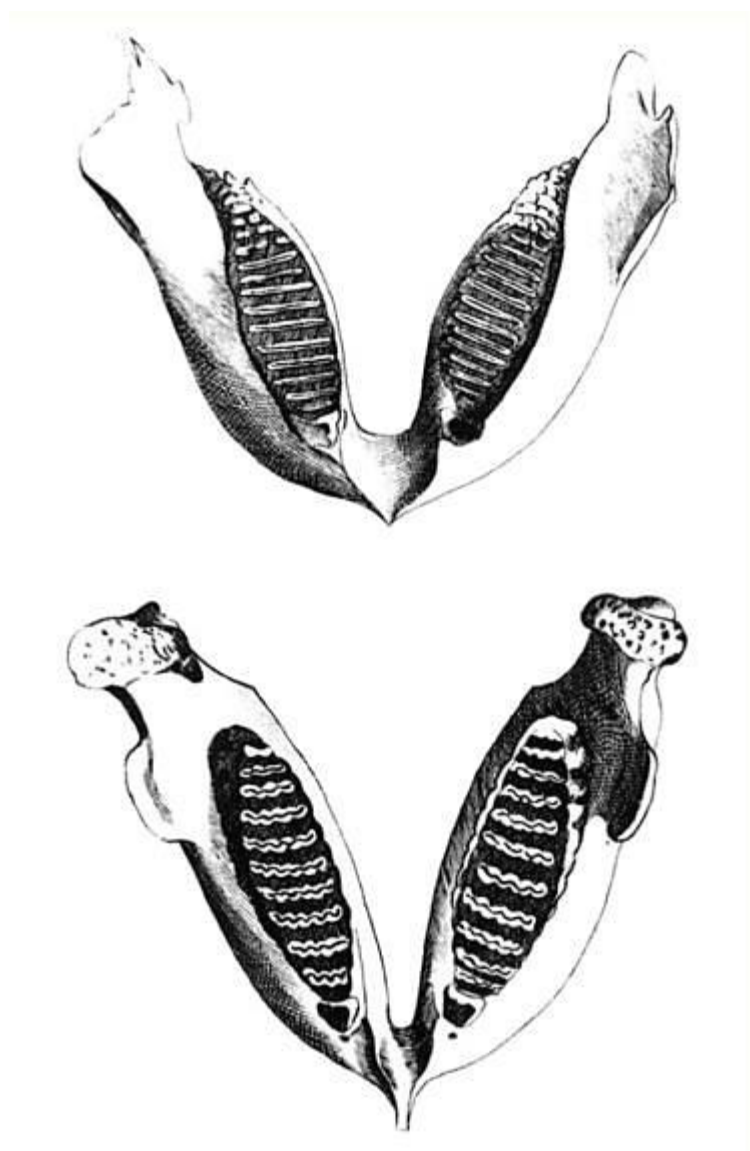


Figura 29. Ilustração comparativa entre as mandíbulas de uma espécie de mamute da América (imagem superior) e de um elefante-indiano atual (*Elephas maximus indicus*) (imagem inferior). Modificado de Cuvier (1799).

Um pouco mais tarde, no século XIX, o brilhante naturalista dinamarquês Peter Lund mudou-se para o Brasil, se estabelecendo na região de Lagoa Santa (interior do estado de Minas Gerais), atualmente bastante conhecida por conta dos famosos esqueletos do povo de Luzia. Cientificamente chamada de Hominídeo I - Lapa Vermelha IV, Luzia foi descoberta entre os anos de 1974 e 1975, por uma equipe franco-brasileira liderada pela arqueóloga Annette

Laming-Emperaire. Datada em cerca de 11,5 mil anos, constitui os restos fossilizados (portanto, evidência direta) mais antiga de humanos no nosso continente, sendo, portanto, de extrema importância para essa discussão arqueológica. Décadas antes de Luzia ser encontrada, Lund já visitava sítios da região, chegando a orientar estudos em cerca de 800 cavernas, abrigos sob rocha e grutas, fazendo inúmeras descobertas e contribuições de pesquisa. Nessas cavernas, ele se deparou com fósseis de uma fauna extinta impressionante, que incluía tigres dentes-de-sabre, cavalos, mastodontes, preguiças e tatus gigantes. Em alguns desses sítios, Lund encontrou fósseis de indivíduos humanos nos mesmos níveis estratigráficos desses animais atualmente extintos, apontando evidências, pela primeira vez para o continente, de coexistência e convivência entre eles. Essa convivência já era esperada por outros pesquisadores, porém, não havia provas claras até então. Resolvida essa dúvida, foi retomada outra questão: qual era a relação entre esses grupos humanos antigos e os outros animais que habitavam o continente americano quando eles chegaram.

De fato, ainda são raras as evidências de interação entre os humanos antigos e a megafauna, e por isso é um tema que gera inúmeras discussões mesmo atualmente. Embora haja uma quantidade considerável de sítios com indústria lítica e restos de animais da megafauna pleistocênica nos mesmos níveis estratigráficos, ainda há uma resistência da maioria dos pesquisadores em considerar que tipos de relações havia entre as populações humanas e as demais espécies encontradas na fauna brasileira e sul-americana até cerca de dez mil anos atrás. Esses pesquisadores defendem que, enquanto não houver evidências diretas (por exemplo, ossos desses animais com pontas de flechas cravadas diretamente neles), não é possível afirmar sobre a convivência e inclusive predação desses grandes mamíferos.

Diferente de períodos históricos, em que é possível acessar textos escritos de membros, observadores e pesquisadores relatando e fazendo observações diretas do seu cotidiano, nos estudos de populações antigas é necessário utilizar vestígios e evidências indiretas de suas atividades. A análise dos fósseis corporais²⁰ e de objetos utilizados por essas populações humanas pode nos dar indícios sobre a sua origem e ancestralidade, as doenças que circulavam entre esses grupos, sua alimentação, e outros hábitos de vida. Mas há também as evidências indiretas, o patrimônio imaterial, que pode ter uma importância inestimável não apenas como

²⁰ Por meio da análise de suas características anatômicas, comparando a povos de diferentes lugares do mundo. A depender do grau de preservação desses fósseis, é possível, adicionalmente, tentar extrair DNA antigo, um tipo de pesquisa que é relativamente recente no Brasil.

registro das suas expressões culturais, mas também desses hábitos de vida e de suas interações com os outros organismos que já habitavam esses territórios.

Existem algumas lendas amazônicas que podem ter se originado da convivência dos primeiros humanos no continente com a megafauna pleistocênica. O argumento é que populações já raras, quase extintas, podem ter sido vistas por alguns humanos, que tiveram contato e ficaram impressionados com esses indivíduos remanescentes. Florentino Ameghino, importante paleontólogo argentino, que descreveu inúmeros fósseis sul-americanos no século XIX, propôs que a lenda do Mapinguari²¹ pode ter se originado da observação de alguma das espécies de preguiças-gigantes, cujos últimos indivíduos podem ter sobrevivido até pelo menos cerca de 10 mil anos atrás, e convivido com populações humanas pré-ameríndias. Alguns autores não acreditam nessa versão, e apontam diferenças significativas entre o Mapinguari e as preguiças gigantes, por exemplo o fato de ele não apresentar cauda, e ser descrito assemelhando-se mais a algum tipo de primata. Além disso, essas criaturas seriam carnívoras, chegando a consumir inclusive carne humana em alguns dos relatos. Entretanto, há algumas diferentes versões da lenda do Mapinguari, e obviamente, ao longo das gerações, as informações podem sofrer inúmeras modificações, transformando as histórias em algo totalmente diferente da transmissão original.

Talvez nunca saibamos com certeza quais animais deram origem a tais histórias, ou quais seriam os limites entre o real e a imaginação nessas antigas lendas amazônicas. Entretanto, há outras evidências que podem nos fornecer mais pistas sobre com quem tivemos contato no passado. É o caso das manifestações artísticas e culturais.

Foi Lund quem registrou também, pela primeira vez, arte rupestre sul-americana. Desde então, registros têm sido feitos à medida que esse tipo de estudo se aprofunda. Pinturas rupestres, por exemplo, podem indicar sobre possíveis domesticações e manejo de animais e plantas, representando cenas da rotina dos grupos humanos antigos, com suas estratégias de subsistência, ou retratando, nas imagens, características morfológicas que indiquem algum grau de domesticação dos organismos. Outras revelações vindas das pinturas dizem respeito às

²¹ O Mapinguari seria uma enorme criatura, relatada por diversos grupos indígenas atuais que habitam a região amazônica, que se referem ao ser como sendo conhecido por gerações muito anteriores (pelos “avós dos bisavós”), às vezes descrito como um “bicho-preguiça gigante”, às vezes como um “macacão” ou “macaco-preguiça gigante”, com enormes unhas em forma de garras, barulhento, muito alto, ameaçador (pelo seu tamanho e/ou pela ferocidade, depende do relato), de andar bípede curvado, que se locomove afastando as árvores com seus enormes braços, e exalando um cheiro forte e horrível.

interações sociais entre a fauna representada²², como interações entre machos e fêmeas, disputas entre indivíduos, deslocamento de manadas, cuidado parental. Assim como a relação dos grupos humanos antigos com esses outros animais. Também fornecem indicações de plantas que eram utilizadas por essas populações, e até as que começavam a ser cultivadas ou ao menos sofriam algum tipo de manejo. Informações sobre as plantas e animais que ocorriam naquele ambiente, indicações sobre a relação dos grupos humanos com eles. Em conjunto com outras evidências arqueológicas e paleontológicas (por exemplo, análise de coprólitos, que são fezes fossilizadas, restos deixados em fogueiras e em objetos de preparação e armazenamento de alimentos), é possível saber sobre dieta, estratégias de subsistência e hábitos alimentares, cotidianos e culturais desses grupos (cerimônias rituais, hábitos de caçada, sepultamentos, etc.).

Na América do Sul, há regiões com sítios arqueológicos valiosíssimos para tais discussões. Na região Nordeste do Brasil, no estado do Piauí, há o Parque Nacional da Serra da Capivara. Criado em 1979, este Parque apresenta uma área de 130 mil hectares, onde já foram registrados mais de 1000 sítios paleontológicos e arqueológicos. Vários desses sítios abrigam centenas de pinturas e gravuras rupestres em áreas abertas, em cavernas e em abrigos sob rocha, sendo datadas em até 12 mil anos, e representando um dos maiores complexos de inscrições rupestres no mundo.

Entre essas pinturas, estão representadas cenas de danças, partos, amamentação, atividades sexuais, utilização de plantas em rituais, celebrações, conflitos, momentos de lazer e de outras interações sociais. Há também representações de atividades de coleta, de pesca, de caça em pequenos e em grandes grupos, utilizando-se diversos tipos de ferramentas, como redes de pesca e lanças, e a divisão posterior da caça entre os indivíduos. Tais registros gráficos permitem reconstituir o cotidiano dessas populações, bem como sua relação com o ambiente em que estavam inseridas. Sobre isso, o pesquisador brasileiro Justamand (2007) afirma: “As pinturas atuavam como meio de conservação das informações e conhecimentos acumulados, auxiliando no desenvolvimento desses instrumentos técnicos”²³.

É possível separar os grupos em diferentes tradições culturais, de acordo com o estilo das pinturas, e como são representados os corpos e as paisagens. Além disso, é possível também

²² Como exemplo, ver Morcote-Ríos et al (2020) e Brumm et al (2021).

²³ Michel Justamand (2007), em O Brasil desconhecido: as pinturas rupestres de São Raimundo Nonato - Piauí.

utilizar esses registros para se ter uma noção das alterações no paleoambiente ao longo do tempo: observando as pinturas mais antigas, percebemos que parte da fauna e flora representadas não ocorrem mais na região. O Parque engloba as localidades de São Raimundo Nonato, Coronel José Dias, São João do Piauí e Canto do Buriti, municípios inseridos em uma região de caatinga, um bioma brasileiro cujo clima semiárido é marcado por altas temperaturas (média de 25 a 30 °C anuais) e baixa umidade na maior parte do ano, o que leva em muitos lugares a uma vegetação com predomínio de cactáceas e outros grupos típicos de áreas secas, além da ocorrência de diversos rios de regime intermitente. Entretanto, os painéis com animais como as capivaras que, de tão comuns nas representações, dão nome ao Parque, indicam que alguns milhares de anos atrás aquela região era bastante diferente. Era bem mais úmida e com outro tipo de vegetação, que abrigava e proporcionava recursos que permitiam a manutenção das populações desses animais de grande porte.

As datações para os sítios da Serra da Capivara são fonte ainda de bastante controvérsia, mas utilizando as análises de outros tipos de vestígios acredita-se que a ocupação humana no local deve ter uma antiguidade de pelo menos 20 mil anos, o que sugere que esses primeiros grupos foram contemporâneos à megafauna pleistocênica, ou pelo menos àquelas espécies que ainda eram viventes nesse momento. De fato, os sítios paleontológicos revelam uma megafauna que circulava pela região até pelo menos 10 mil anos atrás. Já foram encontrados fósseis de tigre dentes-de-sabre, preguiças e tatus gigantes, cavalos nativos da América, camelídeos, canídeos e proboscídeos. Entretanto, não foram identificadas com segurança nenhuma pintura que demonstrasse claramente relações de contato com esses remanescentes.

Essa situação é diferente em sítios recém-descritos mais detalhadamente na região da Amazônia. Eles se mostraram ricos não apenas em artefatos líticos e em ossos desses grandes animais, mas também em surpreendentes pinturas de indivíduos humanos ao lado destes grandes animais, evidenciando a diferença de tamanho entre as espécies, além de representações do que se assemelham a instrumentos de caça. É o caso de Serranía La Lindosa. Situada no noroeste da Colômbia, ela faz parte de um complexo encontrado nos últimos anos na região amazônica. Tais sítios indicam uma ocupação humana de pelo menos 12 mil anos²⁴

²⁴ Na verdade, unindo o conjunto de evidências da arqueobotânica, da zooarqueologia e palinológicas encontradas na região, alguns pesquisadores defendem que esses primeiros grupos humanos devem ter chegado bem antes, há pelo menos 20 mil anos, mas que nesse período de 12 mil anos estavam bem estabelecidos, com algum manejo e cultivo de plantas, com estratégias mais eficientes de caça e pesca, que devem ter permitido

na região, tendo, como indícios, materiais líticos, restos de fogueiras e pinturas em dezenas de painéis em abrigos sob rocha. São desenhos de figuras geométricas, marcas de mãos, além de registros de plantas, animais, e cenas de interação entre os indivíduos humanos e toda essa diversidade local.

Uma das partes mais impressionantes desses painéis é que eles registram inclusive interações com animais com características anatômicas diferentes dos animais que encontramos atualmente em todo o continente. São animais com estruturas semelhantes a probóscides, ou com tamanhos descomunalmente maiores do que os humanos que os tentam caçar em várias das cenas representadas. Todas essas características levantam uma suspeita de que os grupos representados sejam na verdade animais atualmente extintos da megafauna, em surpreendentes registros que indicam que de fato as antigas populações humanas do continente americano coexistiram, conviveram e interagiram com esses grandes mamíferos, inclusive com estratégias de caça ou tentativas de caça.

inclusive um aumento populacional, e um conseqüente maior número de rastros e restos sendo deixados nos sítios a partir de então.



Figura 30. Alguns dos animais representados nos painéis do sítio Serranía La Lindosa (Colômbia), e suas possíveis identificações taxonômicas, indicadas pelos autores dos estudos: a. morfologia da cabeça, do tórax, garras proeminentes e tamanho representado em relação aos humanos, sugerindo semelhanças com espécies de preguiças gigantes; b. Forma do tronco e prolongamento como um focinho alongado, assemelhando-se ao encontrado em mastodontes; c. Pescoço longo e cabeça proporcionalmente de pequeno tamanho, como o encontrado em camelídeos extintos, tais quais os do gênero *Palaeolama*, e distintos dos camelídeos atuais pintados em outros painéis; d, e. Bastante semelhantes a cavalos, e pela datação das pinturas, pré-colonização europeia, se de fato foram cavalos, referem-se a uma das espécies nativas extintas; f. Animal com longo pescoço, pés com três dedos e com uma protuberância semelhante a como deveriam apresentar as macrauquênias (Família Macraucheniidae, da ordem Litopterna, hoje totalmente extinta). Imagem e legenda modificadas e adaptadas de Morcote-Ríos et al (2020).

Sendo assim, La Lindosa é uma fonte de evidências que nos demonstra que talvez ainda tenhamos muito o que encontrar e descrever de indícios que nos indiquem com quem convivíamos, quando, como era a nossa interação com esses organismos e com a paisagem em tempos remotos. E é surpreendente e maravilhoso que além das indicações mais clássicas e indiretas, como ferramentas, fogueiras e evidências de caça, possamos somar manifestações simbólicas, que além de tudo nos revelam os cenários em que toda essa dinâmica acontecia.

Materiais culturais mais recentes podem ajudar também a desvendar alguns mistérios sobre a origem de doenças. Com a chegada dos colonizadores europeus no século XV, além da violência e do modo de vida impostos pelos recém-chegados, foram trazidas também dezenas de doenças, que causaram epidemias e contribuíram para o genocídio dos povos nativos americanos. Nos séculos seguintes, espanhóis e portugueses mantiveram centenas de milhares de indivíduos negros africanos escravizados, trazendo-os para trabalharem nas colônias. Sendo assim, foi intensa a circulação de doenças entre todos os povos que foram envolvidos nesta dinâmica, e é comum atualmente, nos estudos epidemiológicos, ainda termos algumas incertezas sobre a origem das doenças mais comuns desse período.

Um exemplo são as dúvidas relacionadas às leishmanioses. Elas são, na verdade, um conjunto de doenças parasitárias, que ocorrem atualmente em mais de 80 países, tropicais e subtropicais. No caso específico da leishmaniose tegumentar americana (LTA), é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que têm como hospedeiros vertebrados diversos mamíferos, inclusive os humanos. Uma das suas formas é a cutaneomucosa (LCM), que é caracterizada por lesões agressivas, que podem atingir a região dos lábios e destruir a cartilagem do nariz, comprometendo o septo e causando mudanças anatômicas, o que resulta em deformidades na face da pessoa doente. Os primeiros registros escritos da doença constam em documentos espanhóis do século XV (aos quais se referem ao chamado “mal en las narices²⁵”), descrevendo sua ocorrência em indígenas na América do Sul. Entretanto, bem mais antigos, datando do Século Primeiro depois de Cristo, estão potes de cerâmica peruana pré-inca, além de outras peças do Equador e colombianos, que apresentam representações de humanos com mutilações nas regiões dos lábios e do nariz, lesões bastante semelhantes às aquelas causadas pela leishmaniose cutaneomucosa.

²⁵ Em português, o “mal dos narizes” ou “doença dos narizes”.



Figura 31. Exemplo de materiais culturais que podem auxiliar a desvendar alguns dos mistérios relacionados à circulação de doenças no nosso continente: vaso de cerâmica sul-americano representando um indivíduo com possíveis lesões desfigurantes. Modificado de Altamirano-Enciso et al (2003).

A partir do período histórico, é possível unir os escritos de pesquisadores que viajavam pelo continente – documentando as paisagens naturais e as interações sociais – a evidências indiretas, como pinturas, esculturas e cerâmicas. Unindo os registros etno-históricos com os objetos culturais, é possível observar que ambos ocorrem em locais que ainda hoje são endêmicos para a doença, sugerindo que, de fato, podem estar se referindo à LCM. Ela poderia

ser encontrada primeiramente aqui na América do Sul, talvez na região amazônica, posteriormente sendo difundida em outros lugares do mundo, por meio da circulação dos colonizadores europeus. Atualmente, análises moleculares dos parasitas, e outros estudos biológicos incluindo os hospedeiros, somam-se a essas evidências indiretas, reforçando a possibilidade de uma maior antiguidade da leishmaniose tegumentar cutaneomucosa na América do Sul, posteriormente se espalhando para outros continentes.

7 DIVULGAÇÃO DOS TRABALHOS REALIZADOS

Além dos trabalhos desenvolvidos durante o Doutorado, estas e outras pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia foram apresentadas em alguns eventos e espaços voltados ao público externo às Universidades e Instituições de Pesquisa. O objetivo foi manter um diálogo, e assim auxiliar a aproximação entre o meio acadêmico e a sociedade em geral. Apresentando os projetos que são desenvolvidos nestes ambientes, o propósito foi tornar mais claro como eles se relacionam com o dia a dia e a realidade de toda a população. Os resultados de tais trabalhos foram publicados posteriormente, em congressos e eventos científicos, para auxiliar na troca de informações e melhorias para projetos futuros. Estes trabalhos publicados estão exemplificados nos apêndices E e F. Outros trabalhos de divulgação científica, desenvolvidos a partir de trabalhos realizados no LPP, ou com alunos envolvidos no referido laboratório, estão exemplificados no apêndice D e anexo A.

8 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos paleoparasitológicos podem fornecer preciosas informações sobre as parasitoses e sobre os organismos envolvidos em tais interações: os parasitos, os hospedeiros – intermediários e finais –, os vetores e os reservatórios. Porém, além disso, podem contribuir também com indícios sobre o paleoambiente e os tipos de interação que provavelmente ocorriam entre os diversos organismos que ali circulavam. Infelizmente, tais possibilidades de estudos e inferências são, muitas vezes, ignoradas, resultando na escassez de trabalhos em paleoparasitologia em todo o mundo. Neste trabalho, buscou-se contribuir com estudos nessa área, e demonstrar como a realização de análises parasitológicas em materiais de coleções paleontológicas, com um olhar mais atento para evidências de ectoparasitismo e endoparasitismo, podem ser bastante úteis, contribuindo com informações não apenas sobre a paleobiologia dos organismos envolvidos, mas também sobre paleoecologia e paleoambiente.

REFERÊNCIAS

ADOVASIO, J. M.; PAGE, J. **Os primeiros americanos: Em busca do maior mistério da arqueologia**. Rio de Janeiro: Record, 2011. 399 p.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, 10, 853-882, 2003.

BARNOSKY, A. D.; KOCH, P. L.; FERANEC, R. S.; WING, S. L.; SHABEL, A. B. Assessing the causes of late Pleistocene extinctions on the continents. **Science**, v. 306, n. 5693, 70–75, 2004.

BISIO, M. C.; PANZERI, C. F.; NASCIMENTO, C. S. I.; PEIXOTO, B. C. P. M. Marrocos e suas relíquias: Novos fósseis no Marrocos apontam que a espécie humana é mais antiga do que se pensava. **Temas Atuais em Biologia**, 5, 2017.

BUCKLAND, W. XII - On the Discovery of Coprolites, or Fossil Faeces, in the Lias at Lyme Regis, and in other Formations. **Transactions of the Geological Society of London** s2-3, p. 223–236, 1829. <https://doi.org/10.1144/transgslb.3.1.223>

CALLEN, E. O.; CAMERON, T. W. M. The diet and parasites of pre-historic Huaca Prieta Indians as determined by dried coprolites. **Proceedings of the Royal Society of Canada**, Section V, p. 51-52, 1955.

CALLEN, E. O.; CAMERON, T. W. M. A prehistoric diet as revealed in coprolites. **The New Scientist** 8, p. 35-40, 1960.

CARNEIRO, M.; ANTUNES, C. M. F. Epidemiologia: introdução e conceitos. In: Neves, D.P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.

CARVALHO, I. S. Icnofósseis de vertebrados. In: Carvalho, I. S.; FERNANDES, A. C. S. (Ed.). **Icnologia**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Geologia, 2007. p. 58-73.

CARRIÓN, J.; RIQUELME, J.; NAVARRO, C.; MUNUERA, M. Pollen in hyaena coprolites reflects late glacial landscape in southern Spain. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, 176(1-4), 193–205, 2001. doi:10.1016/s0031-0182(01)0033

CHÁVEZ, M. Los animales de la Edad del Hielo: Breve historia de la fauna sudamericana. In: **Pilauco, Un Sitio Complejo Del Pleistoceno Tardío**. Valdivia: Universidad Austral de Chile, p. 19–26, 2008.

CURTIS, C.; MILLAR, C. D.; LAMBERT, D. M. The Sacred Ibis debate: The first test of evolution. **PLoS Biol** 16(9): e2005558, 2018.

CUVIER, G. Mémoires sur les espèces d'éléphants vivants et fossiles. **Magasin Encyclopédique ou Journal des Sciences, des Lettres et des Arts**, 3, p. 440–445, 1799.

DENTZIEN-DIAS, P.; FRANCISCHINI, H. Coprólitos e outros bromálitos de vertebrados. In: SEDORKO, D.; FRANCISCHINI, H. **Ichologia: interações entre organismos e substratos**. Curitiba: CRV, 2020. p. 451-478.

EKDALE, A. A.; BROMLEY, R. G.; PEMBERTON, S. G. Ichnology: The Use of Trace Fossils in Sedimentology and Stratigraphy. **Tulsa: SEPM Short Course**, 15, 1984. 317 p.

FARIA, F. F. Georges Cuvier e a constatação do fenômeno da extinção. **Boletim de História e Filosofia da Biologia** 4 (3): 8–11, 2010.

FARIA, F.; DEVÈZE, R. **Variorum das obras de Georges Cuvier: Discurso Preliminar do Recherches sur les ossemens fossiles (Investigações sobre ossadas fósseis) 1812**, contendo a Memória sobre a íbis dos antigos egípcios. E o Discours sur les révolutions de la surface du Globe (Discurso sobre as revoluções da superfície do Globo) 1825, contendo a Determinação das aves denominadas íbis pelos antigos egípcios. 2020.

FARIÑA, R. A.; VIZCAÍNO, S. F.; DE IULIIS, G. Megafauna: giant beasts of Pleistocene South America. **Encyclopedia of Ocean Sciences**, 2013.

FARIÑA, R.A.; TAMBUSO, P.S.; VARELA, L.; CZERWONOGORA, A.; DI GIACOMO, M.; MUSSO, M.; BRACCO, R.; GASCUE, A. Arroyo del Vizcaíno, Uruguay: A fossil-rich 30-ka-old megafaunal locality with cut-marked bones. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 281, p. 1–6, 2013.

FERIGOLO, J. Late Pleistocene South American land-mammal extinctions: The infection hypothesis. **Quaternary of South America and Antarctic Peninsula** 12, p. 279–310, 1999.

FERIGOLO, J. Paleopatologia em mamíferos. In: Carvalho, I. S.; Fernandes, A. C. S. (Ed.). **Ichologia**. Série Textos, nº 3. São Paulo: Sociedade Brasileira de Geologia, 2007. p. 88-107.

FERREIRA, L. F. Introdução à Paleoparasitologia. In: FERREIRA, L. F.; REINHARD, K. J.; ARAÚJO, A. **Fundamentos da Paleoparasitologia**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2011. p. 27-41.

FERREIRA, L. F.; REINHARD, K. J.; ARAÚJO, A. (org.) **Fundamentos da Paleoparasitologia**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2011. 484 p.

FUGASSA, M. H.; BELTRAME, M. O.; SARDELLA, N. H.; CIVALERO, M. T.; ASCHERO, C. Paleoparasitological results from coprolites dated at the Pleistocene–Holocene transition as source of paleoecological evidence in Patagonia. **Journal of Archaeology Science** 37, 2010. p. 880–884.

GENARO, O.; REIS, A. B. Leishmaniose tegumentar americana. In: Neves, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005. p. 47–64.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001. 218 p.

HUBBE, M.; MAZZUIA, E. T. A.; ATUI, J. P. V.; NEVES, W. **A Primeira Descoberta da América**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2003. 70 p.

HUNT, A. P.; MILÀN, J.; LUCAS, S. G.; SPIELMANN, J. A. (Ed.). **Vertebrate Coprolites**. Albuquerque: New Mexico Museum of Natural History and Science, Bulletin 57, 2012. 387 p.

JESUS, J. F. M. **Cingulados do Quaternário da Gruta da Lapinha, Iramaia, BA: morfologia, Paleoecologia e Paleopatologia**. 2019. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019. 170 p.

JUSTAMAND, M. **O Brasil desconhecido: as pinturas rupestres de São Raimundo Nonato Piauí**. Tese (Doutorado em Ciências Sociais) – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, 2007. 212 p.

LAHAYE, C.; HERNANDEZ, M.; BOËDA, E.; FELICE, G. D.; GUIDON, N.; HOELTZ, S.; LOURDEAU, A.; PAGLI, M.; PESSIS, A. M.; RASSE, M.; VIANA, S. Human occupation in South America by 20,000 BC: The Toca da Tira Peia site, Piauí, Brazil. **Journal of Archaeological Science**, v. 40, n. 6, 2013. p. 2840–2847.

LEFÈVRE, C. M.; SHARP, J. A.; NICHOLAS, K. R. Evolution of lactation: ancient origin and extreme adaptations of the lactation system. **Annual review of genomics and human genetics**, v. 11, 2010. p. 219-238.

LEVIS, C. et al. Persistent effects of pre-Columbian plant domestication on Amazonian forest composition. **Science**, v. 355, n. 6328, 2017. p. 925-931.

LINARDI, P. M.; GUIMARÃES, L. R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia da USP/FAPESP, 2000. 291 p.

MACPHEE, R. D. E.; MARX, P. A. The 40,000-year plague: humans, hyperdisease, and first-contact extinctions. In: GOODMAN, S. M.; PATTERSON, B. D. (Ed.). **Natural**

Change and Human Impact in Madagascar. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press, 1997. p. 169-217.

MARTIN, P. S. Africa and Pleistocene overkill. **Nature**, v. 212, n. 5060, 1966. p. 339-342.

MORCOTE-RÍOS, G.; ACEITUNO, F. J.; IRIARTE, J.; ROBINSON, M.; CHAPARRO-CÁRDENAS, J. L. Colonisation and early peopling of the Colombian Amazon during the Late Pleistocene and the Early Holocene: New evidence from La Serranía La Lindosa. **Quaternary International** 578, 2021. p. 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2020.04.026>

MOTHÉ, D.; AVILLA L. S.; ASEVEDO, L.; BORGES-SILVA, L.; ROSAS, M.; LABARCA-ENCINA, R.; SOIBELZON, E.; ROMAN-CARRION, J. L.; RÍOS, S. D.; RINCON, A. D.; OLIVEIRA, G. C.; LOPES, R. P. Sixty years after “The mastodonts of Brazil”: The state of the art of South American proboscideans (Proboscidea, Gomphotheriidae). **Quaternary International**, 443, 2017. p. 52–64.

MOURA, J. F.; NASCIMENTO, C. S. I.; PEIXOTO, B. DE C. P. M.; DE BARROS, G. E. B.; ROBBI, B.; FERNANDES, M. A. Damaged armour: Ichnotaxonomy and paleoparasitology of bioerosion lesions in osteoderms of Quaternary extinct armadillos. **Journal of South American Earth Sciences**, 109, 103255, 2021.

MÜTZENBERG, D.; CORRÊA, A. C. B.; CISNEIROS, D.; ASÓN, I.; FELICE, G. D.; SILVA, D. G.; KHOURY, H.; LIBONATI, R. Sítio arqueológico Lagoa Uri de Cima: Cronoestratigrafia de eventos paleoambientais no Semiárido Nordeste. **FUNDHAMentos**, v. 1, 10, 2013. p. 51-67.

NASCIMENTO, C.S.I. **Análise paleoecológica e paleoparasitológica em coprólitos de vertebrados do Quaternário do sítio paleontológico e arqueológico Lagoa Uri De Cima (Região de Sanguinho, Pernambuco, Brasil)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017. 70 p.

PESSIS, A. M.; MÜTZENBERG, D.; ASÓN, I.; CISNEIROS, D.; FELICE, G. D.; PERAZZO, M.; LAVALLE, H. Estratégias e procedimentos de escavação e documentação arqueológica. **FUNDHAMentos**, v.1, 10, 2013. p. 30-49.

REINHARD, K. J.; CONFALONIERI, U.; HERRMANN, B.; FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. Recovery of parasite remains from coprolites and latrines: aspects of paleoparasitological technique. **Homo** 37: 217-239, 1986.

NETTO, R. G.; RAMOS, K. S.; SEDORKO, D. Aplicações da Icnologia na Paleoecologia. In: Sedorko, D.; Francischini, H. **Icnologia: interações entre organismos e substratos**. Curitiba: CRV, 2020. p. 75-90.

NEVES, D. P. (ed.). **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p.

NEVES, H. M. P. In: **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

O'DEA, A. et al. Formation of the Isthmus of Panama. **Science Advances**, v. 2, n. 8, 2016. p. 1–12.

PÉREZ, A. E.; AGNOLIN, F. L. Were human-introduced diseases the responsible for Pleistocene-Holocene megafaunal extinctions? First evidence from South America. **The Holocene**, v. 31, n. 4, 2021. p. 690-693. <https://doi.org/10.1177/0959683620981673>

PIVETTA, M. 2017. *Homo Sapiens* no centro da América do Sul. **Revista Pesquisa FAPESP** 85. p. 82–85.

PROUS, A. **O Brasil antes dos brasileiros: a pré-história de nosso país**. Rio de Janeiro: Jorge Zahar, 2006. 142 p.

QVARNSTRÖM, M.; NIEDŹWIEDZKI, G.; TAFFOREAU, P.; ŽIGAITĚ, Z.; AHLBERG, P.E. Synchrotron phase-contrast microtomography of coprolites generates novel palaeobiological data. **Scientific Reports**, 7, Article ID 2723, 2017.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 404 p.

SÁNCHEZ-MORALES, I. The Clovis lithic assemblage from El Fin del Mundo, Sonora, Mexico: Evidence of upland campsite localities. **PaleoAmerica**, 4, 2018. p. 76–81.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal**. São Paulo: Edgard Blücher, 1988. 140 p.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**. 5 ed. São Paulo: Santos, 2002. 620 p.

SEDORKO, D.; FRANCISCHINI, H. (Org.). **ICnologia: interações entre organismos e substratos**. Curitiba: CRV, 2020. 672 p.

SOIBELZON, L. H. Broken Zig-Zag: una nueva hipótesis sobre las causas de la extinción de los megamamíferos en América del Sur. **Museo**, v. 3, n. 22, 2008. p. 24–28.

SOUTO, P. R. F. (Org.). **ICnologia de paleovertebrados**. Rio de Janeiro: Letra Capital, 2017. 197 p.

SOUTO, P. R. F. Coprólitos. In: SOUTO, P.R.F. **ICnologia de paleovertebrados**. Rio de Janeiro: Letra Capital, 2017b. p. 57-92.

SIANTO, L.; OLIVEIRA-SANTOS, J. D.; MAGALHÃES, J. G.; TEIXEIRA-SANTOS, I.; SILVA, L. H. S.; SALDANHA, B. M.; KLEIN, E.; SILVA, P. A.; CHAME, M. Coprólitos, sedimentos e fezes de animais do sítio arqueológico Lagoa Uri de Cima: análise preliminar. **FUNDHAMentos**, v. 1, 10, 2013. p. 129-147.

VELDEN, F. F. V. Realidade, ciência e fantasia nas controvérsias sobre o Mapinguari no sudoeste amazônico. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**. Ciências Humanas, 11, 2016. p. 209–224.

WOOD, J. R.; WILMSHURST, J. M.; WAGSTAFF, S. J.; WORTHY, T. H.; RAWLENCE, N. J.; COOPER, A. High-Resolution Coproecology: using coprolites to reconstruct the habits and habitats of New Zealand's extinct upland Moa (*Megalapteryx didinus*). **PLoS ONE** 7(6): e40025, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040025>

GLOSSÁRIO

Termos utilizados em Parasitologia

Agente infeccioso – organismo que produz infecção em outros organismos.

Cepa – linhagem dentro da espécie de um agente infeccioso, caracterizada por determinadas características da sua biologia (especificidades da sua propagação, grau de virulência etc.).

Ciclo heteroxeno – quando, para completar o seu ciclo vital, o parasito necessita passar, em uma sequência determinada, por mais de um hospedeiro. Aqueles em que passam as primeiras fases do seu ciclo, são os hospedeiros intermediários; onde vivem a sua forma adulta são os hospedeiros definitivos.

Ciclo monoxeno – quando o parasito depende de apenas um hospedeiro para completar o seu ciclo de vida. Se ele passar para outro hospedeiro, irá repetir os mesmos passos do seu desenvolvimento, e os mesmos eventos fisiológicos.

Epidemiologia – estudo da distribuição da doença na população (por ex., por faixa etária, sexo, renda) e os fatores relacionados à sua frequência. Por exemplo, certas doenças tropicais que estão mais relacionadas à geografia e fatores socioeconômicos da população.

Fonte de infecção – organismos, objetos ou substâncias (alimento ou água, por exemplo) a partir dos quais um agente infeccioso pode passar diretamente para um hospedeiro.

Incidência – frequência (por tanto, em porcentagem) de uma doença em um período de tempo e em uma parte específica da população (por exemplo, ocorrência de determinada infecção na população de homens adultos no Brasil, nos últimos dois anos).

Parasito eurixeno – pode infectar várias diferentes espécies de hospedeiros.

Parasito estenoxeno – pode infectar apenas uma ou poucas espécies bastante próximas.

Prevalência – número total de casos da doença na população, em um determinado período (anos ou décadas, por exemplo).

Reservatório – organismo (geralmente sendo pouco patogênico para este), sedimentos, substratos ou matéria orgânica onde habitam e se reproduzem os agentes infecciosos, passando posteriormente para os hospedeiros.

Vetor – organismo que atua como veículo, transmitindo um parasito entre diferentes hospedeiros.

Virulência – gravidade e velocidade com que um agente infeccioso (vírus, bactéria ou outro) pode causar lesões no hospedeiro.

Zoonose – doenças transmitidas naturalmente entre humanos e outros animais. Ex.: toxoplasmose e raiva.

APÊNDICES

PUBLICAÇÕES RESULTANTES DAS PESQUISAS DE DOUTORADO

APÊNDICE A

Artigo “Lesions in osteoderms of pampatheres (Mammalia, Xenarthra, Cingulata) possibly caused by fleas”, publicado no ano de 2020, na revista Acta Tropica.

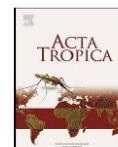
Acta Tropica 211 (2020) 105614



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Lesions in osteoderms of pampatheres (Mammalia, Xenarthra, Cingulata) possibly caused by fleas



Carolina Santa Isabel Nascimento^{a,*}, Jorge Felipe Moura^a, Beatriz Robbi^b, Marcelo Adorna Fernandes^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Laboratório de Paleocologia e Paleoecologia, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, km 235, São Carlos, SP, Brasil

^b Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, km 235, São Carlos, SP, Brasil

ARTICLE INFO

Keywords:

Paleoparasitology
Siphonaptera
Pampatheriidae
Tunga perforans
Holmesina

ABSTRACT

In this study, the first records of lesions in osteoderms of *Holmesina*, a group of fossil cingulates related to armadillos, possibly caused by the action of penetrating fleas (Siphonaptera) are described. Three individuals of *Holmesina cryptae* (Pampatheriidae) were collected from Quaternary sediments in Lapinha Cave (Iramaia, Bahia state, Brazil). Their osteoderms were analyzed by stereomicroscope and scanning electron microscopy and alterations on their surfaces were recognized. We found 63 marks distributed in 23 of 1300 analyzed osteoderms (approximately 1.8% of the total of osteoderms), characterized by vertical cavities with well-delimited circular borders similar to those lesions made by Tungidae fleas in extant mammals. These records indicate that there was an interaction between penetrating fleas and pampatheres during the Quaternary in Brazilian Intertropical Region, and contribute to the understanding of the evolution of these ectoparasites and the relationship with their hosts.

1. Introduction

Xenarthra is a superorder of placental mammals endemic to the American continent; anteaters and sloths (order Pilosa) and armadillos (order Cingulata) are the extant representatives of this group (Delsuc et al., 2001). Cingulates are the only mammals that have osteoderms (dermal bony plates) (Hill, 2006; Krmptotic et al., 2015). However, isolated osteoderms have also been found in the tegument of extinct ground sloths from the family Mylodontidae (Hill, 2006).

In cingulates, hundreds of articulated osteoderms form a tegumentary armor that is divided in: a) the cephalic shield, dorsally on the head; b) the carapace, dorsolaterally on the trunk; and c) the caudal sheath completely surrounding the tail, except in *Cabassous* (Hill, 2006; Krmptotic et al., 2015; Fernicola et al., 2017; Moura et al., 2019). The carapace can be subdivided depending on the species (see Fernicola et al., 2017). In pampatheres and living armadillos the carapace consists of three regions — scapular buckler and pelvic buckler that are composed of fixed osteoderms, and bands (or belts) region composed of movable osteoderms (Fig. 1) (Góis et al., 2013; Moura et al., 2019). Moreover, keratinous scales form the most external layers of the armor (Hill, 2006; Chen et al., 2011).

In the same specimen, the osteoderms may have different

morphologies and ornamentations. The external surface of the fixed osteoderms only has an exposed (or ornamental) surface with ornamentations and piliferous foramina. The movable and pelvic semi-movable present an exposed surface divided in an intermediate and a posterior portion (Fig. 2). In addition, there is an articular surface that is imbricated under the posterior portion of an osteoderm of the anterior band, thus allowing carapace articulation (Góis et al., 2013).

Some ectoparasites may lodge in these osteoderms. Ezquiaga et al. (2015) recently described *Tunga perforans*, a flea species that pierces the bone tissue of cingulate osteoderms. Marks related to the actions of these fleas were observed in osteoderms of fossil armadillos and glyptodonts (Hammond et al., 2014; Tomassini et al., 2016; Lima and Porpino, 2018). In this paper, we describe for the first time lesions possibly caused by fleas in osteoderms of pampatheres, a group of fossil cingulates.

2. Materials and methods

2.1. Geographic context

The studied osteoderms in this work are from Lapinha Cave, one of the largest limestone caves in Iramaia Municipality in Bahia state,

* Corresponding author.

E-mail address: carolina.staisabel@gmail.com (C.S.I. Nascimento).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105614>

Received 10 February 2020; Received in revised form 26 June 2020; Accepted 30 June 2020

Available online 02 July 2020

0001-706X/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

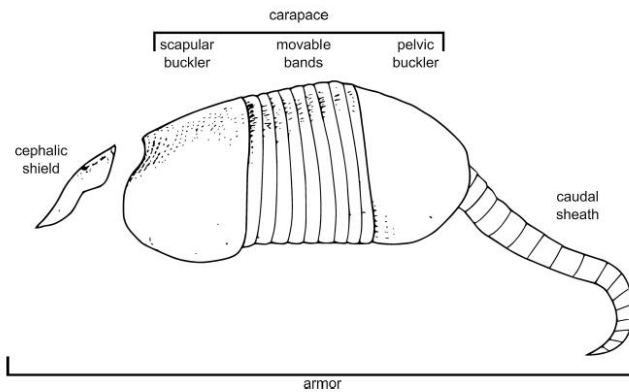


Fig. 1. Schematic drawing of armor of *Dasyptus novemcinctus*, with a carapace divided into two bucklers (scapular and pelvic) and intermediate bands.

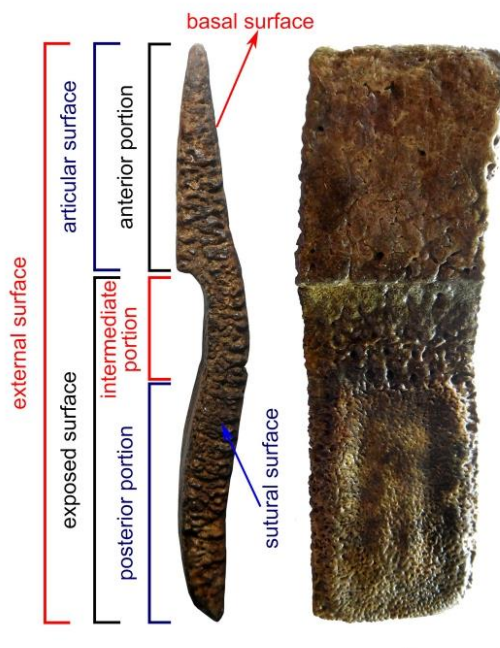


Fig. 2. Nomenclature of movable pampatheriid osteoderms proposed by Góis et al. (2013) represented in an osteoderm of *Holmesina cryptae* (LPP-PV-003) in lateral and dorsal (external) view. The terms “external” and “basal” surfaces are proposed by Scheyer and Sander (2004). Scale bar = 20 mm.

Brazil (Fig. 3). Its lithology is part of Gabriel and Nova América Units (Salitre Formation — Neoproterozoic) (Vieira et al., 2005) and presents bone accumulation of Quaternary mammals (Moura et al., 2019). The osteoderms were found associated to three individuals of *Holmesina cryptae* (Pampatheriidae) that were partially covered by the cave sediment (Moura et al., 2019).

2.2. Osteoderms analyses

The analyzed material corresponds to 1300 osteoderms of three *Holmesina cryptae* (Pampatheriidae) specimens from Lapinha Cave that are registered as LPP-PV-001, LPP-PV-002 and LPP-PV-003 in the paleontological collection of the Paleocology and Paleoichnology Laboratory (LPP)–Ecology and Evolutionary Biology Department (DEBE), Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo state, Brazil. In this paper the osteodermal nomenclature is in accordance with Góis et al. (2013) (Fig. 2).

LPP-PV-001 is the specimen that has the largest number of elements of the endoskeleton and armor, followed by LPP-PV-002, and LPP-PV-003. First, a macroscopic inspection of the osteoderms of the three specimens was performed to identify alterations in their surfaces. The osteoderms that presented such alterations were separated and measured with a mechanical caliper (accuracy of 0.02 mm). Photographs were taken with a camera Leica DFC 295 coupled to a stereomicroscope Leica M205C with an object-glass Planapo 1.0x and produced by composition of multiple pictures using the software LAS (Leica Application Suite) v3.7. The injured osteoderms were observed with a scanning electron microscope (SEM). These microscopic methods were made at Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira (INCT–Hympar Sudeste), in DEBE, UFSCar.

The software ImageJ 1.51n Fiji was used to measure the area of the osteoderms and the lesions because these shapes are not geometrically regular. With these values, it was then possible to calculate the proportional lesioned area of the osteoderms. The means and standard deviations of the measurements are shown in Table 1.

The observed lesions were compared with those in osteoderms of other cingulates and tetrapods described in literature. The nomenclature used by Britt et al. (2008) and Matthias et al. (2016) was followed to describe and classify the marks.

3. Results

3.1. Description of the lesions

Perforation marks were observed in 23 of 1300 examined osteoderms (approximately 1.8% of the total). In some of them there was more than one mark, totaling 63 injuries. They are vertical cavities with a well-delimited circular border that reach the trabecular bone zone (Type 1) or the compact bone zone (Type 1*) (Figure 4 and Figure 5). The means of the areas of the lesions vary between 0.10 cm² and 1.10 cm². The marks occupy 15.74 ± 1.8% of the exposed surface of the

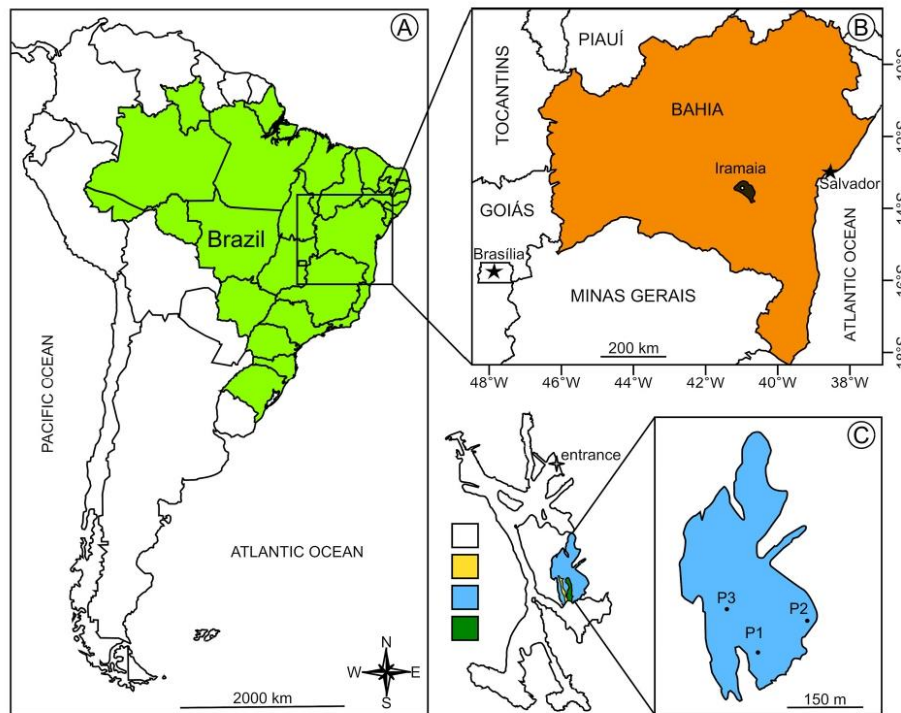


Fig. 3. Map and location of Lapinha Cave. A–B, location of Iramaia Municipality in Bahia state, Brazil. C, map of Lapinha Cave highlighting its second lower level and the points where the fossils were found (adapted map provided by GPME Speleology Group). Legend of C: white, ground level of the cave; yellow, first lower level; light blue, second lower level; and dark green, third lower level of the cave. Abbreviations: P1, P2 and P3 (LPP-PV-001, 002 and 003, respectively), the sites where the pampatheres were collected. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1

Means and standard deviation of the measurements of the marked osteoderms and their lesions of three specimens of *Holmesina cryptae*.

Specimen	Type of lesion	Armor region	Qty. of ost.	Osteoderm dimensions		Lesion dimensions		Proportional dimensions of PPOS in movable and semimovable osteoderms		
				Length (cm)	Area (cm ²)	Lesion area (cm ²)	Lesion area/ area ost. (%)	PPOS length (cm)	PPOS area (cm ²)	Lesion/ area PPOS (%)
LPP-PV-001	1	cephalic	4	3.06 ± 0.39	6.82 ± 1.01	1.13 ± 0.49	16.14 ± 4.54			
		scapular	18	3.74 ± 0.92	9.59 ± 3.62	1.38 ± 1.09	16.52 ± 16.4			
	ASM	8	4.68 ± 0.31	13.86 ± 1.21	1.79 ± 1.38	12.54 ± 8.68				
		movable	9	9.67 ± 1.52	26.40 ± 7.13	2.55 ± 0.66	9.36 ± 9.10	4.16 ± 0.36	11.49 ± 2.15	14.16 ± 13.93
	PSM	1	8.80	27.27	1.76	6.44	3.90	13.77	8.97	
		pelvic	5	5.56 ± 0.55	16.37 ± 3.33	1.36 ± 1.48	8.07 ± 7.37			
	caudal	8	3.18 ± 1.31	6.46 ± 3.46	0.98 ± 0.68	22.56 ± 19.5				
		1*	cephalic	1	3.93	9.17	0.21	2.25		
	scapular		3	3.02 ± 0.40	6.15 ± 1.19	0.10 ± 0.03	1.67 ± 0.03			
	PSM	1	6.70	18.57	0.24	1.29	3.77	11.27	1.56	
PSM		1	6.70	17.01	1.67	9.81	4.01	10.49	11.98	
LPP-PV-002	1	pelvic	1	5.40	13.70	3.36	24.51			
		scapular	1	5.03	13.82	0.66	4.75			
LPP-PV-003	1	ASM	1	4.57	12.39	0.45	3.59			
		1*	pelvic	1	1.85	2.42	0.10	3.68		

Type 1 lesions reach the trabecular bone zone; and Type 1* lesions reach the compact bone zone of the osteoderms. ASM – anterior semimovable band; ost. – osteoderm; PPOS – posterior portion of the ornamented surface; PSM – posterior semimovable band; Qty. – quantity.

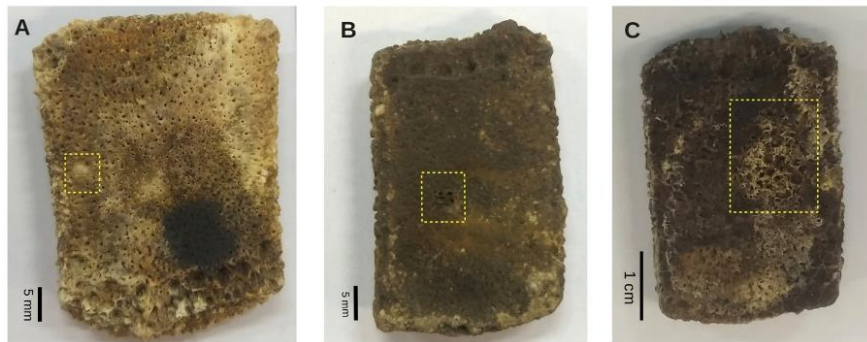


Fig. 4. Osteoderms of *Holmesina cryptae* evidencing the possible lesions caused by penetrating Siphonaptera. A. LPP-PV-001-500, showing a lesion of Type 1* that reaches the compact bone zone of the osteoderm; B and C. LPP-PV-001-514 and LPP-PV-001-518, respectively, showing Type 1 lesions that reach the trabecular bone zone of the osteoderms. B and C are similar to honeycomb-like lesions, caused by several fleas simultaneously housed in the region, which can indicate high infestation in the host.

osteoderms. The lesions and their distributions are described in Table 1.

4. Discussion

The observed marks in the osteoderms show a well-defined pattern that is repeated in several parts of the armor in all three individuals. This indicates consistency with the condition of being not random and being of biological origin.

Superina et al. (2009) observed various injuries in osteoderms of the euphractine armadillo *Zaedyus pichiy* that were caused during intraspecific fights, predator attacks or abrasion in contact with the environment, mostly during digging. Fiorelli (2010) observed predation marks in osteoderms of crocodyliiforms from the Upper Cretaceous of Argentina, whereas Avilla et al. (2004) described bite marks on a crocodylomorph and interpreted them as the result of intraspecific

interaction. However, the injuries that were analyzed in this study do not resemble those of teeth, nails or claws.

The marks described here are similar to lesions caused by penetrating fleas. This idea is reinforced by the fact that in all examined specimens, they were only present in the external surface of the osteoderms, but not in the endoskeletal elements. This also indicates that the lesions were made *ante mortem*. Moreover, the movable and posterior semimovable osteoderms showed the marks only in the exposed surface.

The marks observed in the osteoderms are similar to the lesions caused by insects of the order Siphonaptera, commonly known as fleas. Adults of Siphonaptera are laterally flattened, holometabolous, with accentuated sexual dimorphism (Rey, 2010; Linardi, 2011). Fifteen living families of this order are known, and the penetrating and semi-penetrating species are included in the family Tungidae (Linardi and

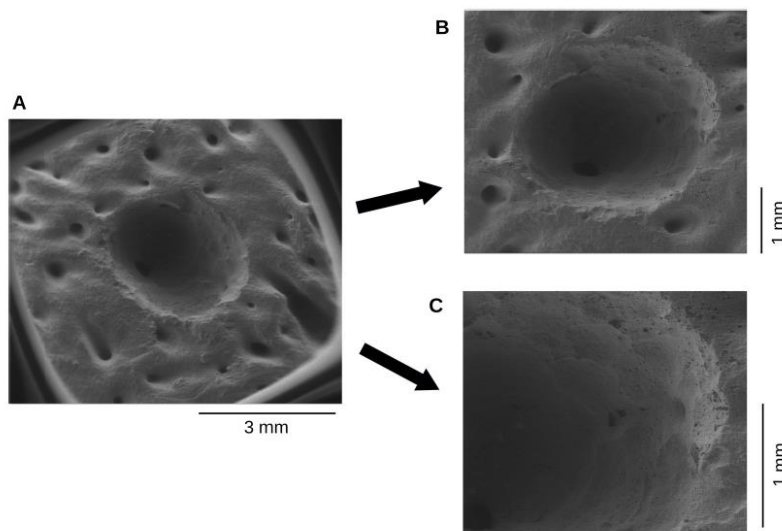


Fig. 5. A-C. Lesion in LPP-PV-001-500 observed in Scanning Electron Microscope, under different amplifications: (A) 41x; (B) 67x; and (C) 131x, highlighting the details of the excavations possibly made by an individual of penetrating Siphonaptera.

Guimarães, 2000). *Tunga* is considered one of the most specialized genera in the order because the adult females are penetrating ectoparasites (Linardi and Guimarães, 2000; Ezquiaga et al., 2008, 2015; Tomassini et al., 2016). After mating and fertilization, the females suffer morphological alterations while housed in the host body, resulting in the formation of the neosoma, a cuticle thickening and body hypertrophy (Audy et al., 1972; Linardi and Avelar, 2014). The size and the shape of the neosoma vary according to the flea species and the host (Linardi and Guimarães, 2000). For example, in the case of *Tunga penetrans* in the human host skin, its body can increase about 2000 times in 10 days (Miller et al., 2019).

Several species of fleas that parasitize xenarthrans are known, but studies about their relationship are scarce in the literature. The Type 1 marks observed in *H. cryptae* resemble the lesions caused by *Tunga perforans* perforating osteoderms of *Chaetophractus vellerosus* and *Zaedyus pichiy* (Ezquiaga et al., 2015). In living cingulates, *T. perforans* females pierce the osteoderm and position themselves with the anterior region inwards the armadillo tegument (Ezquiaga et al., 2015). Similar marks were also described by Tomassini et al. (2016) in *Chasicotatus ameghinoi* and *Vetelia perforata* fossils from Miocene, while Hammond et al. (2014) observed them in carapaces of *Z. pichiy* in an archeological context. More recently, Lima and Porpino (2018) also described marks in fossils of cingulates from the Brazilian Intertropical Region. In all these studies, the perforations are described as circular verticalized erosions (Lima and Porpino, 2018) on the external surface of the osteoderms, sometimes reaching the trabecular zone (Tomassini et al., 2016) or even perforating completely through the osteoderm (Hammond et al., 2014; Ezquiaga et al., 2015).

In the samples observed with SEM, perforation marks correspond to a verticalized cavity with a well-defined circular border. They differ from the regular foramina of the osteoderm and from crating or pitting marks (horizontal superficial erosion structures) (see Matthias et al., 2016). Some of them erode only the compact bone zone (type 1*) but they also resemble the marks described by Tomassini et al. (2016), which were attributed to *T. perforans*.

In the present time, various species of fleas parasitize different species of armadillos and other xenarthrans. However, for now *T. perforans* is the only recorded species perforating the osteoderms of cingulates (Ezquiaga et al., 2015; Tomassini et al., 2016).

The variation in size of the lesions may be related to the concomitant infestation with several fleas, forming a kind of cluster and thus increasing the size of these observed perforations. Humans can be infested with large numbers of *T. penetrans*, with dozens of females causing multiple cutaneous lesions and forming a cluster called honeycomb-like lesions (Kehr et al., 2006; Cestari et al., 2007) when lodged very close to each other (Linardi, 2005; Miller et al., 2019). In these cases that there is a great number of parasites, mainly in limbs, a difficult in the movement can occur (Kehr et al., 2006), as well as ulcerations and osseous and tendinous necroses (Matias, 1989). In *H. cryptae*, in cases of high infestation possibly could have been malaise caused by dermatitides and ulcerations, and some difficulty in movement and locomotion depending on where these clusters occurred. However, in this work, evidences of ectoparasites was identified just in the armor, in regions that provide insufficient information about these possible conditions.

Observing marks of osteophagous insects in bones of the sauropod *Moabosaurus utahensis* from the Cretaceous, Britt et al. (2017) verified that usually the articular surfaces, condyles and processes are preferably eaten by these insects. These authors also observed the absence of many parts of the bones, assigning it to the action of osteophagy and trampling by larger vertebrates. Britt et al. (2009) pointed out that osteophagy could have a negative impact on the fossil record due to the loss of paleobiological and taphonomic information. Only five groups of osteophagous insects are known: beetles (Coleoptera, Dermestidae), termites (Blattodea, Isoptera, several families), mayflies (Ephemeroptera, Polymitarcyidae), moths (Lepidoptera, Tineidae) (Britt et al.,

2008) and ants (Hymenoptera: Formicidae) of the genus *Nylanderia* (Go 2018).

Dermestids in pupation usually produce pits (oval cavities) (Huchet et al., 2011). These coleopterans in general consume the surfaces and subsurfaces of the bones (Britt et al., 2017) and they need a subaerial environment to perform osteophagy (Britt et al., 2008). Isoptera can attack exposed and buried bones, producing tunnels in the bones and in the soil (surrounding mud) (Huchet et al., 2011). Mayfly nymphs need a subaquatic environment (Britt et al., 2017) and tineids are very destructive (Huchet et al., 2011). However, the exposed and dry cave environment where the skeletons of *H. cryptae* were found excludes the presence of mayflies and dermestids, and the preservation degree of the bones and osteoderms indicates absence of tineids, termites and ants. Furthermore, the marks registered in the present study do not resemble those described for these insects, being more similar to those lesions made by penetrating fleas of the genus *Tunga*.

5. Conclusions

In this paper, lesions found in osteoderms of pampatheres *Holmesina cryptae* are described. The pattern of the marks and their distribution in the examined individuals strongly suggest an *ante mortem* and biological origin. The cause of the lesions was attributed to the action of fleas with tungid behavior, which suggests a parasite-host interaction between penetrating Siphonaptera and pampatheres during the Quaternary of Brazilian Intertropical Region. There are still few records of this type of lesion, and further studies are needed in this group of fossil animals and their living representatives.

CRedit authorship contribution statement

Carolina Santa Isabel Nascimento: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing - original draft. **Jorge Felipe Moura:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing - original draft. **Beatriz Robbi:** Methodology, Writing - original draft. **Marcelo Adorna Fernandes:** Conceptualization, Project administration, Resources, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interests

All authors declare no conflict of interest related to this study.

Acknowledgments

We thank to Ericson C. Igual, Luís A. Joaquim, and all the team that collected the material; Professor Angélica Maria Penteado Martins Dias, coordinator of Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia dos Hymenoptera Parasitoides da Região Sudeste Brasileira (INCT - Hympar Sudeste - Processo FAPESP 2008/57949-4 e CNPq 573802/2008-4) who provided the usage of the microscopic equipment (Stereomicroscope and SEM); Dr. Luciana Bueno dos Reis Fernandes (DEBE/UFSCar), for the photographs taken by stereomicroscope and SEM; and to anonymous reviewers whose suggestions improved the manuscript. This work was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) - Finance Code 001 (J.F.M.J. and C.S.I.N. scholarships and financial aid respectively).

References

- Audy, J.R., Radovsky, F.J., Vercammen-Grandjean, P.H., 1972. Neosomy: radical intrastadial metamorphosis associated with arthropod symbioses. *J. Med. Entomol.* 9, 487–494.
- Avilla, L.S., Fernandes, R., Ramos, D.F., 2004. Bite marks on a crocodylomorph from the

- upper cretaceous of Brazil: evidence of social behavior? *J. Vertebr. Paleontol.* 24, 971–973.
- Britt, B.B., Scheetz, R.D., Dangerfield, A., 2008. A suite of dermestid beetle traces on dinosaur bone from the upper jurassic morrison formation, Wyoming, USA. *Ichnos: Int. J. Plant Anim.* 15, 59–71.
- Britt, B.B., Eberth, D.A., Scheetz, R.D., Greenhalgh, B.W., Stadtman, K.L., 2009. Taphonomy of debris-flow hosted dinosaur bonebeds at Dalton Wells, Utah (Lower Cretaceous, Cedar Mountain Formation, USA). *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 280, 1–22.
- Britt, B.B., Scheetz, R.D., Whiting, M.F., Wilhite, D., 2017. *Moabosaurus utahensis*, n. gen., n. sp.: a new sauropod from the Early Cretaceous (Aptian) of North America. *Contrib. Mus. Paleontol.* 32, 189–243.
- Cestari, T.F., Pessato, S., Ramos e Silva, M., 2007. Tungiasis and myiasis. *Clin. Dermatol.* 25, 158–164.
- Chen, I.H., Kiang, J.H., Correa, V., Lopez, M.I., Chen, P.Y., McKittrick, J., Meyers, M.A., 2011. Armadillo armor: mechanical testing and micro-structural evaluation. *J. Mech. Behav. Biomed.* 4, 713–722.
- Delsuc, F., Czefflis, F.M., Stanhope, M.J., Douzery, E.J.P., 2001. The evolution of armadillos, anteaters and sloths depicted by nuclear and mitochondrial phylogenies: implications for the status of the enigmatic fossil *Eurotamandua*. *Proc. R. Soc. B.* 268, 1605–1615.
- Ezquiaga, M.C., Lareschi, M., Abba, A.M., Navone, G.T., 2008. Nuevos registros de pulgas (Siphonaptera) parásitas de dasipódidos (Mammalia: Xenarthra) en el noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozool. Neotrop.* 15, 193–196.
- Ezquiaga, M.C., Linardi, P.M., Avelar, D.M., Lareschi, M., 2015. A new species of *Tunga* perforating the osteoderms of its armadillo host in Argentina and redescription of the male of *Tunga terasma*. *Med. Vet. Entomol.* 29, 196–204.
- Femicola, J.C., Rinderknecht, A., Jones, W., Vizcaíno, S.F., Porpino, K., 2017. A new species of *Neoglyptatelus* (Mammalia, Xenarthra, Cingulata) from the Late Miocene of Uruguay provides new insights on the evolution of the dorsal armor in cingulates. *Ameghiniana* 55, 233–252.
- Fiorelli, L.E., 2010. Predation bite-marks on a peirosaurid crocodyliform from the Upper Cretaceous of Neuquén Province, Argentina. *Ameghiniana* 47, 387–400.
- Go, M.C., 2018. A case of human bone modification by ants (Hymenoptera: Formicidae) in the Philippines. *Forensic Anthropol.* 1, 117–123.
- Góis, F., Scillato-Yané, G.J., Carlini, A.A., Guilherme, E., 2013. A new species of *Scirotherium* Edmund & Theodor, 1997 (Xenarthra, Cingulata, Pampatheriidae) from the late miocene of South America. *Alcheringa* 37, 177–188.
- Hammond, H., Lareschi, M., Zilio, L., Ezquiaga, M.C., Castro, A., 2014. Placas óseas perforadas de *Zaedyus pichiy* en un contexto arqueológico: ¿elementos confeccionados antropticamente o generados por agentes biológicos? Un abordaje interdisciplinario. *Atek Na [En la tierra]* 4, 9–36.
- Hill, R.V., 2006. Comparative anatomy and histology of xenarthran osteoderms. *J. Morphol.* 267, 1441–1460.
- Huchet, J.B., Deverly, D., Gutiérrez, B., Chauchat, C., 2011. Taphonomic evidence of a human skeleton gnawed by termites in a Moche-civilisation grave at Huaca de la Luna, Peru. *Int. J. Osteoarchaeol.* 21, 92–102.
- Kehr, J.D., Heukelbaech, J., Mehlhorn, H., Feldmeier, H., 2006. Morbidity assessment in sand flea disease (tungiasis). *Parasitol. Res.* 100, 413–421.
- Krmpotic, C.M., Ciancio, M.R., Carlini, A.A., Castro, M.C., Sciarano, A.C., Barbeito, C.G., 2015. Comparative histology and ontogenetic change in the carapace of armadillos (Mammalia: Dasypodidae). *Zoomorphology* 134, 601–616.
- Lima, F.C.G., Porpino, K.O., 2018. Ectoparasitism and infections in the exoskeletons of large fossil cingulates. *PLoS ONE* 13, 1–19.
- Linardi, P.M., Guimarães, L.R., 2000. *Sifonápteros do Brasil*. Museu de Zoologia da USP/FAPESP, São Paulo.
- Linardi, P.M., 2005. Siphonaptera. In: Neves, D.P. (Ed.), *Parasitologia Humana*. Atheneu, São Paulo, pp. 397–411.
- Linardi, P.M., 2011. Checklist of Siphonaptera (Insecta) from São Paulo State, Brazil. *Biota Neotrop* 11, 607–617.
- Linardi, P.M., Avelar, D.M., 2014. Neosomes of tungid fleas on wild and domestic animals. *Parasitol. Res.* 113, 3517–3533.
- Matias, R.S., 1989. Epidemia de tungiase no Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22, 137–142.
- Matthias, A.E., McWhinney, L.A., Carpenter, K., 2016. Pathological pitting in ankylosaur (Dinosauria) osteoderms. *Int. J. Paleopathol.* 13, 82–90.
- Miller, H., Ocampo, J., Ayala, A., Trujillo, J., Feldmeier, H., 2019. Very severe tungiasis in amerindians in the amazon lowland of Colombia: a case series. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007068.
- Moura, J.F., Góis, F., Galliani, F.C., Fernandes, M.A., 2019. A new and most complete pampatherid (Mammalia, Xenarthra, Cingulata) from the Quaternary of Bahia, Brazil. *Zootaxa* 4661, 401–444.
- Rey, L., 2010. *Bases da Parasitologia Médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Scheyer, T.M., Sander, P.M., 2004. Histology of ankylosaur osteoderms: implications for systematics and function. *J. Vertebr. Paleontol.* 24, 874–893.
- Superina, M., Garner, M.M., Aguilar, R.F., 2009. Health evaluation of free-ranging and captive pichis (*Zaedyus pichiy*; Mammalia, Dasypodidae), in mendoza province, Argentina. *J. Wildl. Dis.* 45, 174–183.
- Tomassini, R.L., Montalvo, C.I., Ezquiaga, M.C., 2016. The oldest record of flea/armadillos interaction as example of bioerosion on osteoderms from the late Miocene of the Argentine Pampas. *Int. J. Paleopathol.* 15, 65–68.
- Vieira, A.T., Melo, F., Lopes, H.B.V., Campos, J.C.V., Bomfim, L.F.C., Couto, P.A.A., Bevenuti, S.M.P., 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, Estado da Bahia. Diagnóstico do Município de Iramaia. Ministério de Minas e Energia do Brasil, Salvador, Bahia, Brazil.

APÊNDICE B

Artigo “Damaged armour: Ichnotaxonomy and paleoparasitology of bioerosion lesions in osteoderms of Quaternary extinct armadillos”, publicado em 2021, na revista Journal of South American Earth Sciences.

Journal of South American Earth Sciences 109 (2021) 103255



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of South American Earth Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsames



Damaged armour: Ichnotaxonomy and paleoparasitology of bioerosion lesions in osteoderms of Quaternary extinct armadillos

Jorge Felipe Moura^{a,*}, Carolina Santa Isabel Nascimento^a, Bernardo de C.P. e M. Peixoto^a, Gabriel E.B. de Barros^b, Beatriz Robbi^c, Marcelo Adorna Fernandes^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Laboratório de Paleocologia e Paleoicnologia, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, KM 235, São Carlos, SP, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP), Universidade de São Paulo (USP), Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Conservação da Fauna, Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luís, km 235, São Carlos, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Trace fossil
New ichnotaxa
Mycosis
Tunga
Paleopathology
South America
Pleistocene
Megafauna

ABSTRACT

Osteoderms are dermal ossifications present in several vertebrates and assemble a carapace on armadillos. Here we describe ichnotaxonomically two types of bioerosion traces as well as paleopathologically ulcerative lesions on osteoderms of three specimens of Late Pleistocene *Holmesina cryptae* armadillos (Xenarthra, Cingulata, Pampatheriidae) found in Lapinha Cave, Iramaia municipality, Bahia State, Brazil. The traces are always on the external surface of the osteoderms, none on endoskeleton elements, which are also different from bites and taphonomic process marks. This is evidence of the biological and *syn vivo* origin of the traces, making them remarkable and useful to access animal health. *Karethraichnus minimum* isp. nov. are individual holes interpreted as produced by sand flea sessile females, probably from the *Tunga* genus, based on already described lesions in living armadillos. This trace reveals a paleoparasitism behavior useful for tracking this relation deep in time in armoured animals. *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. is formed by consecutive tiny holes, forming an overall elliptical/violin-like shape. This is attributed to lesions produced by the action of fungi over osteoderms, similar to mycose-like dermatophytosis (ringworm) in modern mammal skin. In contrast, the ulcerative lesions are recorded as necrosis of bone material, producing a corrosive-like disruption on the external surface of the osteoderms formed by irregular pits and exposition of spongy bone. These are ulcerative lesions probably produced by secondary infections by microorganisms such as fungi or bacteria, or even a destructive immunological response. This would begin as a more restricted lesion with several potential agents for this: abrasion from the soil, plants; lesions from intraspecific fights or predation; dermatitis; ectoparasites (e.g., mites, ticks, fleas, mosquitoes) or initial mycosis or bacterial infection. Since a bioerosive process cannot be demonstrated and is rather unlikely for the ulcerative lesions, these structures are not considered trace fossils. It is reasonable to assume that the flea lesion *Karethraichnus minimum* isp. nov. and fungal lesion *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. could lead to an ulcerative lesion. As *syn vivo* traces, all these are tools to access the health of the animals to which the osteoderm belongs. Further support on ectoparasite and infection studies on living armoured animals would even allow inferences regarding extinct populations and interpretations of ancient ecosystems.

1. Introduction

Osteoderms are dermal ossifications present in the integument of various vertebrate groups (Hill, 2005; Vickaryous and Sire, 2009). Lesions are often observed in such elements (Nascimento et al., 2020) that can be produced *syn vivo* (*ante mortem*), such as those caused by abrasion

with vegetation or soil, as a result of intra/interspecific interactions, or having a pathological or ectoparasitic origin (Superina et al., 2009); lesions produced during death, even that caused death, in case of a fatal injury (e.g., perforation, fall, predation); or they may be *post mortem*, a result of scavenging, and other taphonomic processes (Avilla et al., 2004; Fiorelli, 2010; De Lima and Porpino, 2018).

* Corresponding author.

E-mail addresses: mouradejesus@gmail.com (J.F. Moura), carolina.staisabel@gmail.com (C.S.I. Nascimento), b.peixoto@protonmail.com (B.C.P.M. Peixoto), gbareabarros@usp.br (G.E.B. de Barros), bia_robby_93@gmail.com (B. Robbi), mafernandes@ufscar.com (M.A. Fernandes).

<https://doi.org/10.1016/j.jsames.2021.103255>

Received 30 September 2020; Received in revised form 24 February 2021; Accepted 24 February 2021

Available online 1 March 2021

0895-9811/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

In an ichnological point of view, some of these lesions in fossil osteoderms are bioerosion trace fossils, and the record of behavior is of living organisms in osteoderm hard substrates (Bromley, 1996; Vallon et al., 2016). The interpretation of the process, the producer, and when the trace fossil were engraved on the osteoderms allows us to access paleoecological and taphonomic information concerning the animal to which the osteoderms belonged. This makes it much more useful in the study of South American Pleistocene fauna as the main causes that led to the relatively recent disappearance of these animals are still being actively discussed, and there is little data from Brazil (e.g., Hubbe et al., 2007; Cione et al., 2015; Marshall et al., 2015; Surovell et al., 2016; Villavicencio et al., 2016; Monjeau et al., 2017; Pino et al., 2019, and references therein).

Having said that, here we describe two new ichnospecies of bioerosion trace fossils in osteoderms of *Holmesina cryptae* (Mammalia, Xenarthra, Cingulata, Pampatheriidae). We sustain that these traces were produced *syn vivo* and interpret them as lesions produced by fleas, fungi, and bacteria. As *syn vivo* traces, they are useful to access the health of an armoured animal and the description of these new ichnotaxa are the establishment of a tool that can be applied to other individuals or even populations, whether of Cingulata or other armoured animals.

1.1. Osteoderms and their lesions

Osteoderms are present in several tetrapod groups such as amphibians, sauropsids (Lepidosauria, Archosauria, Testudines, 'Parareptilia',

and Placodontia), and are only known in synapsids in some Permian Varanopidae; some extinct sloths (dispersed in the skin) (Hill, 2005; Vickaryous and Sire, 2009; McDonald, 2018) and are in all Cingulata (McDonald, 2018; Bergqvist et al., 2019). The Cingulata armour (Fig. 1A) consists of hundreds of osteoderms that articulate with each other and that mainly cover the dorsolateral region. The armour is divided into: the cephalic shield; the carapace (dorsal shield) covering the thoracolumbar and pelvic regions of the body, and the caudal sheath surrounding the tail (or caudal tube in some glyptodonts), except for the genus *Cabassous* (naked-tailed armadillos) (Hill, 2006; Femicola and Popino, 2012; Kmpotic et al., 2015; Moura et al., 2019). Scattered osteoderms may also be within the integument of the rostrum, the ventral part of the trunk, and the dorsum of the limbs, although not forming continuous shields in those areas (Soibelzon et al., 2006; Kmpotic et al., 2015).

Different lineages of Cingulata have different carapace compositions (see Femicola et al., 2017). The carapace of extant armadillos (Fig. 1A) and Pampatheriidae have a scapular and a pelvic buckler of fixed osteoderms separated by a banded shield composed of bands (belts) of movable osteoderms (three bands in all Pampatheriidae) (Cartelle and Bohórquez, 1984; Chen et al., 2011; Góis et al., 2013).

Xenarthra osteoderms grow in the papillary and reticular layers of the dermis (Hill, 2006; Chen et al., 2011). They are formed by compact bone tissue containing osteons, as well as a trabecular region (corresponding respectively to the cortical and spongy bone in Pirrone et al., 2014a) containing mainly adipose bone marrow (yellow), but there may

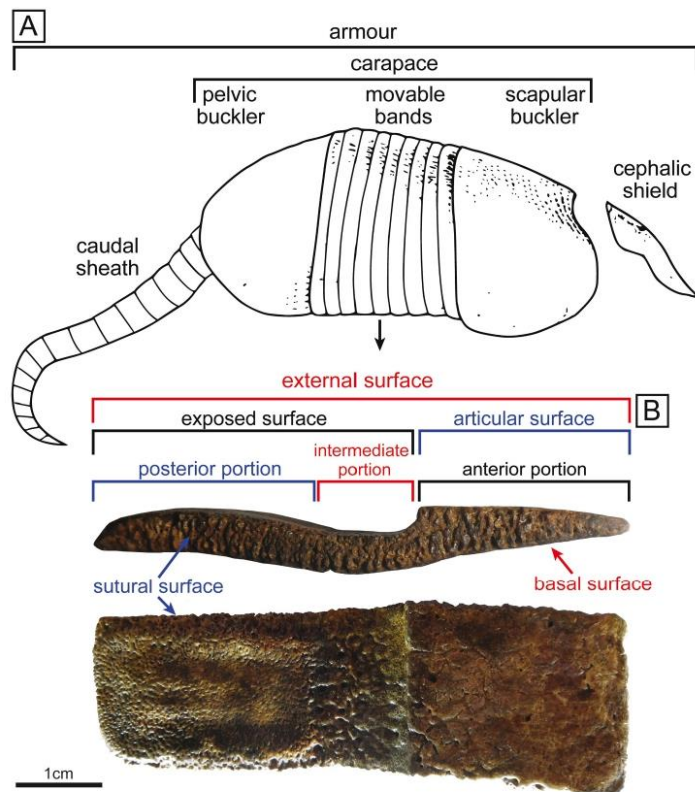


Fig. 1. Armadillo armour scheme. A. Nomenclature of parts in armour (*Dasyus novemcinctus* - nine-banded armadillo). B. Nomenclature of the parts of an osteoderm from movable bands of *Holmesina cryptae*. Although the terminology "external" and "exposed" suggest "environmental contact", these osteoderms comprise dermal bony tissue and are recovered by other integumentary tissues (dermal upper layer and epidermis including horny scales). Osteoderm nomenclature follows Scheyer and Sander (2004), Hill (2006), Kmpotic et al. (2009), Góis et al. (2013), and Kmpotic et al. (2015). Image modified from Nascimento et al. (2020).

also be red bone marrow (Hill, 2006; Krmpotic et al., 2009, 2015).

The osteoderm basal surface faces the hypodermis, whereas the external surface is overlaid by a thin dermal layer of loose connective tissue and more externally by the epidermis attached to a highly keratinized layer forming horny scales (exposed to the air) (Scheyer and Sander, 2004; Hill, 2006; Krmpotic et al., 2009, 2015). The sutural surface is where the osteoderms articulate with each other and are interconnected by a dense connective tissue with Sharpey fibers (Krmpotic et al., 2009, 2015). Sharpey fibers also anchor the osteoderm basal surface to the hypodermis and its external surface to the epidermis (Scheyer and Sander, 2004; Hill, 2006; Krmpotic et al., 2009, 2015).

Movable osteoderms are rectangular, longer than wide, and are arranged differently (Hill, 2006). They are interconnected laterally to their adjacent one to form a band (Fig. 1A), thus the bands imbricate anteroposteriorly partially overlapping the next one (see Fig. 3 in Góis et al., 2013). Accordingly, movable osteoderms (also pelvic semimovable osteoderms) are morphologically distinct from others and their external surfaces are divided into: the articular surface that coincides with the anterior portion (overlapped surface) that is smooth and lacks a cornified epidermis on its external surface; and the ornamented or exposed surface (formed by the intermediate and posterior portions), that despite the name, is covered by dermis and scales; it is rougher and ornamented. The intermediate portion is a transverse depression (Hill, 2006; Krmpotic et al., 2009; Góis et al., 2013; Krmpotic et al., 2015, Fig. 1B).

Semimovable osteoderms limit the region between each carapace buckler with the movable bands. The scapular (anterior) semimovable

osteoderms entirely overlap the articular surface of the movable osteoderm of the first band, and the basal surface of the movable osteoderms of the last band overlaps the articular surface of the pelvic (posterior) semimovable osteoderms (Krmpotic et al., 2009; Góis et al., 2013, Fig. 3).

There are piliferous and glandular foramina on the external surface of the osteoderms of all Cingulata. These structures, punctuations, sulci, elevations and depressions of the surface form figures and ornamentations characteristic of each species (Scillato-Yané et al., 2005; Hill, 2006; Góis et al., 2013; Tomassini et al., 2016), in contrast, the basal surface is smooth with neurovascular foramina and pits for lamellar corpuscles (Hill, 2006; Vickaryous and Sire, 2009; Krmpotic et al., 2015). The lesions described here are different morphologically and structurally from foramina of osteoderms (Ciancio et al., 2019): (1) the lesions have a random distribution on the external surface of the osteoderm, without a preferential location. Osteoderm foramina have a predictable location and an aggregate arrangement (see Ciancio et al., 2019); (2) the lesions do not have the same depth of foramina, which advance to the internal structure of the osteoderm; (3) they differ from neurovascular bundles in which they are on the external surface of the osteoderm, unlike the neurovascular bundles that are present on the basal surface of the osteoderm; (4) the lesions have a deformed or coarse rim, differing from the foramina, which have a smooth border and a very rounded rim (see Ciancio et al., 2019, Figs. 1-5).

We summarise a review of the publications describing lesions in vertebrate armours in Table 1. It is important to note that despite several

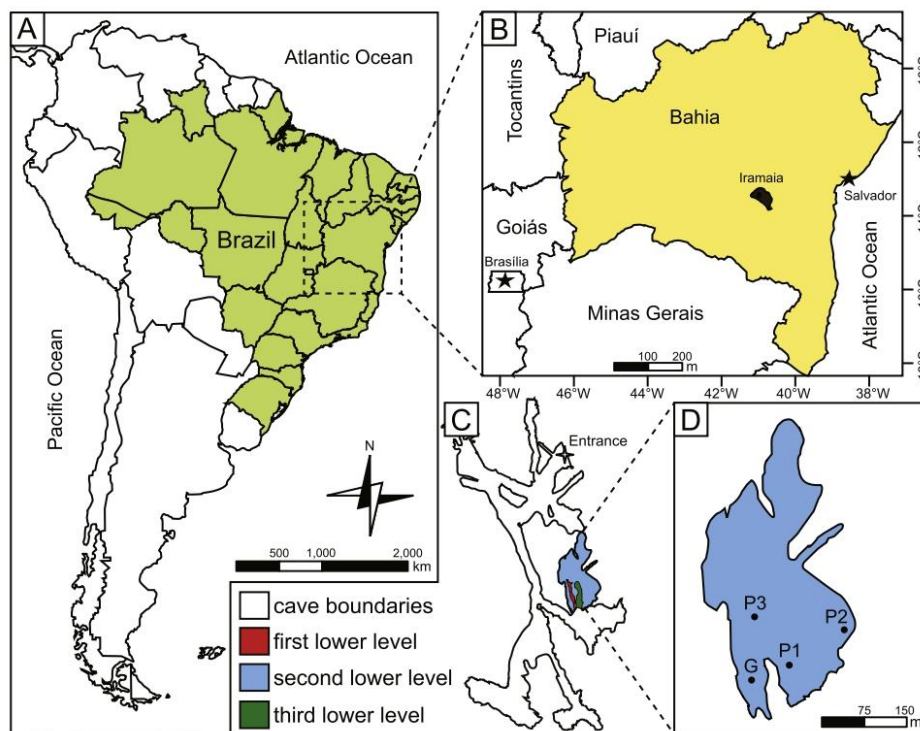


Fig. 2. Map and Location of the Lapinha Cave ($-13.3209843^{\circ}/-40.9793787^{\circ}$). A. Bahia State location in Brazil. B. location of the Municipality of Iramaia, in the state of Bahia, Brazil. C. map of the Lapinha cave. D. highlighting its second lower level and points where the fossils were found (map adapted from GPME). Abbreviations: G = place where glyptodonts were collected; P1, P2 and P3 = places where the three Pampatheriidae specimens were collected (modified from Moura et al., 2019).

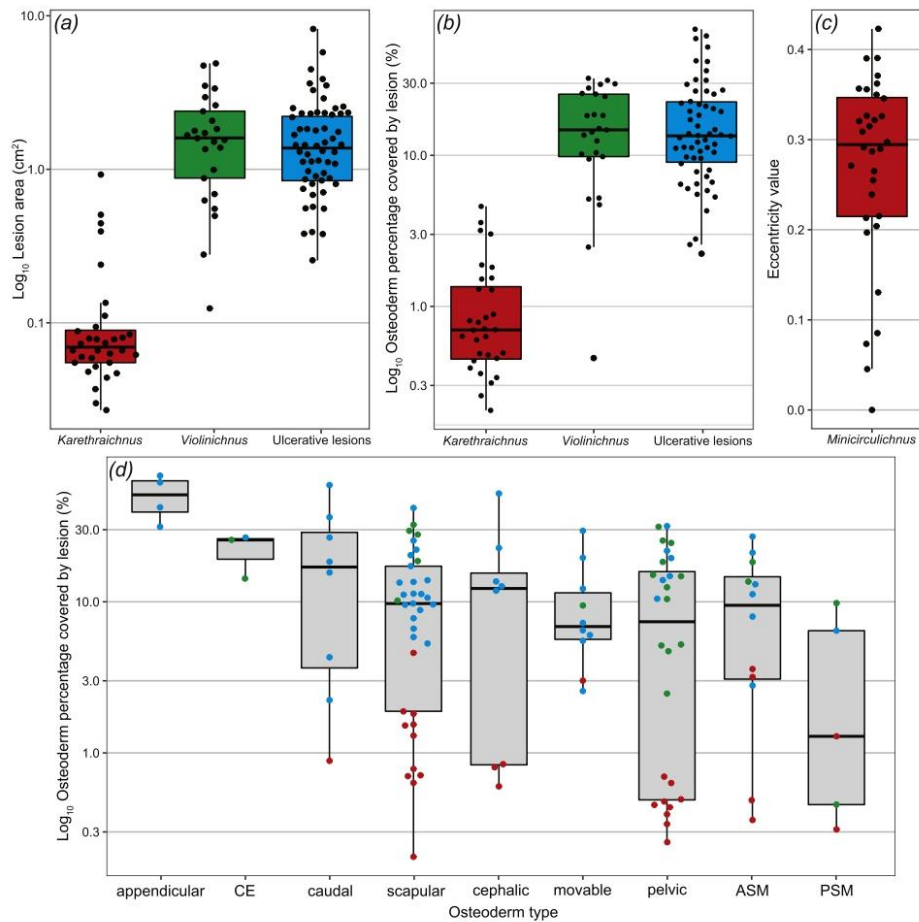


Fig. 3. Osteoderm traces and ulcerative lesion measurements in boxplots with first (Q_1) and third (Q_3) quartiles and median (M_0). *a.* Lesion area ($\text{Log}_{10} \text{cm}^2$) in the three different lesion types; *b.* Percentage ($\text{Log}_{10} \%$) of osteoderm covered by the lesion in the three different types; *c.* Eccentricity value of the lesion *Karethraichnus minimum* isp. nov., ranging from perfectly round (0) to ellipsoid ($0 < e < 1$) (Ayoub, 2003). The closest to 1, the greater the difference between length and width; *d.* Osteoderm percentage covered by the lesion divided by the type of osteoderm and type of lesion. CE = carapace edge; ASM = anterior semi-movable; PSM = posterior semi-movable; Red = *Karethraichnus minimum* isp. nov.; Green = *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov.; Blue = Ulcerative lesions. Raw data and R script in Supplementary Material. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

publications addressing pathologies and parasitic interactions in animals with osteoderms, we stick to those describing lesions in osteoderms.

1.2. Geological and geographic context

Lapinha Cave (Gruta da Lapinha) is located in the Iramaia municipality, Bahia State, Brazil ($-13.3209843^\circ / -40.9793787^\circ$) (Fig. 2). This carbonate (laminated limestone) cave measures 1777.47m in length and is about 641m above sea level and presents an accumulation of Quaternary mammals (Moura et al., 2019). Its lithology corresponds to Gabriel and Nova América undivided Units (Salitre Formation — Neoproterozoic) (Vieira et al., 2005). Three specimens of *Holmesina cryptae* (family Pampatheriidae) from the Lujanian South American Land Mammal Age — SALMA (Late Pleistocene) were found on the second

lower level of the cave during an expedition of the speleologists of the *Grupo Pierre Martin de Espeleologia* (GPME) in 2012 and 2014 (Moura et al., 2019). The endoskeletons of the specimens were completely articulated and partially covered by loose clastic sediment of the cave that forms the superficial stratum (silt and thin small plates that are breakdown fragments of the bedrock). The osteoderms were not articulated but associated and superficially scattered around the endoskeletal elements. At the same site, osteoderms and bones of juvenile specimens of glyptodont were found (Moura et al., 2019).

Given the integrity of the material found, it is likely that the three individuals of *H. cryptae* died inside the cave, with no biostratigraphic signs of transport or abrasion on the bones and osteoderms. Only desiccation marks were observed on the surface of the endoskeletal elements, probably because the Gruta da Lapinha environment is dry; Behrensmeyer (1975) points out that the organic components of bones,

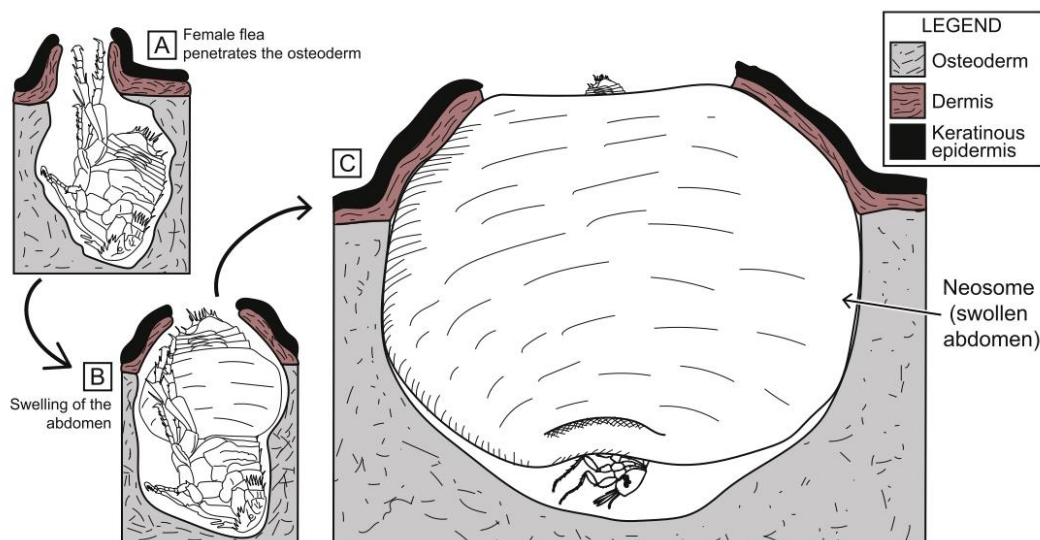


Fig. 4. Interpretative drawing of the process of sand fleas (*Tunga* sp.) infection in armadillo osteoderms. (A) Female flea (~1 mm) penetrates the upper layers of the integument (epidermis, dermis and osteoderm), the free-range male fecundates them from the outside. The abdomen of the female begins to swell (B). After being totally swollen into a neosome (C), the cavity in the osteoderm formed by the flea neosome (swollen abdomen inside the host integument) is *Karethraichnus minimum* isp. nov. Scheme based on Mehlhorn (2016). Not to scale.

such as collagen, dehydrate quickly in drier environments, resulting in bone cracking. In contrast, despite being found in the same chamber, the remains of the glyptodonts suffered some transportation, showing abrasion marks, and some elements were fragmented. This material was found spread in the middle of clasts from landslides of an upper level of the cave.

2. Material and methods

The three *Holmesina cryptae* specimens are registered as LPP-PV-001, LPP-PV-002, and LPP-PV-003, and deposited in the paleontological collection of the *Laboratório de Paleoeccologia e Paleoicnologia* (LPP) at the Department of Ecology and Evolutionary Biology (DEBE) at the Federal University of São Carlos (UFSCar), in São Carlos, São Paulo, Brazil.

This published work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank, the online registration system for the ICZN. The ZooBank LSIDs (Life Science Identifiers) can be resolved and the associated information viewed through any standard web browser by appending the LSID to the prefix 'zoobank.org/'. The LSID for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub:74135EB5-845D-4F2A-B2B9-C1FD4D3A14B9. The LSID for the *Karethraichnus minimum* isp. nov. described here is urn:lsid:zoobank.org:act:D3C4BAA8-BECA-4AC1-B9A8-4902C551B427 for the new ichnospecies. The LSID for the *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. described here are urn:lsid:zoobank.org:act:7A3B88B5-2B51-474C-93B0-A35FF1C01ABD for the new ichnogenus, and urn:lsid:zoobank.org:act:D8431407-A891-4544-AC55-C69178AD3C33 for the new ichnospecies. The *Holmesina cryptae* holotype (LPP-PV-001) which hold some of the traces described here is registered in Zoobank under the LSID: urn:lsid:zoobank.org:act:C0EF7033-E8B8-47B5-97CC-937AD0811401.

Each osteoderm has a catalog subnumeration (LPP-PV-00Y-XXXX; Y = animal number; XXXX = osteoderm number) that follows the main catalog number of its specimen (see [Supplementary Material Table S1](#)). Besides, two osteoderms of a juvenile glyptodont individual from the

same cave and collection (LPP-PV-005-0051 and 0052) with a lesion between them were also analysed and described here (Sup. Mat. Fig. S2).

The traces in the osteoderms were analysed under a stereomicroscope and the lesions were measured with a mechanical caliper (calibration 0.5 mm) and photographed. The photographs were taken with a Leica DFC 295 camera coupled to a Leica M205C stereomicroscope with Planapo 1.0x objective and produced by assembling multiple photos using the LAS software (Leica Application Suite) v3.7. Part of the material was observed using the Scanning Electron Microscope (SEM FEI Quanta 250), in low-vacuum mode with uncoated specimens, HV 15.00 kV, 3.5 Spot, and WD 10.2–14.1 mm. The traces in the images were measured using ImageJ 1.51n Fiji and Zeiss ZEN 2.5 (Blue Edition).

For the osteoderm nomenclature, we followed Scheyer and Sander (2004), Hill (2006), Krmpotic et al. (2009), Góis et al. (2013) and Krmpotic et al. (2015). To describe the traces, we used the works of Britt et al. (2008), Pirrone et al. (2014a), Matthias et al. (2016), and Wisshak et al. (2019). The general guidelines for nomenclature and the ichnotaxonomical approach were given by Bertling et al. (2006), Rindsberg (2015), Rindsberg (2018). The specific ichnological approach for traces in bones (e.g., ichnotaxobases, nomenclature) was given by Pirrone et al. (2014a), Höpner and Bertling (2017) and Wisshak et al. (2019). We consider as valid bioerosion ichnotaxa those reviewed by Wisshak et al. (2019).

The graphics and statistical data were produced in the R (4.0.3) language using the integrated development environment RStudio (1.3.1073). The 'readxl' (Wickham and Bryan, 2017) package was used to support the import of Excel files ('.xls' and '.xlsx') into R. The 'ggplot2' (Wickham, 2011) package was used to produce the graphics of the paper, together with the 'ggridges' (Wilke, 2018) package for the production of ridgeline plots. We used 'stats' (R Core Team, 2013) base package for R to produce the results of statistical analysis of significant differences between the samples and normality tests.

For the normality, we used the Shapiro-Wilk test (Royston, 1982), and for significant differences, we chose Kruskal-Wallis (Hollander and

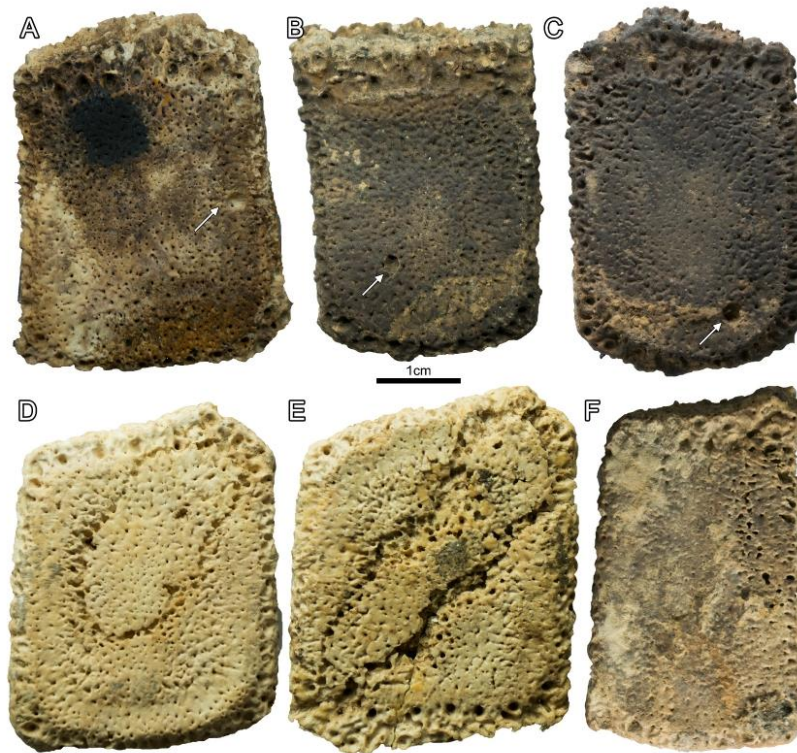


Fig. 5. Osteoderms of *Holmesina cryptae* with *Karethraichnus minimum* isp. nov. lesions. A. Holotype: LPP-PV-001-0500; B. Paratype 1 (LPP-PV-001-0509) and C. Paratype 2 (LPP-PV-001-0508), and osteoderms of *Holmesina cryptae* with *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. lesions. D. Holotype: LPP-PV-002-0201; E. Paratype 1 (LPP-PV-002-0200) and F. Paratype 2 (LPP-PV-001-0524).

Wolfe, 1973) and Mann-Whitney-Wilcoxon (Bauer, 1972) for paired analysis. We chose Kruskal-Wallis and Mann-Whitney-Wilcoxon due to the data being non-parametric. The 'moments' (Komsta and Novomestky, 2015) package was used to identify the presence of data skewness, as well as its value using the D'Agostino (D'Agostino, 1970) test of skewness. The 'multimode' (Ameijeiras-Alonso et al., 2018) package was used to identify whether the data was uni or multimodal using the ACR test (Ameijeiras-Alonso et al., 2019). Null (H_0), alternative (H_1) hypotheses, p -values, and statistical results can be found in the Supplementary Material Tables S4–S5. The R script can be found in the Supplementary Material.

One of the tests was used to understand how 'un-circular' (eccentricity) the flea traces were. We used the work of Ayoub (2003) as a basis. The eccentricity of a conic section is defined by: P is any point on a conic section, the eccentricity is defined to be the ratio PF/PC , where PF is the distance of P from the conic section focus F , and PC is its distance from the directrix corresponding to this focus. With equation: $e = (\sqrt{a^2 - b^2})/a$, where e is the eccentricity value, a is the radius of the lesion in the length direction, and b is the radius of the lesion in the width direction, the e result will be a number between 0 and ∞ , where: $e = 0$ is a perfect circle; $0 < e < 1$ is an ellipse, where the closer to 1, the more elliptical this conic section is; $e = 1$ is a parabola, and $e > 1$ is a hyperbola. In the case of lesions, it is not possible to be a parabola or hyperbola, therefore the data will be: $e = 0$ (perfect circle) and $0 < e < 1$ (ellipse). For a more detailed mathematical description of the method,

see Ayoub (2003).

3. Results and discussion

3.1. Distribution of the traces in the carapace

115 traces were found in 101 osteoderms, which is equivalent to approximately 7.7% of the total material studied. The lesions were found in osteoderms from different regions of the armour of the *H. cryptae* specimens, the ulcerative lesions are the most frequent (~51%), followed by *Karethraichnus minimum* isp. nov. (~27%), and *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. (~21%). Moreover, 32% of the traces are in scapular osteoderms, followed by pelvic (~24%), anterior semimovable (~10%), movable (~9%), caudal (~7%), cephalic (~7%), posterior semimovable (~4%), appendicular (~3%), and carapace edge (~2%). There is no preferential distribution of the lesion type concerning the type of osteoderm (Fig. 3D). Osteoderms in which there is a greater presence of certain types of lesions (i.e., appendicular osteoderms with ulcerative lesions), the sample is too small to infer any hypothesis. This is probably due to the larger sample of certain types of injuries, in this case, ulcerative.

These lesions were previously analysed by Nascimento et al. (2020), where 'Type 1' and 'Type 1*', have been named as *Karethraichnus minimum* isp. nov. The interpretation of the flea producer remained, but there is an alteration of some samples to the ulcerative lesions (see

Table 1
Vertebrate armour traces and lesion records. Lesion records caused by fleas in Table 2.

Animal	Lesion cause	Material	Reference
Cingulata	Fungi	Living	Wenker et al. (1998)
Cingulata	Fractures	Fossil	Alexander et al. (1999)
Cingulata	Diverse	Living	Superina et al. (2009)
Cingulata	Bacteria <i>Mycobacterium leprae</i>	Living	Superina and Loughry (2012)
Cingulata	Infection	Fossil	Barbosa and Luna (2014)
Cingulata	Flea borings	Living	Hammond et al. (2014)
Cingulata	Flea borings	Living	Ezquiaga et al. (2015)
Cingulata	Circular borings attributed to parasitism (probably fleas)	Fossil	Pirrone and Luna (2015)
Cingulata	Flea borings	Fossil	Tomassini et al. (2016)
Cingulata	Flea borings and infection	Fossil	De Lima and Porpino, 2018
Cingulata	Flea borings	Living	Ezquiaga et al. (2020)
Cingulata	Flea boring and other invertebrates	Fossil	Perea et al. (2020)
Cingulata	Flea borings (the same material described here)	Fossil	Nascimento et al. (2020)
Crocodylians	Bites	Fossil	Avilla et al. (2004)
Crocodylians	Necrotizing dermatitis. Surficial bacterial/fungal infection	Fossil	Wolff et al. (2007)
Crocodylians	Bites	Fossil	Fiorelli (2010)
Dinosaur	Bites	Fossil	Marinho and Iori (2011)
Dinosaur: Ankylosauridae	Ulcerative pits	Fossil	Matthias et al. (2016)
Lizards	Pathologic ossification of regenerated tail osteoderm	Fossil	Sullivan (1979)
Reptiles	Diverse	Living	Maas, 2013
Reptiles: Testudines	Diverse	Living	Schoemaker (2016)
Turtles	Dermatitis/ulcerations. Secondary microorganism infection	Living	Biot (2017)
Turtles	Ectoparasites/mesoparasites borings	Fossil	Zonneveld et al. (2015)
Turtles	Abrasions, indentations, fractures, and fire damage	Living	Biagini and Corti (2018)
Turtles	Bites	Fossil	De Valais et al., 2020
Turtles	Bivalve borings	Fossil	Sato and Jenkins (2020)

section 3.3., and samples in Sup. Mat. Tables S1 and S2).

The observations that the lesions present well-defined patterns that are repeated in more than one region of the armour of the same individual, and more than one individual, are highly consistent with the condition of being of biological origin.

3.2. Ichnotaxonomy

Ichnogenus: *Karethraichnus* Zonneveld et al., 2015.

Type ichnospecies: *Karethraichnus lakkos* Zonneveld et al. (2015).

Original Diagnosis: Circular to subcircular holes bored into a bone substrate. Holes may penetrate fully through the substrate or terminate within the bone. Penetrative holes may have straight or convex vertical margins. Non-penetrative pits terminate within the substrate as a shallow, bowl-shaped pit or as a deeper shaft with a rounded, blunt, or pointed terminus (Zonneveld et al., 2015).

Emended Diagnosis: Circular to elliptical holes in bony armour substrates produced always from the outside. Holes may pass through the armour elements or terminate within the bone. Those passing through the armour may have straight or convex vertical walls. Those that do not pass through the armour terminate within the substrate as a shallow, bowl-shaped pit or as a deeper shaft with a rounded, blunt, or pointed terminus.

Remarks: *Karethraichnus* has a striking paleoecological and behavioural relevance: *Karethraichnus lakkos* (Zonneveld et al., 2015), *K. zaratan* (Sato and Jenkins, 2020) and *Karethraichnus minimum* isp. nov. are always on the external surface of the host bony armour and, despite *K. fale* passes through it, they were probably all bored from the outside, with *K. lakkos* and *K. fale*, and *K. zaratan* bearing signs of bone healing (Zonneveld et al., 2015; Sato and Jenkins, 2020). This is evidence that these traces were produced by ectoparasite/endobiotic organisms when the animals were alive. Therefore, it is reasonable to restrict *Karethraichnus* to traces in bony armours, on its external surface or with evidence that this was bored from the outside, representing a *syn-vivo* relation, whether an attachment or a parasite trace.

Among bioerosion traces in armour elements, but produced *post mortem* by scavengers, and that worth be cited, there is *Osedacoides jurassicus* Karl et al. (2012), which are millimetric borings produced by osteophagous Polychaeta, described in the hypoplastron of fossil turtles (seems to be more visible on their external surface). This resembles *Karethraichnus*, but differs as it has deeper tubes and, according to the diagnosis, branched. *Karethraichnus* does not resemble the *Aurimorpha varia*, especially the tongue-shaped flat microboring cavities (Wisshak et al., 2008; Molin et al., 2015).

Given the simple morphology of *Karethraichnus*, it also resembles several bioerosion traces in different substrates, and produced by different behaviors and tracemakers. Despite not being a scavenger trace, *Karethraichnus* resembles the ichnogenus *Cubiculum* when it is produced perpendicular to the surface (Roberts et al., 2007; Pirrone et al., 2014b; Ozeki et al., 2020), but *Cubiculum ornatus*, *C. Inornatus* and *C. cooperi* are elongated; *Cubiculum ornatus* have bioglyphs on its internal wall; the bottom of the chamber of *C. cooperi* is flat (Pirrone et al., 2014b; Parkinson, 2016; Xing et al., 2016) and *C. levis*, despite externally similar to *Karethraichnus*, has an interior bowl-shaped morphology with a marked constriction of walls in the upper area, different from the ogive/cone-shape of *Karethraichnus* (Pirrone et al., 2014b).

Still concerning bone bioerosions: *Cuniculichnus*, *Amphifaichnus seilacheri*, *Osteichnus ossibiontum* are less similar: they are *post mortem* scavengers bone modification, usually passive filled, cylindrical/tunnel shape or pouch-shaped, much more ellipsoidal due to the tubular surface morphology, and *Osteichnus ossibiontum* has fused U-loops (Thenius and Klaus, 1978; Thenius, 1988; Pirrone and Buatois, 2016; Höpner and Bertling, 2017; Serrano-Brañas et al., 2018; Ozeki et al., 2020).

Ichnospecies: *Karethraichnus minimum* isp. nov (Fig. 5a–c, Fig. 6a–c).

Synonyms: 2020 Type 1, Nascimento et al., p.4, Fig. 4B.

2020 Type 1*, Nascimento et al., p.4, Fig. 4A.

Etymology: *minimum* (Latin, n.) for small, tiny, smallest.

Diagnosis: Individual, unbranched, circular to elliptical holes in bony armour substrates produced always from the outside, perpendicular or slightly angled. Smooth hole rim, and relatively smooth internal wall. The interior cavity of the hole forms a tapered upside-down ogive/cone shape.

Horizon, type locality and Strata: Municipality of Iramaia, in the State of Bahia, Brazil. Lapinha cave, second lower level. –13.3209843°/–40.9793787° (Fig. 2). Lujanian SALMA (Late Pleistocene) (Moura et al., 2019).

Holotype: The trace fossils are in the external surfaces of the osteoderms, deposited in the collection of the *Laboratório de Paleocologia e Paleoicnologia* (LPP) of the Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brazil. Holotype: LPP-PV-001-0500 (Figs. 5a, 6a–c).

Table 2

Parasite flea borings on xenarthrans and Neosome/Lesion diameters. Empty cell = no measure information; Archoe = Archaeological context. Data of *Karethaichnus minimum* isp. nov. = Q₁ - [M_d] - Q₃.

Order	Host	Parasite/Ichnofossil	Neosome/Lesion Diameter (mm)	Material	Reference
Cingulata	<i>Cabassou</i> sp.	<i>Tunga terasma</i>	8–10	Living	Linardi (2011)
		<i>T. penetrans</i>		Living	Linardi and Guimarães (2000)
	<i>Cabassou uncinatus</i>	<i>T. terasma</i>		Living	Linardi and Guimarães (2000)
	<i>Chasicotatus ameghinoi</i>	<i>T. perforans</i>	1.05–1.25	Fossil	Tomassini et al. (2016)
	<i>Chaetophractus vellerosus</i>	<i>T. perforans</i>	2.0–3.9	Living	Ezquiaga et al. (2020)
		<i>T. perforans</i>	2.1–2.6	Living	Ezquiaga et al. (2015)
	<i>Chaetophractus villosus</i>	<i>T. penetrans</i>		Living	Ezquiaga et al. (2017)
		<i>T. terasma</i>		Living	Ezquiaga et al. (2017)
		<i>T. perforans</i>	2.1–2.6	Living	Ezquiaga et al. (2020)
		<i>T. penetrans</i>		Living	Ezquiaga et al. (2008)
	<i>Dasyus</i> sp.	<i>T. travassosi</i>	10–13	Living	Linardi (2011)
	<i>Dasyus hybridus</i>	<i>T. penetrans</i>		Living	Ezquiaga et al. (2008)
	<i>Dasyus novemcinctus</i>	<i>T. penetrans</i>	4–5	Living	Linardi and De Avelar (2014)
		<i>T. terasma</i>	9–13	Living	Linardi and De Avelar (2014)
	<i>Euphractus</i> sp.	<i>T. travassosi</i>	4–10	Living	Linardi (2011)
		<i>T. terasma</i>	8–10	Living	Linardi (2011)
	<i>Euphractus sexcinctus</i>	<i>T. perforans</i>	2.4–3.0	Living	Ezquiaga et al. (2020)
		<i>T. terasma</i>		Living	Linardi and Guimarães (2000)
		<i>T. travassosi</i>		Living	Da Fonseca, 1936
		Glyptodontidae	cf. <i>Karethaichnus fiale</i>	9.79–11.15	Fossil
	<i>Glyptotherium</i> sp.	<i>Tunga</i> sp.	8–9	Fossil	De Lima and Porpino (2018)
	<i>Glyptatelus</i> sp.	Borings Type 1	5–7	Fossil	Perea et al. (2020)
	<i>Holmesina cryptae</i>	<i>Karethaichnus minimum</i> isp. nov.	2.40 - [2.79] - 3.67	Fossil	Work presented here
		cf. <i>Karethaichnus fiale</i>	4.16–8.89	Fossil	Work presented here
	<i>Neuryurus</i> sp.	Borings Type 1	2–9	Fossil	Perea et al. (2020)
	<i>Pachymatherium brasiliense</i>	<i>Tunga</i> sp.	2.1–4.3	Fossil	De Lima and Porpino (2018)
	<i>Priodontes maximus</i>	<i>T. perforans</i>	2.0–2.3	Living	Ezquiaga et al. (2020)
		<i>T. terasma</i>		Living	Linardi and De Avelar (2014)
	<i>Zaedyus pichiy</i>	<i>T. perforans</i>	2.0–2.3	Living	Ezquiaga et al. (2015)
		<i>Tunga</i> sp.	1.97–2.92	Archoe	Hammond et al. (2014)
	<i>Tolypeutes matacus</i>	<i>T. perforans</i>		Living	Ezquiaga et al. (2020)
		<i>T. perforans</i>	2.2–3.2	Living	Ezquiaga et al. (2020)
		<i>T. penetrans</i>	5–5	Living	Ezquiaga (2013)
<i>Vetelia perforata</i>	<i>T. perforans</i>	3.35–3.55	Fossil	Tomassini et al. (2016)	
Pilosa	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>T. penetrans</i>		Living	Di Nucci et al. (2017)
	<i>Tamandua</i> sp.	<i>T. penetrans</i>		Living	Ezquiaga et al. (2008)
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	<i>T. bondari</i>		Living	Linardi and Guimarães (2000)

Paratypes: LPP-PV-001-0509 and LPP-PV-001-0508 (Fig. 5b-c).

Material: LPP-PV-001 to 003 (Sup. Mat. Table S1)

Description: Mostly one lesion per osteoderm, *Karethaichnus minimum* isp. nov. is on average (Fig. 3 and Sup. Mat. Table S3) length: 0.415 ± 0.280 cm; width: 0.326 ± 0.228 cm; area: 0.135 ± 0.186 cm²; occupying $1.113 \pm 1.073\%$ of the osteoderm. Diameter of $0.240 - [0.279] - 0.367$ cm (Q₁ - [M_d] - Q₃) (see Table 2 and Sup. Mat. Table S3). The lesions have an average value of eccentricity (*e*) of 0.269 ± 0.105 , being almost circular to slightly-elliptical. All medians are in Sup. Mat. Table S3. Most measures are non-normal-unimodal (where visual multimodality in Sup. Mat. Fig. S1 is probably the result of outliers, see Shapiro-Wilks and ACR in Sup. Mat. Table S4) with positive skewness (see Sup. Mat. Fig. S1 and Table S4), only the eccentricity value has negative skewness (Sup. Mat. Fig. S1e and Table S4). Regarding both the area of the lesion and the percentage occupied in the osteoderm, there is a significant difference (Kruskal-Wallis and Wilcoxon $p < 0.05$, see Sup. Mat. Table S5) between *Karethaichnus minimum* isp. nov. x *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov., and *Karethaichnus minimum* isp. nov. x Ulcerative lesions.

Remarks: *Karethaichnus minimum* isp. nov. is the first description of a trace attributed to fleas. *Karethaichnus minimum* isp. nov. differ from *K. fiale* mainly in that it does not pass through the animal's bony armor. *K. minimum* isp. nov. differ from *K. lakkos* Zonneveld et al. (2015) on the internal surface of its cavity inside the bony armour, that is ogive/cone-shape in *K. minimum* isp. nov. and is a shallow round/hemispherical hole in *K. lakkos* in early stage, and cylindrical with rounded to flattened termination in advanced developmental stages of *K. lakkos* (described as *K. kulindros* Zonneveld et al., 2015, but regarded as a subjective junior synonym of *K. lakkos* by Wisshak et al., 2019).

Karethaichnus minimum isp. nov. differ from *K. zaratan* Sato and Jenkins (2020) on the internal surface of its cavity inside the bony armour, that is ogive/cone-shape in *K. minimum* isp. nov. and is hemispherical to clavate in shape in *K. zaratan*.

Tracemaker interpretation: The regular circular shape of *Karethaichnus minimum* isp. nov. rules out ulcers that would produce a pit lesion (e.g., Wolff et al., 2007; Matthias et al., 2016; Biot, 2017). *Karethaichnus minimum* isp. nov. was not produced by bites from other vertebrates since it does not bear collapsed (broken), crushed areas or crumpled edges, features seen in these kinds of lesions (e.g., Avilla et al., 2004; Fiorelli, 2010; Marinho and Iori, 2011).

The specimens described here as *Karethaichnus minimum* isp. nov. were reported in a parasitological approach by Nascimento et al. (2020), which have been interpreted as lesions caused by sessile fleas (Siphonaptera), such as *Tunga perforans* borings on osteoderms of extant armadillos (Ezquiaga et al., 2015). Similar borings to *Karethaichnus minimum* isp. nov. were also described on fossil osteoderms of Cingulata by other authors. We summarised and comment on these occurrences as follows:

- On the glyptodont *Neuryurus* sp., Fray Bentos Formation, Late Oligocene ('Type 1' in their Fig. 6, B2 and maybe B1) and on *Glyptatelus* sp., Dolores Formation, Late Pleistocene-Early Holocene ('Type 1' in their Fig. 5A) all from Uruguay (Perea et al., 2020). This work has an ichnotaxonomical approach but as there were no ichnotaxa that encompass this morphology, the authors named these similar borings as 'Type 1';
- On the armadillos *Chasicotatus ameghinoi* and *Vetelia perforata*, from the Late Miocene in Argentina (Tomassini et al., 2016);

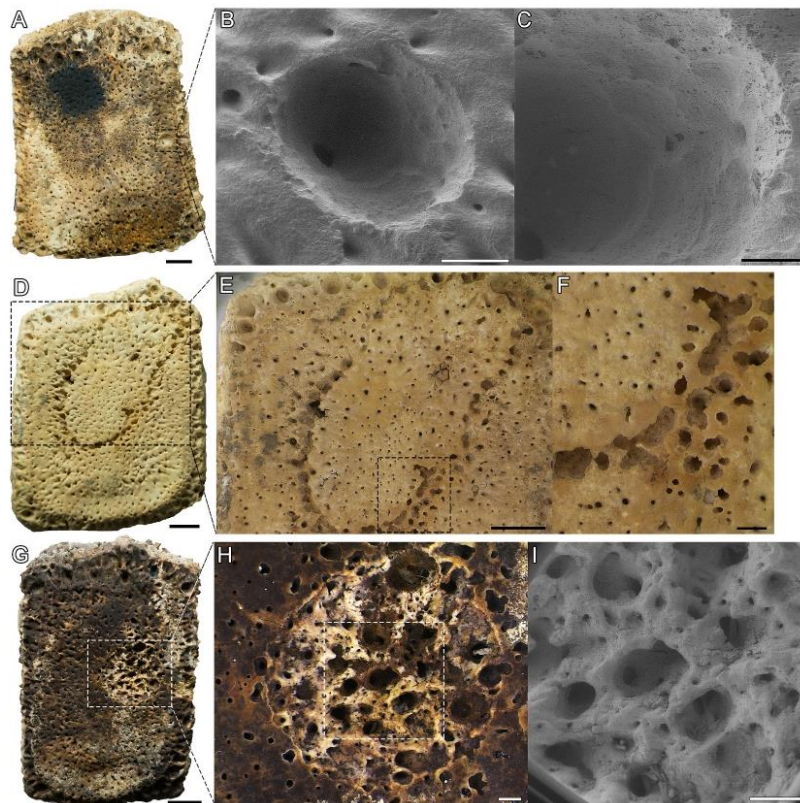


Fig. 6. The holotypes of the two traces described here and an ulcerative lesion example focus on the microstructure of each one in *Holmesina cryptae* osteoderms. (1–0500) A. Total view of osteoderm with a focus on lesion *Karethaichnus minimum* isp. nov.; B. and C. SEM (Secondary Electron) focus on the lesion *Karethaichnus minimum* isp. nov. demonstrating the bioerosion microstructure; (2–0201) D. Total view of osteoderm with focus on lesion *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov.; E. and F. Stereomicroscope focus on the lesion *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. demonstrating the pattern of merging holes into larger ones, as well as the maintenance of single holes by a thin layer of bone, and misshapen perimeter; (1–0492) G. Total view, H. Stereomicroscope and I. SEM (Backscattered-Electron) of the ulcerative lesion demonstrating an aggregate pattern of misshapen superficial holes/pits and the formation of a degradation pattern inside the osteoderm (necrosis). Dashed rectangles = focus of the right next image; Scale bars: A, D, E, G = 5.0 mm; B, F, H, I = 1.0 mm; C = 500 μ m.

- On the carapace of *Pachyarmatherium brasiliense* (Pachyarmatheriidae) and *Glyptotherium* sp. (De Lima and Porpino, 2018);
- Probably the traces on osteoderms reported by Pirrone and Luna (2015) of the Late Pleistocene of Argentina;
- On the extant armadillo *Zaedyus pichiy* in an archaeological context (370 years old) in Patagonia, Argentina (Hammond et al., 2014);
- On the extant armadillos *ChaetophRACTUS vellerosus*, *Euphractus sexcinctus*, *Priodontes maximus*, *Tolypeutes matacus*, *Zaedyus pichiy* (Ezquiaga et al., 2020).

No *Karethaichnus minimum* isp. nov. in the three *Holmesina cryptae* specimens reach the spongy bone, however this behavior was described in flea borings in fossil osteoderms of Cingulata (Tomassini et al., 2016). There are also reports on flea borings passing through osteoderms in living armadillos (Hammond et al., 2014; Ezquiaga et al., 2015, 2020). This could be related to the thickness of the cortical region of the osteoderms, as *H. cryptae* is a much larger animal with thicker osteoderms.

There are two osteoderms of *Holmesina cryptae* (1–0337, from the

movable bands, and 1–0814, from the caudal sheath) with lesions on the edge, passing through the osteoderms (Sup. Mat. Figs. S2, B, and C). As these are larger than other *Karethaichnus minimum* isp. nov. and there are only two occurrences, we regard them as cf. *Karethaichnus fiale*. These lesions could be characteristic of tungid lesions in the edge of osteoderms, in the junction with an adjacent osteoderm, since a similar lesion was found also between two osteoderms of a juvenile glyptodont found in the same cave (Sup. Mat. Figs. S2 and A). Regarding these lesions in glyptodonts, unlike most *Karethaichnus minimum* isp. nov. found in *H. cryptae*, in addition to going through the osteoderms, they are more tubular than ogive/cone-shape (see Sup. Mat. Fig. S2). This resembles morphologically, and in size (see Table 2), more the lesions on glyptodonts of De Lima and Porpino (2018) and the “type 1 borings” in Perea et al. (2020) than those described here in *H. cryptae*. Since there is only one lesion in the glyptodont studied here, we exempt ourselves from going further in ichnotaxonomy, identifying it as cf. *Karethaichnus fiale* (Table 2).

Fleas (Siphonaptera) are obligate hematophagous ectoparasites of birds and mammals and have a close evolutionary relation with Theria

(Linardi and De Avelar, 2014; Zhu et al., 2015). Most of them are free-living parasites (Rothschild, 1992), but in the genus *Tunga* the adult females fully penetrate their body into the integument of their hosts and, after fertilisation, their abdomen grows into an enlarged structure (neosome) (Linardi and De Avelar, 2014). Modern xenarthrans can carry several species of *Tunga* (Table 2), attacking different body parts (Linardi and De Avelar, 2014), but only *Tunga perforans* have been ever recorded to bury themselves into the osteoderm of their host carapace (Ezquiaga et al., 2015, 2020; Tomassini et al., 2016).

Having said that, *Karethraichnus minimum* isp. nov. was probably produced by a female of sessile ectoparasite sand fleas, with high chances belonging to the *Tunga* genus or at least in Tungidae, due to the high specialisation in these groups (Linardi and De Avelar, 2014), and the remarkable similarity in size of the borings of *Tunga perforans* in modern armadillos and the *Karethraichnus minimum* isp. nov. in *Holmesina cryptae* (see Table 2, *T. perforans* records).

As in a common sand flea's life cycle (*Tunga penetrans*) (Nagy et al., 2007), the flea probably begins boring a tight tube penetrating the horny scales, the epidermis, the dermis (all not preserved) and then reaching the osteoderm, therefore *Karethraichnus minimum* isp. nov. is the resulting cavity formed by the enlargement of the abdomen of the female flea (neosome growth) in this tight tube (Fig. 4). A phenomenon like this, with a different tracemaker, could also have generated the convex outwards internal walls of *K. fale*. This differs from most of the bioerosion traces in bones, that are a direct product of the mechanical or chemical boring process in hard substrates (Pirrone et al., 2014b; Höpner and Bertling, 2017; Wisshak et al., 2019). The process was not histologically described in osteoderms but does not seem to have triggered an inflammatory response enough to modify the primary morphology of *Karethraichnus minimum* isp. nov., as there are no ulcerative and necrosis signs. The well-known bone remodeling process (Raggatt and Partridge, 2010) should operate to accommodate the growing abdomen of the female flea. The size and shape of the trace conform to most species of *Tunga* (Table 2) and also to the record of this sort of trace in living and fossil Cingulata.

Karethraichnus minimum isp. nov. follows the common pattern of one boring per osteoderm, with only one osteoderm (1-0821) with more than one ectoparasite boring. Intense *Tunga* infestations can occur in several animal groups and cause the harmful tungiasis disease (Pampiglione et al., 2009; Karunamoorthi, 2013; Miller et al., 2019), although an insulation trend in the females could be naturally selected to avoid competition by other fleas. This pattern is observed both in fossil records (e.g., De Lima and Porpino, 2018) and in living armadillos (Montalvo et al., 2016). This is also taken as evidence of a *syn vivo* formation, as other lesions (e.g., necrophagous beetles) have an accumulation (several lesions per osteoderm) and excavation patterns, generating interconnected chambers (Pirrone et al., 2014a).

Few *Karethraichnus minimum* isp. nov. do not necessarily mean low ectoparasitic infestations, since there are registers of ectoparasite fleas restricted to the soft skin on the ventral body surface of armadillos (Medri, 2008; Deem et al., 2009; Superina et al., 2009). However, many *Karethraichnus minimum* isp. nov. on the carapace could indicate an ill animal, since modern armadillos typically bear few ectoparasites (Medri, 2008; Deem et al., 2009; Superina et al., 2009), and we are recognising only the infestations that were preserved in the armour.

Ichnogenus: *Violinichnus* igen. nov.

Etymology: *violino* (Italian, m.) violin instrument, referring to the violin shape of the trace + *ichnus* (Latinized Greek, m., n.) small trace.

Diagnosis: Consecutive grouped holes always on the external surface of the armour, forming a curved or wavy perimeter line in overall elliptical shape. It can constrain in the perimeter region of the ellipse's smaller axis, forming a violin-like shape. The consecutive holes can merge, or the bone between the consecutive holes can be missing.

Type ichnospecies: *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. (monotypic ichnotaxon)

Remarks: *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. is the first fungi

bioerosion trace described in osteoderms. This, and *Palaeomycelites lacustris*, are the only fungal bioerosions in bone substrate described so far.

Circumpodichnus serialis Wisshak and Hüne (2019), an adhesion trace of an unknown calcareous encruster, is the most similar bioerosion trace, despite being produced by a different behavior. *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. is different since its consecutive holes are not shallow attachment etchings, but deeper holes generated by destruction/reabsorption of bone material; it did not exhibit peripheral pouches or central pits, and it has a delimited and recurrent overall outline pattern (elliptical/violin-like), not exhibiting continuous connection to neighbouring segments like *C. serialis*. It is noteworthy that they differ in their substrate, a valid ichnotaxobase in case of bioerosions (Bertling et al., 2006; Wisshak et al., 2019): *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. occurs in osteoderms and *C. serialis* in calcitic belemnite rostrum.

Violinichnus punctatus igen. et isp. nov. vaguely resembles other attachment structures with circular outlines and depressions/oval shapes: The brachiopod attachment traces in *Podichnus Bromley and Surlyk* (1973) have similar pits, but their spatial arrangement is different.

Ophthalmichnus lyolithon Wisshak et al. (2014) is a microscopical individual ring-shaped diatom attachment etching. It differs in that the ring is a continuous groove that is not composed of individual pits. *Solealites ovalis* Uchman and Rattazzi (2018) is a macroscopical individual ring-shaped, probably produced by limpet gastropods, attachment etchings differing by the ring and is a continuous groove that is not composed of individual pits, and its lithic substrate.

Augoichnus dituberculatus Arendt (2012), an attachment trace (gastropods?), may occur in serial arrangement, but does not form an overall elliptical/violin-like outline on the osteoderm. *Finichnus* (Taylor et al., 1999, 2013) are etchings of cheilostome bryozoans, they differ as they are oval depressions only, with no elliptical/violin-like macrostructure, and occur in a different substrate (calcareous). *Camarichnus Santos and Mayoral* (2006) are uniserial foraminifera attachment traces. This occurs in a different substrate (calcareous) and differs as they are composed of very shallow grooves that are connected by a central furrow, not consecutive holes with an overall elliptical/violin-like outline.

Most fungal bioerosions are filamentous penetrating and ramifying forming extending networks, not forming an elliptical/violin-like superficial macrostructure like *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov.. These are: *Flagrichnus* (Wisshak et al., 2005, 2011; Wisshak and Porter, 2006; Thuy et al., 2014; Seuss et al., 2016; Seuss and Nützel, 2019), *Orthogonum* (Wisshak, 2008; Wisshak et al., 2008; Radtke et al., 2011; Cherchi et al., 2012; Meyer et al., 2020), *Palaeomycelites lacustris* (Lucas, 2016), *Polyactina araneola* (Wisshak, 2008; Wisshak et al., 2008, 2011; Beuck et al., 2010; Thuy et al., 2014; Seuss and Nützel, 2019), and *Sacomorpha* (Radtke and Golubić, 2005; Golubić et al., 2014; Seuss and Nützel, 2019; Meyer et al., 2020).

Other ramifying microborings with lateral, or terminal swellings, but no elliptical/violin-like superficial macrostructure are: *Conchocelichnus seilacheri* (Radtke et al., 2016; Tribollet et al., 2018; Meyer et al., 2020), *Eurygonum* (Perry and Macdonald, 2002; Radtke and Golubić, 2005; Wisshak et al., 2005, 2011; Seuss and Nützel, 2019), and *Ichnoreticulina elegans* (Radtke and Golubić, 2005; Santos and Mayoral, 2008; Wisshak et al., 2011; Cherchi et al., 2012; Seuss and Nützel, 2019; Meyer et al., 2020), which show the same pattern, but no violin-like macrostructure.

Ichnospecies: *Violinichnus punctatus* isp. nov. (Fig. 5-f, 6d-f).

Etymology: *punctatus* (Latin, m.) adjective for dotted or speckled, referring to the dotted rim of the trace.

Diagnosis: Same as for the ichnogenus.

Horizon, type locality and strata: Municipality of Iramaia, in the State of Bahia, Brazil. Lapinha cave, second lower level. -13.3209843°/-40.9793787° (Fig. 2). Lujanian SALMA (Late Pleistocene) (Moura et al., 2019).

Holotype: The trace fossils are in the external surfaces of the

osteoderms, deposited in the collection of the *Laboratório de Paleocologia e Paleocinologia* (LPP) of the Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, São Paulo, Brazil. Holotype: LPP-PV-002-0201 (Figs. 5d and 6d).

Paratypes: LPP-PV-002-0200 and LPP-PV-001-0524 (Fig. 5e-f).

Material: LPP-PV-001 to 003 (Sup. Mat. Table S1)

Description: *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. is on average (Fig. 3 and Sup. Mat. Table S3) area: $1.820 \pm 1.274 \text{ cm}^2$; occupying on average $16.382 \pm 9.653\%$ of the osteoderm. Median values are in Sup. Mat. Table S2. The area is non-normal-unimodal with positive skewness and the percentage of the occupied area on the osteoderm is normal-unimodal (see Sup. Mat. Fig. S1 and Table S4). Regarding both the area of the lesion and the percentage occupied in the osteoderm, there is a significant difference ($p < 0.05$, see Sup. Mat. Table S5) between *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. x *Karethraichnus minimum* isp. nov., and no significant difference in *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. x Ulcerative lesions.

Tracemaker interpretation: *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. resembles lesions caused by fungi infections in living animals, like ringworms (Hau and Van Hoosier, 2003; Degreef, 2008) also presenting internal microfilaments network similar to some ichnotaxa presented here (e.g., *Ichnoreticulina elegans*, *Orthogonum*) (see Kushida and Watanabe, 1975; Jensen, 2003). Although fungi can participate in the bone tissue decomposition process (see Piepenbrink, 1986), the morphology of these traces and their presence on the three specimens that underwent distinct taphonomic processes due to the different microenvironments of the cave, indicate that the lesions occurred *syn vivo*. It is not clear whether the loss of bone material forming the small borings of *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. was caused directly by the feeding of the fungus or by the reabsorption reaction of the host's body as the fungus spread.

Violinichnus punctatus igen. et isp. nov. does not seem to carry an observable response of the host body, like an inflammatory and ulcerative process recorded as the necrosis of bone material on the osteoderm external face. Moreover, *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. is after all, a product of a fungal infection, with a specific morphology, tied to its behavior and perhaps to the producer of the trace, and it is not possible to be attributed to any other agent, or to a spontaneous response of the host body, which justifies an ichnotaxonomical treatment.

Violinichnus punctatus igen. et isp. nov. resemble mycoses including dermatophytosis (Ringworm infections), with a similar pattern (elliptical/violin-shaped) in other mammals: like humans (Cox and Irving, 1993; Gupta and Summerbell, 2000; Degreef, 2008), dogs and cats (Kushida and Watanabe, 1975; Wright, 1989), cattle (Rook and Frain-Bell, 1954), exotic pets (e.g., mice, guinea pigs, chinchilla) (Donnelly et al., 2000), and several others (see Hau and Van Hoosier, 2003).

Although the low body temperature of armadillos is considered a defense against some microorganisms (Truman, 2005), living armadillos are known hosts and reservoirs of some fungi. An example that causes skin lesions in these animals is *Sporothrix schenckii* (Barros et al., 2011), responsible for sporotrichosis in several animal groups. These injuries are characterised by being an inflammatory and superficial process, which can cause bone degradation (Wenker et al., 1998). The transmission normally occurs via inoculation of *S. schenckii* by scratches and small injuries (Indranil, 2015) (see section 3.3. of Sporotrichosis).

Armadillos inhabit underground dens, where they are in contact with organic matter, moisture, and abrasive material (e.g., rocks and roots), exposing them to different fungi found in these environments, that can infect the host by inhalation or by traumatic route (Queiroz-Telles et al., 2017) and cause diseases and injuries (Superina et al., 2009; Richini-Pereira et al., 2009) similar to those described here.

The thermomorphogenic fungi of the family Ajellomycetaceae are found as filamentous form when in saprobic conditions, in soil or guano (Dukik et al., 2017). Some species of this family are capable of degrading keratin (Bagagli et al., 2006), including causing injuries to armadillos. When foraging, digging or burrowing, armadillos can come into contact

with contaminated environments (Jellison and Lord, 1964) and, thus, inhale the fungus, which at the host temperature develops as yeastlike forms (Bagagli et al., 2006; Richini-Pereira et al., 2008).

Paracoccidioides brasiliensis is an example of species of Ajellomycetaceae associated with several wild animals, including armadillos (Seyedmousavi et al., 2015). It is one of the etiological agents of paracoccidioidomycosis currently considered one of the most important and prevalent systemic mycoses in Latin America (Bagagli et al., 2006; Richini-Pereira et al., 2008; Queiroz-Telles et al., 2017). This species is frequently found in nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) (Bagagli et al., 2006), and there is evidence that it has evolved in the same geographical distribution as the armadillos (Richini-Pereira et al., 2008). Indeed, several features of this family are highly conserved, probably because of the coevolution with its mammalian host (Dukik et al., 2017).

Some Lobomycosis subepidermal infections, caused by *Loboa lobo*, are mostly reported in humans, however, in turtles, tortoises, and armadillos, the lesion can develop much faster and accompanied by liquefactive necrosis of the osteoderm (Hau and Van Hoosier, 2003). This is a potential initiator of the secondary ulceration described in section 3.3.

3.3. Ulcerative lesions

We attribute the ulcerative lesions to microbiological infections or destructive immune response, but since the extent of the influence of the microbiological infection and the host body reaction are unknown, we separated this section to discuss them in a paleoparasitological approach as opposed to an ichnotaxonomical approach.

There are ulcerative lesions in two of the three *Holmesina cryptae* specimens. The lesions are corrosive-like disruption on the surface of the osteoderm, forming irregular shaped holes/pits, not limited to the cortical bone and can also reach the spongy bone. They are always on the external surface of the osteoderm. None of the lesions exceed an osteoderm reaching adjacent ones, but there are records of similar lesions affecting several osteoderms (Barbosa and Luna, 2014; De Lima and Porpino, 2018). There is no evidence of bone response in our specimens, but there are records of this (Barbosa and Luna, 2014; De Lima and Porpino, 2018).

The ulcerative lesions have on average (Fig. 3 and Sup. Mat. Table S3) area: $1.795 \pm 1.383 \text{ cm}^2$; occupying on average $18.485 \pm 14.911\%$ of the osteoderm. The measures are non-normal-unimodal with positive skewness (see Sup. Mat. Fig. S1 and Table S4). Median values are in Sup. Mat. Table S2. Regarding both the area of the lesion and the percentage occupied in the osteoderm, there is a significant difference ($p < 0.05$, see Sup. Mat. Table S5) between the ulcerative lesions x *Karethraichnus minimum* isp. nov., and no significant difference in the ulcerative lesions x *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov.

The irregular rim of the lesion and the exposed cortical area of the osteoderm are evidence of a final product of secondary opportunistic infection by microorganisms, destructive immunological response (Matthias et al., 2016), or a serious ulcerative lesion (Wenker et al., 1998). Similar ulcerative lesions were described in osteoderms of other Cingulata (*Panochthus* sp. and *Glyptotherium* sp.) (Barbosa and Luna, 2014; De Lima and Porpino, 2018), in Crocodyliformes (Wolff et al., 2007) and Ankylosauridae (Matthias et al., 2016). This type of lesion can be superficially different in each animal group. Despite being all osteoderms, they are remarkably different in external morphology, ornamentation, internal structure, and have been evolved independently in each group (Vickaryous and Sire, 2009), belonging to animals with different metabolisms and habitat (e.g., Wolff et al., 2007 crocodyliform is ectothermic and semiaquatic). Moreover, these are all ulcerative lesions with loss of superficial bone material (necrosis).

According to the different sizes observed in the samples (Fig. 7), the lesion would begin more restricted, with several potential agents for the primary lesion: abrasion from the soil, plants; lesions from intraspecific

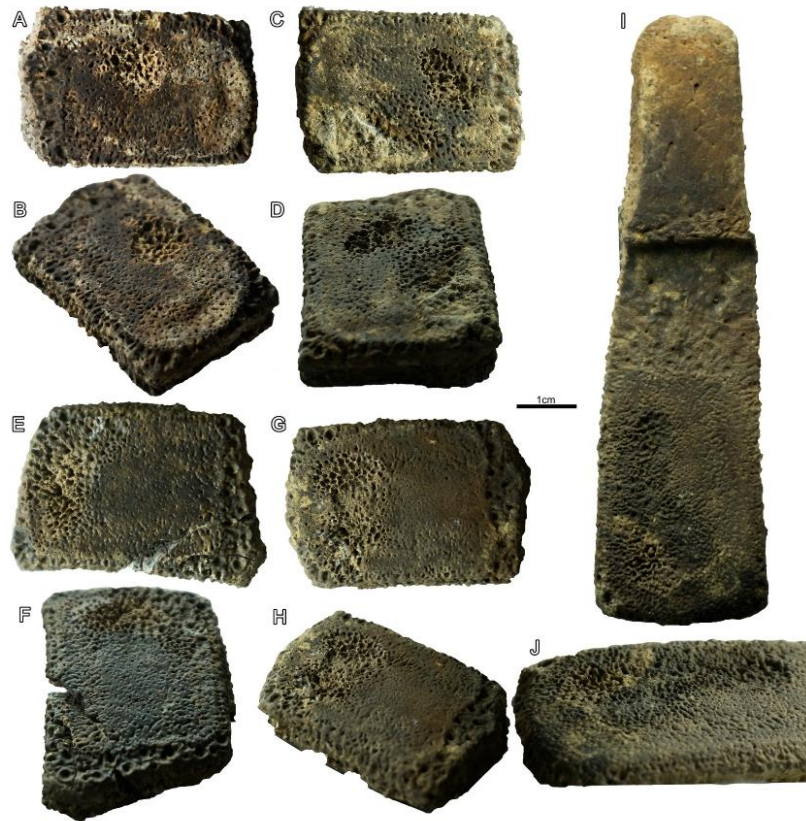


Fig. 7. Osteoderms of *Holmesina cryptae* with ulcerative lesions with a range of sizes and depths, indicating injuries with different severities. (LPP-PV-001-0492) A. top view and B. side view. (LPP-PV-001-0493) C. top view and D. side view. (LPP-PV-001-0495) E. top view and F. side view. (LPP-PV-001-0489) G. top view and H. side view. (LPP-PV-001-0341) I. top view and J. side view.

figths or predation; dermatitis; ectoparasites (e.g., mites, ticks, fleas, mosquitoes); initial mycoses or bacterial infection. The ulcerative lesions in *Holmesina cryptae* specimens described here do not spread beyond an osteoderm, as is seen in some glyptodonts (Barbosa and Luna, 2014, see Fig. 1; De Lima and Porpino, 2018; see Figs. 3 and 4). They are probably still the same type of lesion, produced by the same infectious behavior. There could be bone growth over the lesion, probably a healing process (Barbosa and Luna, 2014, see Fig. 1a; De Lima and Porpino, 2018; see white arrows in Fig. 3).

Therefore, it is reasonable to assume that the flea lesion *Karethraichnus minimum* isp. nov. and fungal lesion *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. could become an ulcerative lesion after secondary pathogen infection, inducing loss of bone material (necrosis) recorded on the osteoderms. This can be seen by the low presence of *Karethraichnus minimum* isp. nov. or *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. lesions in osteoderms where there is ulceration (~7%). When ulcerative lesions are present, the other types of lesions are usually absent, probably because they were precursors to the ulcerative lesion.

These ulcerative lesions are present in circular/elliptical shape (Fig. 7) and a more irregular shape (Fig. 7). This suggests different stages of ulceration (sizes). It is likely that the ulcerative lesions with a more circular/elliptical shape are secondary infections of a *Karethraichnus*

minimum isp. nov., while the most irregular shaped, are of a *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov.. *Karethraichnus minimum* isp. nov. lesions have a smaller area and occupy a smaller portion of the osteoderm (%) than *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. and the ulcerative lesions (significant difference $p < 0.05$, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney-Wilcoxon, Sup. Mat. Table S5). Comparing *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. and these ulcerations, the difference is not significant ($p > 0.05$). This would indicate that ulcerative lesions were more commonly formed in a fungal/post-fungal infection (*Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov.) context.

There is a greater number of ulcerations at an early stage (occupying a small area of the osteoderm) than at an advanced stage (large area with high osteoderm occupation). This can be seen in the density graph (Sup. Mat. Fig. S1a) with positive skewness (D'Agostino $p < 0.05$) of both the area (D'Agostino skew: 2.29) and the occupation of the osteoderm (D'Agostino skew: 1.65).

This differs from the records of large areas of ulceration in glyptodont osteoderms seen by Barbosa and Luna (2014) and De Lima and Porpino (2018). The presence of spondyloarthropathy together with a greater infection in the armour of glyptodonts described by Barbosa and Luna (2014) could be a case of a previously sick or weak animal, more propitious to a large spread of an opportunistic pathogens (Collins, 1989).

Superina et al. (2009) observed in the extant dwarf armadillo *Zaedyus pichiy* taken from the wild that lesions and scars are common and probably related to intraspecific fights and predation, those on the dorsal area are mostly worn-out scutes and are probably related with contact with soil. Infections in these lesions are rare, but Superina et al. (2009) observed in captive *Zaedyus pichiy* moist dermatitis with epidermal detachment and infection of the lesions with bacteria that are commonly found in soil, such as *Pseudomonas*, *Citrobacter*, and *Escherichia coli*, assigning this and other skin diseases in free-ranging *Z. pichiy* to high humidity (Superina et al., 2009). All these skin lesions reported by Superina et al. (2009) could potentially produce ulcerations in the osteoderm.

Bites from ectoparasites such as fleas and ticks can cause dermatitis and allergic reactions or skin lesions which may facilitate a subsequent fungal or bacterial colonisation (Sanusi et al., 1989; Linardi, 2005) causing secondary infections suitable to produce ulcerations. Sand flea infections (probable producers of *Karethraichnus minimum* isp. nov.) are known to facilitate microbiological infections (Linardi and De Avelar, 2014).

Another potential producer of ulcerations is sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* fungi (possibly a cause of the *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. as well) (Wenker et al., 1998). In *Dasybus novemcinctus* armour, ulcerative infections occupying some osteoderms have been reported (Kaplan et al., 1982; Wenker et al., 1998), but also lesions occupying a large part of the armour (6–7 cm in diameter), directly affecting the bone tissue of osteoderms, producing inflammatory osteolysis (Wenker et al., 1998, see Fig. 1). This large inflammatory ulceration is also similar to that reported by Barbosa and Luna (2014), which occupies a large part of the glyptodont armour. According to the description and images by Wenker et al. (1998), this sporotrichosis lesion is very similar to those found here in *Holmesina cryptae*.

Species of armadillo are also hosts and reservoirs of *Mycobacterium leprae* (Truman, 2005; Frota et al., 2012). As all Xenarthra, armadillos have low metabolism and exhibit low, and often highly variable, body temperatures (McNab, 1985); these are thought to be responsible for the nine-banded (*Dasybus novemcinctus*) and the six-banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*) being the only free-ranging vertebrates other than humans that exhibit naturally-occurring infections of *M. leprae*, the causative agent of leprosy (Truman, 2005, 2008; Oliveira et al., 2019; Deps et al., 2020). As underground dwellers (Superina and Loughry, 2012), the close contact with underground soil, often moist, and their low metabolism and body temperature, are all factors that could promote infection capable of producing ulcerations in *Holmesina cryptae* osteoderms.

The ulcerative lesions could also arise from an autoinflammatory process, such as the painful ulcers of Pyoderma Gangrenosum in humans, a disease thought to be caused by immunological dysfunction (Maverakis et al., 2018) and that could theoretically leave traces in osteoderms if affecting an armoured animal.

3.4. Why these are *syn vivo* traces

Evidence points the traces reported here were produced *syn vivo*: in all the three Pampheroidea, the traces are on the external surface of the osteoderms, and none of the traces were found on the internal surface, or on the endoskeleton elements. The traces also differ from those products of *post mortem* processes like scavengers (see grazing traces, necrophagic larvae, and predation traces in Pirrone et al., 2014; Fernandez-Jalvo and Andrews, 2016; Wisshak et al., 2019), transport and weathering (see Araújo-Júnior et al., 2013; Lopes and Ferigolo, 2017) or acid attacks in a cave context (Fernandez-Jalvo and Andrews, 2016). If instead of traces these were marks (see Vallon et al., 2015 for traces/marks difference), that is, a product of *post mortem*, it was expected there were marks on all surfaces of the elements. Moreover, the traces are similar to those found in modern armadillos, in which the producer is known. As *syn vivo* traces, they are useful to access the health of armoured animals and the

description of these new ichnotaxa are the establishment of a tool that can be applied to other individuals or even populations, whether of Cingulata or other armoured animals.

3.5. Traces on living tissues

The traces described here were produced *syn vivo*, and as a living tissue, an osteoderm can respond to injury healing (Bryant and Bellairs, 1967; Alexander et al., 1999; Sos, 2012; Maas, 2013; Barbosa and Luna, 2014; Vickaryous et al., 2015; Zonneveld et al., 2015; Spadola and Morici, 2016; 2017; Biaggini and Corti, 2018; De Lima and Porpino, 2018; Alibardi, 2019; Sato and Jenkins, 2020), therefore potentially modifying the morphology of a trace. There is an ongoing discussion about the ichnotaxonomical status of traces on responsive substrates (see Bertling et al., 2006; Zonneveld et al., 2015; Wisshak et al., 2019) and here we endorse the definition given by Wisshak et al. (2019, p.24), considering as bioerosions those cases where '*bioerosive action is predominant and identified as largely independent from the host reaction*'.

No host response was noted in *Karethraichnus minimum* isp. nov. and *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov., but we cannot rule out the role of bone resorption and remodeling (Raggatt and Partridge, 2010) in their formation, as in some parasitic and endobiont traces (Zonneveld et al., 2015; Sato and Jenkins, 2020). In the case of the ulcerative lesion reported here, we cannot safely say that, since the extent of the influence of the microbiological infection and the host body reaction (reabsorption and necrosis) in the morphology of the final lesion is unknown, also masking the trace responsible for the initial lesion that paved the way to the ulcerative lesion.

3.6. Paleocological implications

All the traces reported here are produced by ectoparasite and microorganism infections when the animal was alive (*syn vivo*), thus having paleocological relevance. It is known that ectoparasites weaken an animal or further weaken those previously sick due to high infestations, co-infestation, or co-infection, with endoparasites or other diseases. Ectoparasites as an infesting agent, cause dermatitis and skin lesions, leading to itching, discomfort and thus malaise to the host, being also vectors of pathogens, transmitting bacteria, viruses, helminths, and protozoans (Linardi, 2011), as well as borings for feeding facilitate subsequent infection by opportunistic pathogens, such as fungi, bacteria, and viruses or even by other ectoparasites (Linardi, 2011).

Quaternary climate change has reduced the populations of large South American herbivores (Cione et al., 2015). These smaller populations would have less genetic diversity and so would be more vulnerable to extinction (Frankham, 2005). This low genetic diversity can decrease the resistance of individuals to pathogens that previously circulated in the population (Spielman et al., 2004). This can even be observed by the presence of *Karethraichnus minimum* isp. nov., *Violinichnus punctatus* igen. et isp. nov. and ulcerative lesions in the three different individuals of *Holmesina cryptae*. Therefore, the action of parasites could accentuate the fragility of these weak populations, by reducing the ability of individuals to forage, avoid predation, consequently contributing in some way to the extinction processes.

Inhabitants of rural areas in Mendoza Province (Argentina) have reported an association between rainy periods and a skin disease on the armadillo *Zaedyus pichiy*, leading even to local extinctions (Superina et al., 2009). This disease would be caused by opportunistic bacterial colonisation as an effect of excessive moisture (Superina et al., 2009). This is a keen example of how a climate variation can hit a population with a disease that could potentially produce these lesions in Cingulata. Furthermore, some ectoparasites species are host specific (Linardi, 2011), therefore the host extinction heavily impacts parasites that could not use other hosts, having a broader paleocological effect.

4. Conclusions

The traces described here are *syn vivo* lesions produced by ectoparasites (sessile fleas) and microorganisms (fungi and bacteria). *Karathraichnus minimum* isp. nov. is individual, unbranched, circular to slightly ellipsoidal hole with a smooth rim and smooth interior. This trace is produced by a sessile female flea, probably from the *Tunga* genus (based on already described lesions in modern armadillos) and unveil a paleoparasitism behavior useful to track this relation deep in time in armoured animals.

Violinichnus punctatus igen. et isp. nov. is formed by consecutive, grouped, or merged tiny holes, forming an overall elliptical or violin-like shape. This is attributed to lesions produced by the action of fungi over osteoderms, similar to dermatophytosis (ringworm) in modern mammal skin.

The ulcerative lesions are recorded as the necrosis of bone material, producing a corrosive-like disruption on the external surface of the osteoderms formed by misshapen pits and exposition of spongy bone. These ulcerative lesions are probably produced by secondary infections by microorganisms such as fungi or bacteria, or even a destructive immunological response. The lesion can be limited to one osteoderm or spread over several ones. Ulceration would begin as a more restrict lesion, with several potential agents for this: abrasion from the soil, plants; lesions from intraspecific fights or predation; dermatitis; ectoparasites (e.g., mites, ticks, fleas, mosquitoes) or an initial mycoses or bacterial infection.

As *syn vivo* traces, these are tools to access the health of the animals to which the osteoderm belongs. Further support on ectoparasites and infections studies on living armoured animals would even allow inferences regarding extinct populations and interpretations of ancient ecosystems. Accessing their parasites and infections could provide a glimpse into how and why these animals disappeared, as well as the biotic interactions that occurred in these contexts, and the evolution of parasites in Quaternary mammals, deep in time.

Credit author statement

Jorge Felipe Moura: Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization, Writing – original draft; Carolina S. I. Nascimento: Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization, Writing – original draft; Bernardo de C. P. e M. Peixoto: Conceptualization, Methodology, Investigation, Visualization, Writing – original draft; Gabriel E. B. de Barros: Methodology, Software, Formal analysis, Investigation, Data curation, Visualization, Writing – original draft; Beatriz Robbi: Investigation, Visualization, Writing – original draft; Marcelo Adorna Fernandes: Resources, Supervision, Funding acquisition, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank the collectors of the material, Ericson C. Igual, Luís A. Joaquim, and the whole expedition team of the *Grupo Pierre Martin de Espeleologia (GPME)*. We would also like to thank Prof. Angélica Maria Penteado Martins Dias, coordinator of the National Institute of Science and Technology of Hymenoptera Parasitoides of the Southeast Brazilian Region (INCT - Hympar Sudeste - FAPESP Process 2008/57949-4 and CNPq 573802/2008-4) for letting us use the equipment of her project (Stereomicroscope and SEM) and the technician Luciana Bueno dos Reis Fernandes for taking the images in this equipment. We would like to thank an anonymous reviewer, and Dr.

Max Wisshak for their great contributions to the text. National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) of Brazil for the doctorate grant to J.F.M. (process number 142102/2015-6) and B.C.P. M.P. (process number 141220/2018-0). We would like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) of Brazil - Finance Code 001, for the doctorate grant awarded to C.S.I.N. (process number 426410/2019-01) and the master's grant awarded to G.E.B.d.B. (process number 88887.569703/2020-00). And also we like to thank the *Fundação Parque Zoológico de São Paulo* 003/2018 for the grant awarded to B.R.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2021.103255>.

References

- Alexander, R.M., Fariña, R.A., Vizcaíno, S.F., 1999. Tail blow energy and carapace fractures in a large glyptodont (Mammalia, Xenarthra). *Zool. J. Linn. Soc.* 126, 41–49. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1999.tb00606.x>.
- Alibardi, L., 2019. Tail regeneration in Lepidosauria as an exception to the generalized lack of organ regeneration in amniotes. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* n/a, 1–20. <https://doi.org/10.1002/jez.b.22901>.
- Ameijeiras-Alonso, J., Crujeiras, R.M., Rodríguez-Casal, A., 2018. Multimode: an R Package for Mode Assessment. R Package Version 1.1.
- Ameijeiras-Alonso, J., Crujeiras, R.M., Rodríguez-Casal, A., 2019. Mode testing, critical bandwidth and excess mass. *Test* 28, 900–919. <https://doi.org/10.1007/s11749-018-0611-5>.
- Araújo-Júnior, H.I., Porpino, K.O., Ximenes, C.L., Bergqvist, L.P., 2013. Unveiling the taphonomy of elusive natural tank deposits: a study case in the Pleistocene of northeastern Brazil. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 378, 52–74. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2013.04.001>.
- Arendt, Y.A., 2012. Traces of *Augoichnus dituberculatus* gen. et sp. nov. on *Hypemorphocrinus magnospinosus* from the Lower Permian of Cisuralia. *J. Paleontol.* 46, 886–893. <https://doi.org/10.1134/S0031030112080047>.
- Avilla, L.S., Fernandes, R., Ramos, D.F.B., 2004. Bite marks on a crocodylomorph from the Upper Cretaceous of Brazil: evidence of social behavior? *J. Vertebr. Paleontol.* 24, 971–973. [https://doi.org/10.1671/0272-4634\(2004\)024\[0971:BMOACF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1671/0272-4634(2004)024[0971:BMOACF]2.0.CO;2).
- Ayoub, A.B., 2003. The eccentricity of a conic section. *Coll. Math. J.* 34, 116. <https://doi.org/10.2307/3595784>.
- Bagagli, E., Bosco, S.M.G., Theodoro, R.C., Franco, M., 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect. Genet. Evol.* 6, 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2005.12.002>.
- Barbosa, F.H.S., Luna, C.A., 2014. Lesiones en la coraza y endoesqueleto de un ejemplar de *Panochthus* Burmeister, 1866 (Mammalia, Glyptodontia) de la provincia de Córdoba, Argentina. *Revista del Museo Provincial de Ciencias Naturales* 1, 9–26.
- Barros, M.B.L., de Almeida Paes, R., Schubach, A.O., 2011. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 633–654. <https://doi.org/10.1128/CMR.00007-11>.
- Bauer, D.F., 1972. Constructing confidence sets using rank statistics. *J. Am. Stat. Assoc.* 67, 687–690.
- Behrensmeyer, A.K., 1975. The taphonomy and paleoecology of Plio-Pleistocene vertebrate assemblage east of Lake Rudolf, Kenya. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College* 146, 473–578.
- Bergqvist, L.P., Pereira, P.V.L.G.C., Machado, A.S., Castro, M.C.D., Melki, L.B., Lopes, R.T., 2019. Osteoderm microstructure of *Rioestegotherium yanei*, the oldest Xenarthra. *An. Acad. Bras. Ciências* 91, e20181290. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920181290>.
- Bertling, M., Braddy, S., Bromley, R., Demathieu, G., Genise, J., Mikuláš, R., Nielsen, J., Nielsen, K., Rindsberg, A., Schirf, M., Uchman, A., 2006. Names for trace fossils: a uniform approach. *Lethaia* 39, 265–286. <https://doi.org/10.1080/00241160600787890>.
- Beuck, L., Freiwald, A., Taviani, M., 2010. Spatiotemporal bioerosion patterns in deep-water scleractinians from off santa maria di Leuca (apulia, ionian sea). *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 57, 458–470. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2009.06.019>.
- Biaggini, M., Corti, C., 2018. Facing habitat reduction in your own shell: patterns of non-lethal injuries in the endangered tortoise *Testudo hermanni* in Italy. *Herpetol. Conserv. Biol.* 13, 539–550.
- Biot, L., 2017. Synthèse des connaissances actuelles sur la cistude d'Europe (*Emys orbicularis*) et étude d'une pathologie de sa carapace. Ph.D. thesis. Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, p. 187.
- Britt, B.B., Scheetz, R.D., Dangerfield, A., 2008. A suite of dermestid beetle traces on dinosaur bone from the upper jurassic morrison formation, Wyoming, USA. *Ichnos* 15, 59–71. <https://doi.org/10.1080/10420940701193284>.
- Bromley, R.G., 1996. *Trace Fossils: Biology, Taphonomy and Applications*. Springer US, Boston, MA.

- Bromley, R.G., Surlyk, F., 1973. Borings produced by brachiopod pedicles, fossil and recent. *Lethaia* 6, 349–365. <https://doi.org/10.1111/j.1502-3931.1973.tb01203.x>.
- Bryant, S.V., Bellairs, A.D.A., 1967. Tail regeneration in the lizards *Anguis fragilis* and *Lacerta dugesii*. *Zool. J. Linn. Soc.* 46, 297–305. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1967.tb00510.x>.
- Cartelle, C., Bohórquez, G.A., 1984. *Pampatherium paulacoutoi*, uma nova espécie de tatu gigante da Bahia, Brasil (Edentata, Dasypodidae). *Rev. Bras. Zool.* 2, 229–254. <https://doi.org/10.1590/S0101-81751983000400003>.
- Chen, I.H., Kiang, J.H., Correa, V., Lopez, M.I., Chen, P.Y., McKittrick, J., Meyers, M.A., 2011. Armadillo armor: mechanical testing and micro-structural evaluation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4, 713–722. <https://doi.org/10.1016/j.jmbm.2010.12.013>.
- Cherchi, A., Buosi, C., Zuddas, P., De Giudici, G., 2012. Bioerosion by microbial euendoliths in benthic foraminifera from heavy metal-polluted coastal environments of Portovesme (south-western Sardinia, Italy). *Biogeosciences* 9, 4607–4620. <https://doi.org/10.5194/bg-9-4607-2012>.
- Ciancio, M.R., Krmptovic, C.M., Scarano, A.C., Epelle, M.B., 2019. Internal morphology of osteoderms of extinct armadillos and its relationship with environmental conditions. *J. Mamm. Evol.* 26, 71–83. <https://doi.org/10.1007/s10914-017-9404-y>.
- Cione, A.L., Gasparini, G.M., Soibelzon, E., Soibelzon, L.H., Tonni, E.P., 2015. The Great American Biotic Interchange, SpringerBriefs in Earth System Sciences. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-9792-4>.
- Collins, F.M., 1989. Mycobacterial disease, immunosuppression, and acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 360–377. <https://doi.org/10.1128/CMR.2.4.360>.
- Cox, N.H., Irving, B., 1993. Cutaneous 'ringworm' lesions of *Scopulariopsis breviculis*. *Br. J. Dermatol.* 129, 726–728. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1993.tb03341.x>.
- Da Fonseca, F., 1936. Sobre o macho de *Tunga traversosi* Pinto e Dreyfus, 1927, e o parasitismo de *Euphractes sexcinctus* L. por *Tunga penetrans* (L. 1758) (Siph., Tungidae). *Annu. Rev. Entomol.* 6, 421–424.
- D'Agostino, R.B., 1970. Transformation to normality of the null distribution of G1. *Biometrika* 57 (3), 679–681.
- De Lima, F.C.G., Porpino, K.D.O., 2018. Ectoparasitism and infections in the exoskeletons of large fossil cingulates. *PLoS One* 13, e0205656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205656>.
- De Valais, S., Díaz-Martínez, I., Citton, P., Maniel, I., de la Fuente, M., 2020. A predation attempt in a Late Cretaceous pleurodire turtle from Patagonia. *Cretac. Res.* 107, 104290. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2019.104290>.
- Deem, S.L., Noss, A.J., Fiorello, C.V., Manharth, A.L., Robbins, R.G., Karesh, W.B., 2009. Health assessment of free-ranging three-banded (*Tolypeutes matacus*) and nine-banded (*Dasypus novemcinctus*) armadillos in the Gran Chaco, Bolivia. *J. Zoo Wildl. Med.* 40, 245–256.
- Degreef, H., 2008. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia* 166, 257–265. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9101-8>.
- Deps, P., Antunes, J.M., Santos, A.R., Collin, S.M., 2020. Prevalence of *Mycobacterium leprae* in armadillos in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 14, e0008127. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008127>.
- Di Nucci, D.L., Ezquiaga, M.C., Abba, A.M., 2017. *Tunga penetrans* in Giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) from Argentina. *Vet. Parasitol.: Regional Studies and Reports* 10, 82–84. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.08.012>.
- Donnelly, T.M., Rush, E.M., Lackner, P.A., 2000. Ringworm in small exotic pets. In: *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, vol. 9, pp. 82–93. <https://doi.org/10.1053/ax.2000.5045>.
- Dukik, K., Muñoz, J.F., Jiang, Y., Feng, P., Sigler, L., Stielow, J.B., Freeke, J., Jamalian, A., Ende, B.G., McEwen, J.G., Clay, O.K., Schwartz, L.S., Govender, N.P., Maphanga, T.G., Cuomo, C.A., Moreno, L.F., Kenyon, C., Borman, A.M., de Hoog, S., 2017. Novel taxa of thermally dimorphic systemic pathogens in the Ajellomycetaceae (Onygenales). *Mycoses* 60, 296–309. <https://doi.org/10.1111/myc.12601>.
- Ezquiaga, M.C., 2013. Estudios parasitológicos en Dasypodidae (Mammalia, Xenarthra) de Argentina: El valor de la diversidad en la interpretación de las asociaciones parásito-hospedador-ambiente. PhD Thesis. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP, p. 220p.
- Ezquiaga, M.C., Lareschi, M., Abba, A.M., Navone, G.T., 2008. Nuevos registros de pulgas (Siphonaptera) parásitas de dasipódidos (Mammalia: Xenarthra) en el noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozool. Neotrop.* 15, 193–196.
- Ezquiaga, M.C., Linardi, P.M., De Avelar, D.M., Lareschi, M., 2015. A new species of *Tunga* perforating the osteoderms of its armadillo host in Argentina and redescription of the male of *Tunga trassasi*. *Med. Vet. Entomol.* 29, 196–204. <https://doi.org/10.1111/mve.12106>.
- Ezquiaga, M.C., Abba, A.M., Cassini, G.H., Lareschi, M., 2017. Prevalence and intensity of fleas parasitizing an isolated population of screaming hairy armadillo in Buenos Aires province, Argentina: host-related factors and temporal dynamics. *Parasitol. Res.* 116, 2895–2900. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5595-7>.
- Ezquiaga, M.C., Rios, T.A., Gallo, J.A., Abba, A.M., 2020. Evidencias de pulgas en xenarctos de Argentina: nuevos registros geográficos de corazas de armadillos perforadas. *Notas sobre Mamíferos Sudamericanos* 1, 1–8. <https://doi.org/10.31687/snremms.20.0.04>.
- Fernandez-Jalvo, Y., Andrews, P., 2016. Atlas of Taphonomic Identifications: 1001 + Images of Fossil and Recent Mammal Bone Modification, Vertebrate Paleobiology and Paleoanthropology. Springer Netherlands, Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7432-1>.
- Fernicola, J.C., Porpino, K.D.O., 2012. Exoskeleton and systematics: a historical problem in the classification of glyptodonts. *J. Mamm. Evol.* 19, 171–183. <https://doi.org/10.1007/s10914-012-9186-1>.
- Fernicola, J.C., Rinderknecht, A., Jones, W., Vizcaíno, S.F., Porpino, K., 2017. A new species of *neoglyptatelus* (mammalia, Xenarthra, Cingulata) from the late Miocene of Uruguay provides new insights on the evolution of the dorsal armor in cingulates. *Ameghiniana* 55, 233–252. <https://doi.org/10.5710/AMGH.02.12.2017.3150>.
- Fiorelli, L.E., 2010. Predation bite-marks on a peirosaurid crocodyliform from the upper cretaceous of neuquén province, Argentina. *Ameghiniana* 47, 387–400. <https://doi.org/10.5710/AMGH.v47i3.1>.
- Frankham, R., 2005. Genetics and extinction. *Biol. Conserv.* 126, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.05.002>.
- Fruta, C.C., Lima, L.N.C., Rocha, A.S., Suffys, P.N., Rolim, B.N., Rodrigues, L.C., Barreto, M.L., Kendall, C., Kerr, L.R.S., 2012. *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractes sexcinctus*) and nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 209–213. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900029>.
- Gois, F., Scillato-Yané, G.J., Carlini, A.A., Guilherme, E., 2013. A new species of *scirotherium* edmund & theodor, 1997 (Xenarthra, Cingulata, Pampatheriidae) from the late Miocene of South America. *Alcheringa* 37, 177–188. <https://doi.org/10.1080/03115518.2013.733510>.
- Golubic, S., Radtke, G., Campbell, S.E., Lee, S.J., Vogel, K., Wisshak, M., 2014. The complex fungal microboring trace *Saccomorpha stereodiktyni* sp. nov. Reveals growth strategy of its maker. *Ichnos* 21, 100–110. <https://doi.org/10.1080/10420940.2014.888301>.
- Gupta, A.K., Summerbell, R.C., 2000. *Tinea capitis*. *Med. Mycol.* 38, 255–287. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.4.255.287>.
- Hammond, H., Lareschi, M., Zilio, L., Ezquiaga, M.C., Castro, A., 2014. Placas óseas perforadas de *Zaedyus pichiy* en un contexto arqueológico: elementos confeccionados antropicamente o generados por agentes biológicos? un abordaje interdisciplinario. *Ateq Na* 4, 9–36.
- Hau, J., Van Hoosier, G., 2003. *Handbook of Laboratory Animal Science, Second Edition: Essential Principles and Practices*. CRC Press.
- Hill, R.V., 2005. Integration of morphological data sets for phylogenetic analysis of amniota: the importance of integumentary characters and increased taxonomic sampling. *Syst. Biol.* 54, 530–547. <https://doi.org/10.1080/10635150590950326>.
- Hill, R.V., 2006. Comparative anatomy and histology of xenarthran osteoderms. *J. Morphol.* 267, 1441–1460. <https://doi.org/10.1002/jmor.10490>.
- Hollander, M., Wolfe, D.A., 1973. *Nonparametric Statistical Methods*. John Wiley & Sons, New York, pp. 115–120.
- Höpner, S., Bertling, M., 2017. Holes in bones: ichnotaxonomy of bone borings. *Ichnos* 24, 259–282. <https://doi.org/10.1080/10420940.2017.1289937>.
- Hubbe, A., Hubbe, M., Neves, W., 2007. Early Holocene survival of megafauna in south America. *J. Biogeogr.* 34, 1642–1646.
- Indrani, S., 2015. *Veterinary Micrology*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2280-4>.
- Jellison, W.L., Lord, R.D., 1964. *Adiaspiromycosis* in Argentine mammals. *Mycologia* 56, 374–383.
- Jensen, H.E., 2003. *Animal models in mycology*. In: Hau, J., Van Hoosier, G. (Eds.), *Handbook of Laboratory Animal Science, Second Edition: Essential Principles and Practices*. CRC Press, pp. 125–152.
- Kaplan, W., Broderston, J.R., Pacific, J.N., 1982. Spontaneous systemic sporotrichosis in nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Sabouraudia* 20, 289–294. <https://doi.org/10.1080/00362178285380421>.
- Karl, H.-V., Gröning, E., Brauckmann, C., 2012. Revision of *Trapidemyx seebachi* portis, 1878 (Testudines: eucryptodira) from the kimmeridgian (late jurassic) of hannover (northwestern Germany). *Studia Palaeoichnologia* 4, 11–24.
- Karunamoorthy, K., 2013. Tungiasis: a neglected epidermal parasitic skin disease of marginalized populations—a call for global science and policy. *Parasitol. Res.* 112, 3635–3643. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3551-8>.
- Komsta, L., Novomestky, F., 2015. *Moments, Moments, Cumulants, Skewness, Kurtosis and Related Tests*. R Package version 1.
- Krmptovic, C.M., Ciancio, M.R., Barbeito, C., Mario, R.C., Carlini, A.A., 2009. Osteoderm morphology in recent and fossil euphractine xenarthrans. *Acta Zool.* 90, 339–351. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2008.00359.x>.
- Krmptovic, C.M., Ciancio, M.R., Carlini, A.A., Castro, M.C., Scarano, A.C., Barbeito, C.G., 2015. Comparative histology and ontogenetic change in the carapace of armadillos (Mammalia: dasypodidae). *Zoomorphology* 134, 601–616. <https://doi.org/10.1007/s00435-015-0281-8>.
- Kushida, T., Watanabe, S., 1975. Canine ringworm caused by *Trichophyton rubrum*: probable transmission from man to animal. *Med. Mycol.* 13, 30–32. <https://doi.org/10.1080/00362177585190051>.
- Linardi, P.M., 2005. Siphonaptera. In: Neves, D.P. (Ed.), *Parasitologia Humana*. Atheneu, São Paulo, pp. 397–411.
- Linardi, P.M., 2011. Checklist de Siphonaptera (insecta) do estado de São Paulo. *Biota Neotropica* 11, 607–617. <https://doi.org/10.1590/s1676-06032011000500027>.
- Linardi, P.M., Guimarães, L.R., 2000. Sifonápteros do Brasil. In: Linardi, P.M., Guimarães, L.R. (Eds.), *Sifonápteros Do Brasil*. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, p. 291.
- Linardi, P.M., De Avelar, D.M., 2014. Neosomes of tungid fleas on wild and domestic animals. *Parasitol. Res.* 113, 3517–3533. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4081-8>.
- Lopes, R.P., Ferigolo, J., 2017. Post mortem modifications (pseudopaleopathologies) in middlelate Pleistocene mammal fossils from southern Brazil. *Rev. Bras. Palaontol.* 18, 285–306. <https://doi.org/10.4072/rbp.2015.2.09>.
- Lucas, S.G., 2016. Two new, substrate-controlled nonmarine ichnofacies. *Ichnos* 23, 248–261. <https://doi.org/10.1080/10420940.2016.1181066>.
- Maas III, A.K., 2013. Vesicular, ulcerative, and necrotic dermatitis of reptiles. *Vet. Clin. Exot. Anim. Pract.* 16, 737–755. <https://doi.org/10.1016/j.cvev.2013.05.007>.

- Marinho, T.S., Iori, F.V., 2011. A large titanosaur (Dinosauria, Sauropoda) osteoderm with possible bite marks from Ibirá, São Paulo state, Brazil. *Paleontologia: Cenários de Vida* 4, 369–379.
- Marshall, C.R., Lindsey, E.L., Villavicencio, N.A., Barnosky, A.D., 2015. A quantitative model for distinguishing between climate change, human impact, and their synergistic interaction as drivers of the late quaternary megafaunal extinctions. *Paleontol. Soc. Pap.* 21, 1–20. <https://doi.org/10.1017/S108933260002941>.
- Matthias, A.E., McWhinney, L.A., Carpenter, K., 2016. Pathological pitting in ankylosaur (Dinosauria) osteoderms. *International Journal of Paleopathology* 13, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2016.02.006>.
- Maverakis, E., Ma, C., Shinkai, K., Fiorentino, D., Callen, J.P., Wollina, U., Marzano, A.V., Wallach, D., Kim, K., Schadt, C., Ormerod, A., Fung, M.A., Steel, A., Patel, F., Qin, R., Craig, F., Williams, H.C., Powell, F., Merleev, A., Cheng, M.Y., 2018. Diagnostic criteria of ulcerative Pyoderma Gangrenosum: a delphi consensus of international experts. *JAMA Dermatology* 154, 461–466. <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2017.5980>.
- McDonald, H.G., 2018. An overview of the presence of osteoderms in sloths: implications for osteoderms as a plesiomorphic character of the Xenarthra. *J. Mamm. Evol.* 25, 485–493. <https://doi.org/10.1007/s10914-017-9415-8>.
- McNab, B.K., 1965. Energetics, population biology, and distribution of Xenarthrans, living and extinct. In: Montgomery, G.G. (Ed.), *The Evolution and Ecology of Armadillos, Sloths, and Vermilingus*. Smithsonian Institution Press, Washington and London, pp. 219–232.
- Medri, I.M., 2008. Ecologia e história natural do tatu-peba, *Euphractus sexinctus* (Linnaeus, 1758), no Pantanal da Nhecolândia, Mato Grosso do Sul. MSc Thesis. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, p. 167p.
- Mehlhorn, H., 2016. *Encyclopedia of Parasitology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4>.
- Meyer, N., Wisshak, M., Freiwald, A., 2020. Ichnodiversity and bathymetric range of microbioerosion traces in polar barnacles of Svalbard. *Polar Res.* 39, 1–18. <https://doi.org/10.33265/polar.v39.3766>.
- Miller, H., Ocampo, J., Ayala, A., Trujillo, J., Feldmeier, H., 2019. Very severe tungiasis in Amerindians in the Amazon lowland of Colombia: a case series. *PLoS Neglected Trop. Dis.* 13, e0007068. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007068>.
- Molinu, A.R., Doménech, R., Martinell, J., 2015. Microendoliths in lower pliocene oysters from the alt emporia basin, NW Mediterranean: paleoenvironmental inferences. *Ichnos* 22, 77–86. <https://doi.org/10.1080/10420940.2015.1030071>.
- Monjeu, J.A., Araujo, B., Abramson, G., Kuperman, M.N., Laguna, M.F., Lanata, J.L., 2017. The controversy space on Quaternary megafaunal extinctions. *Quat. Int.* 431, 194–204. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2015.10.022>.
- Montalvo, C.I., Fernández, F.J., Galmes, M.A., Santillán, M.A., Cereghetti, J., 2016. Crowned solitary eagle (*Buteogallus coronatus*) as accumulator of armadillo osteoderms in the archaeological record? An actualistic taphonomic study for central Argentina. *Quat. Int.* 391, 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.quaint.2015.08.017>.
- Moura, J.F., Gois, F., Galliani, F.C., Fernandes, M.A., 2019. A new and most complete pamphateres (mammalia, Xenarthra, Cingulata) from the quaternary of Bahia, Brazil. *Zootaxa* 4661, 401–444. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4661.3.1>.
- Nagy, N., Abari, E., D'Haese, J., Calheiros, C., Heukelbach, J., Mencke, N., Feldmeier, H., Mehlhorn, H., 2007. Investigations on the life cycle and morphology of *Tunga penetrans* in Brazil. *Parasitol. Res.* 101, 233–242. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0683-8>.
- Nascimento, C.S.I., Moura, J.F., Robbi, B., Fernandes, M.A., 2020. Lesions in osteoderms of pamphateres (Mammalia, Xenarthra, Cingulata) possibly caused by fleas. *Acta Trop.* 211, 105614. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105614>.
- Oliveira, I.V.P.M., Deps, P.D., Antunes, J.M.A.P., 2019. Armadillos and Leprosy: from Infection to Biological Model. vol. 61. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961044>.
- Ozeki, C.S., Martill, D.M., Smith, R., Ibrahim, N., 2020. Biological modification of bones in the cretaceous of north africa. *Cretac. Res.* 114, 104529. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2020.104529>.
- Pampiglione, S., Fioravanti, M.L., Gustinelli, A., Onore, G., Mantovani, B., Luchetti, A., Trentini, M., 2009. Sand flea (*Tunga* spp.) infections in humans and domestic animals: state of the art. *Med. Vet. Entomol.* 23, 172–186. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00807.x>.
- Parkinson, A.H., 2016. Traces of insect activity at cooper's D fossil site (cradle of humankind, South Africa). *Ichnos* 23, 322–339. <https://doi.org/10.1080/10420940.2016.1202685>.
- Perea, D., Verde, M., Montenegro, F., Toriño, P., Manzueti, A., Roland, G., 2020. Insect trace fossils in glyptodonts from Uruguay. *Ichnos* 27, 70–79. <https://doi.org/10.1080/10420940.2019.1584562>.
- Perry, C.T., Macdonald, I.A., 2002. Impacts of light penetration on the bathymetry of reef microboring communities: implications for the development of microendolithic trace assemblages. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 186, 101–113. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(02\)00446-7](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(02)00446-7).
- Piepenbrink, H., 1986. Two examples of biogenous dead bone decomposition and their consequences for taphonomic interpretation. *J. Archaeol. Sci.* 13, 417–430. [https://doi.org/10.1016/0305-4403\(86\)90012-9](https://doi.org/10.1016/0305-4403(86)90012-9).
- Pino, M., Abarzúa, A.M., Astorga, G., Martel-Cea, A., Cossio-Montecinos, N., Navarro, R. X., Lira, M.P., Labarca, R., LeCompte, M.A., Adedeji, V., Moore, C.R., Bunch, T.E., Mooney, C., Wolbach, W.S., West, A., Kennett, J.P., 2019. Sedimentary record from Patagonia, southern Chile supports cosmic-impact triggering of biomass burning, climate change, and megafaunal extinctions at 12.8 ka. *Sci. Rep.* 9, 4413. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-38089-y>.
- Pirrone, C.A., Buatois, L.A., 2016. Bioeroded dinosaur bones: novel signatures of necrophagous activity in a Cretaceous continental environment. *Ichnos* 23, 340–348.
- Pirrone, C.A., Luna, C.A., 2015. Paleocology of circular perforations in bone: a study case in glyptodont carapaces. In: III Simposio Latinoamericano de Icnología, vol. 63.
- Pirrone, C.A., Buatois, L.A., Bromley, R.G., 2014a. Ichnotaxobases for bioerosion trace fossils in bones. *J. Paleontol.* 88, 195–203. <https://doi.org/10.1666/11-058>.
- Pirrone, C.A., Buatois, L.A., González Riga, B., 2014b. A new ichnospecies of *Cubiculum* from Upper Cretaceous dinosaur bones in Western Argentina. *Ichnos* 21, 251–260. <https://doi.org/10.1080/10420940.2014.958225>.
- Queiroz-Telles, F., Fahal, A.H., Falci, D.R., Caceres, D.H., Chiller, T., Pasqualotto, A.C., 2017. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect. Dis.* 17, e367–e377. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30306-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7).
- R Core Team, 2013. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Radtke, G., Golubic, S., 2005. Microborings in mollusk shells, Bay of Safage, Egypt: morphometry and ichnology. *Facies* 51, 118–134.
- Radtke, G., Schäfer, P., Blaschek, H., Golubic, S., 2011. Microborings from shallow marine habitats on both sides of the Panama Isthmus. *Ann. Natihist Mus Wien* 113, 245–265.
- Radtke, G., Campbell, S.E., Golubic, S., 2016. *Conchoclichnus seilacheri* gen. et sp. nov., a Complex Microboring Trace of Bangalean Rhynchophytes. *Ichnos* 23, 228–236. <https://doi.org/10.1080/10420940.2016.1199428>.
- Raggatt, L.J., Partridge, N.C., 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J. Biol. Chem.* 285, 25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.r109.041067>.
- Richini-Pereira, V.B., Bosco, S.M.G., Griese, J., Theodoro, R.C., Macoris, S.A.G., Da Silva, R.J., Barrozo, L., Tavares, P.M.S., Zancopé-Oliveira, R.M., Bagagli, E., 2008. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med. Mycol.* 46 (1), 35–40. <https://doi.org/10.1080/13693780701553002>.
- Richini-Pereira, V., Bosco, S., Theodoro, R., Barrozo, L., Pedrini, S., Rosa, P., Bagagli, E., 2009. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *BMC Res. Notes* 2, 228. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-228>.
- Rindsberg, A.K., 2015. Construction of ichnogenetic names. *Ann. Soc. Geol. Pol.* 85, 529–549. <https://doi.org/10.14241/asgp.2015.032>.
- Rindsberg, A.K., 2018. Ichnotaxonomy as a science. *Ann. Soc. Geol. Pol.* 88, 91–110. <https://doi.org/10.14241/asgp.2018.012>.
- Roberts, E.M., Rogers, R.R., Foreman, B.Z., 2007. Continental insect borings in dinosaur bone: examples from the late cretaceous of Madagascar and Utah. *J. Paleontol.* 81, 201–208. [https://doi.org/10.1666/0022-3366\(2007\)81\[201:icibib\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1666/0022-3366(2007)81[201:icibib]2.0.co;2).
- Rook, A.J., Frain-Bell, W., 1954. Cattle ringworm. *Br. Med. J.* 20, 1198–1200.
- Rothschild, M., 1992. Neosomy in fleas, and the sessile life-style. *J. Zool.* 226, 613–629. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1992.tb07504.x>.
- Royston, P., 1982. An extension of Shapiro and Wilk's W test for normality to large samples. *J. Roy. Stat. Soc. Series C (Applied Statistics)* 31, 115–124. <https://doi.org/10.2307/2347973>.
- Santos, A., Mayoral, E., 2006. Bioerosive Structures of sclerozoan foraminifera from the Lower Pliocene of Southern Spain: a contribution to the paleoecology of marine hard substrate communities. *Paleoentology* 49, 719–732. <https://doi.org/10.1111/j.1475-4983.2006.00560.x>.
- Santos, A., Mayoral, E., 2008. Bioerosion versus colonisation on Bivalvia: a case study from the Upper Miocene of Canela (southeast Portugal). *Geobios* 41, 43–59. <https://doi.org/10.1016/j.geobios.2007.01.009>.
- Sanusi, I.D., Brown, E.B., Shepard, T.G., Grafton, W.D., 1989. Tungiasis: report of one case and review of the 14 reported cases in the United States. *J. Am. Acad. Dermatol.* 20, 941–944. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(89\)70151-8](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(89)70151-8).
- Sato, K., Jenkins, R.G., 2020. Mobile home for pholadoid boring bivalves: first example from a late cretaceous sea turtle in Hokkaido Japan. *Palaio* 35, 228–236. <https://doi.org/10.2110/palo.2019.077>.
- Scheyer, T.M., Sander, P.M., 2004. Histology of ankylosaur osteoderms: implications for systematics and function. *J. Vertebr. Paleontol.* 24, 874–893. [https://doi.org/10.1671/0272-4634\(2004\)024\[0874:HOAOFI\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1671/0272-4634(2004)024[0874:HOAOFI]2.0.CO;2).
- Schoemaker, N.J., 2016. Of scutes and scales: dermatologic conditions in reptiles with emphasis on chelonians. In: 8th World Congress of Veterinary Dermatology, p. 426.
- Scillato-Yané, G.J., Carlini, A.A., Tonni, E.P., Noriega, J.I., 2005. Paleobiogeography of the late Pleistocene pamphateres of South America. *J. S. Am. Earth Sci.* 20, 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2005.06.012>.
- Serrano-Brañas, C.L., Espinosa-Chávez, B., Maccracken, S.A., 2018. Insect damage in dinosaur bones from the Cerro del Pueblo Formation (Late Cretaceous, Campanian) Coahuila, Mexico. *J. S. Am. Earth Sci.* 86, 353–365. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2018.07.002>.
- Seuss, B., Nützel, A., 2019. Bioerosion in fossil cephalopods: a case study from the upper carboniferous buckhorn asphalt quarry Ingerstätte, Oklahoma, USA. *Facies* 65, 7. <https://doi.org/10.1007/s10347-018-0547-y>.
- Seuss, B., Wisshak, M., Mapes, R.H., Hembree, D.L., Landman, N., Lignier, V., 2016. Microbial bioerosion of erratic sub-fossil nautilus shells in a karstic cenote (lifou, loyalty islands, New Caledonia). *Ichnos* 23, 108–115. <https://doi.org/10.1080/10420940.2015.1030074>.
- Seydmosavi, S., Guillot, J., Tolooe, A., Verweij, P.E., de Hoog, G.S., 2015. Neglected fungal zoonoses: hidden threats to man and animals. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.02.031>.
- Soibelzon, E., Zurita, A.E., Carlini, A.A., 2006. *Glyptodon munisi* ameghino (mammalia, Cingulata, Glyptodontidae): redescription y anatomía. *Ameghiniana* 43, 377–384.
- Sos, T., 2012. Two extreme cases of regeneration in *Testudo graeca iberica* Palla, 1814. *Biharean Biologist* 6, 128–131.
- Spadola, F., Morici, M., 2016. Treatment of turtle shell ulcerations using photopolymerizable nano-hybrid dental composite. *J. Exot. Pet Med.* 25, 288–294. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2016.06.013>.

- Spielman, D., Brook, B.W., Briscoe, D.A., Frankham, R., 2004. Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Conserv. Genet.* 5, 439–448. <https://doi.org/10.1023/B:COGE.0000041030.76598.cd>.
- Sullivan, R.M., 1979. Dermal armor pathology in the tail of a specimen of the fossil lizard *Heloderma tuberculatus*. *Herpetologica* 35, 278–282.
- Superina, M., Loughry, W.J., 2012. Life on the half-shell: consequences of a carapace in the evolution of armadillos (*Xenarthra*: Cingulata). *J. Mamm. Evol.* 19, 217–224. <https://doi.org/10.1007/s10914-011-9166-x>.
- Superina, M., Garner, M.M., Aguilar, R.F., 2009. Health evaluation of free-ranging and captive pichis (*Zaedyus pichis*; mammalia, dasypodidae), in Mendoza province, Argentina. *J. Wildl. Dis.* 45, 174–183. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.1.174>.
- Surovell, T.A., Pelton, S.R., Anderson-Sprecher, R., Myers, A.D., 2016. Test of Martin's overkill hypothesis using radiocarbon dates on extinct megafauna. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 113, 886–891. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504020112>.
- Taylor, P.D., Wilson, M.A., Bromley, R.G., 1999. A new ichnogenus for etchings made by cheilostome bryozoans into calcareous substrates. *Palaeontology* 42, 595–604.
- Taylor, P.D., Barnbrook, J.A., Sendino, C., 2013. Endolithic biota of belemnites from the early cretaceous speeton clay formation of north yorkshire, UK. *Proc. Yorks. Geol. Soc.* 59, 227–245. <https://doi.org/10.1144/pygs2013-336>.
- Thenus, E., 1988. Lebensspuren von aquatischen Insektenlarven aus dem Jungtertiär Niederösterreichs. *Beiträge zur Paläontologie von Österreich* 14, 1–17.
- Thenus, E., Klaus, W., 1978. Lebensspuren von Ephemeropteren-Larven aus dem Jung-Tertiär des Wiener Beckens. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, pp. 177–188.
- Thuy, B., Kiel, S., Dulai, A., Gale, A.S., Kroh, A., Lord, A.R., Numberger-Thuy, L.D., Stöhr, S., Wisshak, M., 2014. First glimpse into Lower Jurassic deep-sea biodiversity: in situ diversification and resilience against extinction. *Proc. Biol. Sci.* 281, 20132624. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2624>.
- Tomassini, R.L., Montalvo, C.I., Equiuga, M.C., 2016. The oldest record of flea/armadillos interaction as example of bioerosion on osteoderms from the late Miocene of the Argentine Pampas. *International Journal of Paleopathology* 15, 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2016.08.004>.
- Tribollet, A., Pica, D., Puce, S., Radtke, G., Campbell, S.E., Golubic, S., 2018. Eudolichitic *Conchoecis* stage (Bangiales, Rhodophyta) in the skeletons of live stylasterid reef corals. *Mar. Biodivers.* 48, 1855–1862. <https://doi.org/10.1007/s12526-017-0684-5>.
- Truman, R.W., 2005. Leprosy in wild armadillos. *Lepr. Rev.* 76, 198–208.
- Truman, R.W., 2008. Leprosy. In: Vizcaino, S.F., Loughry, W.J. (Eds.), *The Biology of the Xenarthra*. University Press of Florida, Gainesville, pp. 111–119.
- Uchman, A., Rattazzi, B., 2018. A new etching trace from the Savignone Conglomerate (Oligocene), NW Italy, probably produced by limpet gastropods. *Acta Geol. Pol.* 68, 651–662. <https://doi.org/10.1515/agp-2018-0015>.
- Vallon, L., Rindsberg, A., Martin, A., 2015. The use of the terms trace, mark and structure. *Ann. Soc. Geol. Pol.* 85, 527–528. <https://doi.org/10.14241/agp.2015.014>.
- Vallon, L.H., Rindsberg, A.K., Bromley, R.G., 2016. An updated classification of animal behaviour preserved in substrates. *Geodin. Acta* 28, 5–20. <https://doi.org/10.1080/09853111.2015.1065306>.
- Vickaryous, M.K., Sire, J.Y., 2009. The integumentary skeleton of tetrapods: origin, evolution, and development. *J. Anat.* 214, 441–464. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2008.01043.x>.
- Vickaryous, M.K., Meldrum, G., Russell, A.P., 2015. Armored geckos: a histological investigation of osteoederm development in *Tarentola* (Phyllocladylidae) and *Gekko* (Gekkonidae) with comments on their regeneration and inferred function: gecko Osteoederm Development. *J. Morphol.* 276, 1345–1357. <https://doi.org/10.1002/jmor.20422>.
- Vieira, A.T., Melo, F., Lopes, H.B.V., Campos, J.C.V., Bomfim, L.F.C., Couto, P.A.A., Bevenuto, S.M.P., 2005. Projeto cadastro de fontes de abastecimento por água subterrânea, Estado da Bahia. Diagnóstico do Município de Iramáia. Salvador, Bahia, Brazil. CPRM/PRODEEM.
- Villavicencio, N.A., Lindsey, E.L., Martin, F.M., Borrero, L.A., Moreno, P.I., Marshall, C.R., Barnosky, A.D., 2016. Combination of humans, climate, and vegetation change triggered Late Quaternary megafauna extinction in the Última Esperanza region, southern Patagonia, Chile. *Ecography* 39, 125–140. <https://doi.org/10.1111/ecog.01606>.
- Wenker, C.J., Kaufman, L., Bacciarini, L.N., Robert, N., 1998. Sporotrichosis in a nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 29, 474–478.
- Wickham, H., 2011. ggplot2. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Comput. Stat.* 3, 180–185. <https://doi.org/10.1002/wics.147>.
- Wickham, H., Bryan, J., 2017. Readxl: Read Excel Files. R Package Version 1.
- Wilke, C.O., 2018. Ggrridges: Ridgeline Plots in 'ggplot2'. R package version 0.5, 1.
- Wisshak, M., 2008. Two new dwarf *Entobia* ichnospecies in a diverse aphotic ichnoecoenosis (Pleistocene/Rhodes, Greece). In: Wisshak, M., Tapanila, L. (Eds.), *Current Developments in Bioerosion*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 213–233. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77598-0-11>.
- Wisshak, M., Hüne, L., 2019. The new encrusting microproblematicum *Circumpodium enigmaticum* and its attachment trace *Circumpodichnus serialis* from the Middle Jurassic of Normandy (France). *Fossil Record* 22, 77–90. <https://doi.org/10.5194/fr-22-77-2019>.
- Wisshak, M., Porter, D., 2006. The new ichnogenus *Flagrichnus* - a paleoenvironmental indicator for cold-water settings? *Ichnos* 13, 135–145. <https://doi.org/10.1080/10420940600851255>.
- Wisshak, M., Gektidis, M., Freiwald, A., Lundalv, T., 2005. Bioerosion along a bathymetric gradient in a cold-temperate setting (Kosterfjord, SW Sweden): an experimental study. *Facies* 51, 93–117. <https://doi.org/10.1007/s10347-005-0009-1>.
- Wisshak, M., Seuss, B., Nützel, A., 2008. Evolutionary implications of an exceptionally preserved Carboniferous microboring assemblage in the Buckhorn Asphalt Lagerstätte (Oklahoma, USA). In: Wisshak, M., Tapanila, L. (Eds.), *Current Developments in Bioerosion*. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 21–54. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-77598-0-2>.
- Wisshak, M., Tribollet, A., Golubic, S., Jakobsen, J., Freiwald, A., 2011. Temperate bioerosion: ichnodiversity and biodiversity from intertidal to bathyal depths (Azores). *Geobiology* 9, 492–520. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4669.2011.00299.x>.
- Wisshak, M., Alexandrakis, E., Hoppenrath, M., 2014. The Diatom Attachment Scar *Ophthalmichnus lyolithon* igen. et isp. n. *Ichnos* 21, 111–118. <https://doi.org/10.1080/10420940.2014.907572>.
- Wisshak, M., Knaust, D., Bertling, M., 2019. Bioerosion ichnotaxa: review and annotated list. *Facies* 65, 1–39. <https://doi.org/10.1007/s10347-019-0561-8>.
- Wolff, E.D.S., Fowler, D.W., Bonde, J.W., 2007. A possible case of necrotizing dermatitis in the crocodylian *Diplocynodon*, from the Oligocene of the Isle of Wight, United Kingdom. *Hist. Biol.* 19, 203–207. <https://doi.org/10.1080/08912960600885631>.
- Wright, A.I., 1989. Ringworm in dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.* 30, 242–249. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.1989.tb01551.x>.
- Xing, L., Parkinson, A.H., Ran, H., Pirrone, C.A., Roberts, E.M., Zhang, J., Burns, M.E., Wang, T., Choiniere, J., 2016. The earliest fossil evidence of bone boring by terrestrial invertebrates, examples from China and South Africa. *Hist. Biol.* 28, 1108–1117. <https://doi.org/10.1080/08912963.2015.1111884>.
- Zhu, Q., Hastriter, M.W., Whiting, M.F., Dittmar, K., 2015. Fleas (siphonaptera) are cretaceous, and evolved with Theria. *Mol. Phylogenet. Evol.* 90, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.04.027>.
- Zonneveld, J.P., Bartels, W.S., Gunnell, G.F., McHugh, L.P., 2015. Borings in early eocene turtle shell from the wasatch formation, south pass, Wyoming. *J. Paleontol.* 89, 802–820. <https://doi.org/10.1017/jpa.2015.61>.

APÊNDICE C

Artigo “Blood parasites and acute osteomyelitis in a non-avian dinosaur (Sauropoda, Titanosauria) from the Upper Cretaceous Adamantina Formation, Bauru Basin, Southeast Brazil”, publicado em 2021, na *Cretaceous Research*.



Contents lists available at ScienceDirect

Cretaceous Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/CretRes



Short communication

Blood parasites and acute osteomyelitis in a non-avian dinosaur (Sauropoda, Titanosauria) from the Upper Cretaceous Adamantina Formation, Bauru Basin, Southeast Brazil

Tito Aureliano^{a, b, c, *}, Carolina S.I. Nascimento^c, Marcelo A. Fernandes^c,
Fresia Ricardi-Branco^a, Aline M. Ghilardi^{b, c, **}

^a Institute of Geosciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil

^b Dinosaur Ichnology and Osteohistology Laboratory (DINOlab), Department of Geology, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brazil

^c Laboratório de Paleocologia e Paleocnologia (LPP), Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE), Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2020

Received in revised form

29 September 2020

Accepted in revised form 3 October 2020

Available online 15 October 2020

Keywords:

Histology

Pathology

Parasitology

Sauropoda

Tomography

ABSTRACT

This research documents for the first time the detailed histological description of severe bone inflammation and the exceptional preservation of soft-bodied parasitological microorganisms inside the vascular canals of a non-avian dinosaur. The results bring new insights into the fields of parasitology, pathology, and histology in the fossil record. A senile titanosaur from the Upper Cretaceous of Southeast Brazil presented acute osteomyelitis, identified by the presence of a highly reactive periosteum with a filigree pattern, and localized dome-like cortical tissue inflammation connecting the former to the medulla. Furthermore, tens of parasites were identified throughout the specimen's vascular canals. Novel histological insights resulted from the developmental description of an aggressive case of osteomyelitis. The lesions were either caused or facilitated by the parasitic infestation. This may be the earliest occurrence of infectious bone disease associated with parasites, adding new information to the complex biogeographic and evolutionary history of parasitic ailments.

© 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pathologies preserved in the fossil record can provide valuable information on the physiology and behavior of individuals and their environmental pressures (e.g. Rothschild and Martin, 2006; Surmik et al., 2018; Xing et al., 2018). Paleoparasitological records, in turn, offer insights not only about the physiology of organisms and the ecology of communities but also about the evolution of parasites, hosts, and their relationship over time (Dentzien-Dias et al., 2013; Ebert and Herre, 1996; Poinar, 2008a; Poinar and Poinar, 2004). The association of parasitization and pathology in the fossil record,

ultimately, can be considered exceptional. It offers a unique opportunity to access several pieces of information regarding ancient organisms and ecosystems and refine our understanding of the past.

The occurrence of osteomyelitis in dinosaurs is rare (Hunt et al., 2019), but recent studies have corroborated the occurrence of this form of bone inflammation in Sauropodomorpha (Lew and Waldvogel, 2004; García et al., 2017; Barbosa et al., 2018; Xing et al., 2018). Evidence of fossil endoparasites of vertebrates has already been found in coprolites and invertebrate vectors preserved in amber (e.g. Dentzien-Dias et al., 2013; Poinar, 2019; Poinar and Boucot, 2006; Poinar Jr and Poinar, 2004; Poinar and Poinar, 2004). However, fossil parasites preserved directly in vertebrate tissues were unknown until the present date. Herein we describe in detail the developmental histology of a fossil bone disease, responsible for tissue deformities in a long bone of an Upper Cretaceous sauropod dinosaur, and the first record of a parasite preserved inside fossilized bone tissue.

* Corresponding author. Institute of Geosciences, University of Campinas (Unicamp), Campinas, Brazil.

** Corresponding author. Dinosaur Ichnology and Osteohistology Laboratory (DINOlab), Department of Geology, Federal University of Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brazil.

E-mail address: aureliano.tito@gmail.com (T. Aureliano).

2. Materials and methods

Institutional abbreviations: **FM-USP**, Faculty of Medicine of the University of São Paulo, São Paulo city, Brazil; **IGe-M**, Laboratory of Electron Microscopy, Institute of Geosciences, Campinas State University, Campinas, Brazil; **Lalgas**, Laboratory of Algae Biotechnology, Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos, Brazil; **LPP-PV**, Laboratório de Paleocologia e Paleocnologia (UFSCar), São Carlos, Brazil.

The studied specimen (LPP-PV-0043; Fig. 1) corresponds to a fragmentary titanosaur fibula. The material is deposited at the Laboratory of Paleocology and Paleocnology (LPP) of the Federal University of São Carlos (UFSCar), São Carlos city, São Paulo state, Brazil.

2.1. CT-scan

3D reconstruction of the specimen was attained by using a Philips Diamond Select Brilliance CT 16-slice medical scanner with more than 200 slices and a voxel size of 0.75 mm at the FM-USP. Software 3D-Slicer v4.6 (Fedorov et al., 2012) was used to process images (e.g. density contrast calculation) and generate the model.

2.2. Bone histology

For the histological analysis, we followed the general methodology presented by (Lamm, 2013). First, the specimen was saturated with penetrant stabilizer cyanoacrylate glue (PaleoBond®). Then, it was cut and immersed in resin (Araldite® 2020). Finally, samples

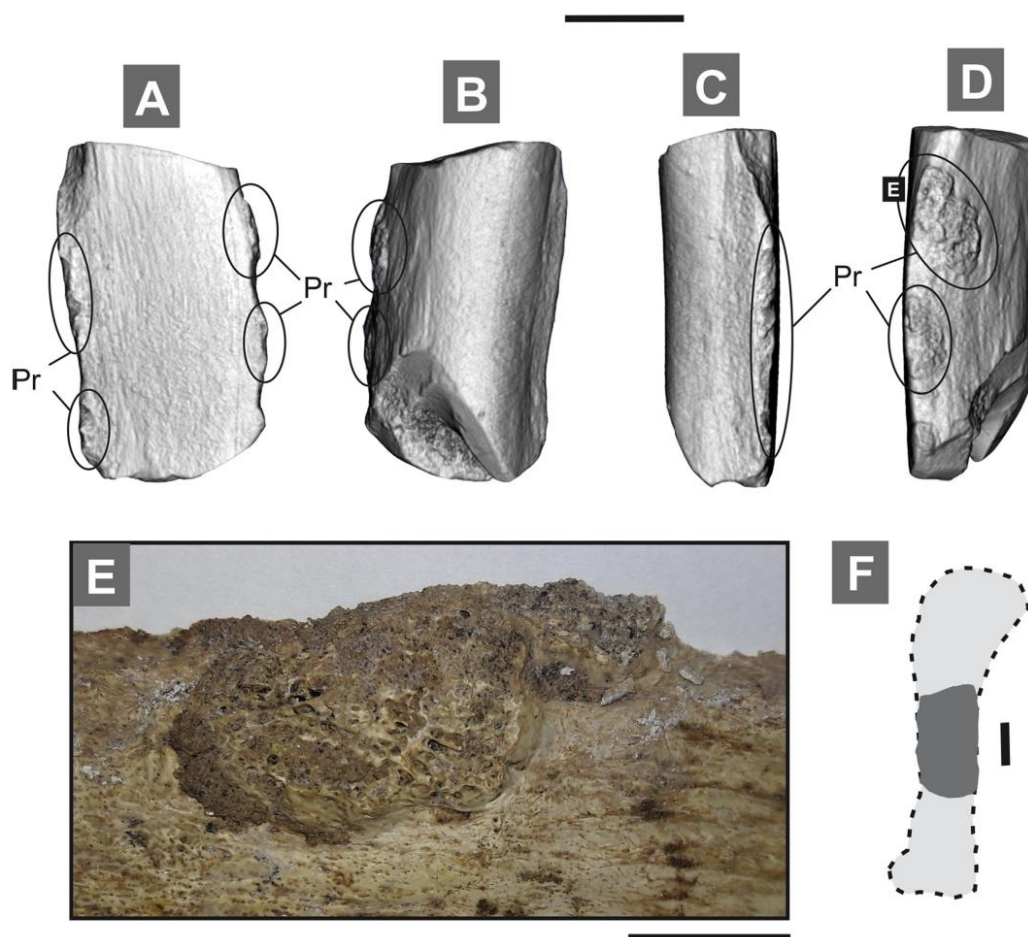


Fig. 1. Three-dimensionally reconstructed CT-Scan model of the partial titanosaur fibula LPP-PV-0043, from the Upper Cretaceous Adamantina Formation, Bauru Basin, Southeast Brazil. **A**, medial; **B**, lateral; **C**, anterior; **D**, posterior; **E**, detailed photograph of the fossilized lesion showing erupted elliptical shape and 'aero candy-like' texture; **F**, reconstructed total size of the fibula. **E** and **F** are rotated 90° clockwise. Abbreviations: **Pr**, periosteal reaction. Scale bar in **A–D**, **F** = 5 cm; in **E** = 1 cm.

were polished until section thickness was around 40 μm . Transversal sections were used for skeletochronological analysis and longitudinal sections were used to describe bone lesions. Thin sections were observed and photographed by using a petrographic ZEISS AxioScope microscope with coupled AxioCam MRC 5 camera, and imaging software ZEISS Application Suite v.4.4. Pictures were corrected for brightness and contrast in Adobe Photoshop CC 20.0.1 and composite images were prepared in Corel Draw X6.

Histological nomenclature is in accordance with Huttenlocker et al. (2013) and Padian and Lamm (2013). Vascular canal caliber measurements followed the procedures of Fleischle et al. (2019) and Huttenlocker and Farmer (2017).

2.3. Parasite identification

We used petrographic and non-filtered optical microscopes to observe and track the forms interpreted as parasites. In the first case, the same hardware used for histology was applied. For non-filtered light analysis, thin sections were studied under a Nikon Eclipse optical microscope with attached Nikon DS – F12 camera, and imaging software NIS – Elements F v4.0 at the LBA. Electron microscopy was conducted with an Oxford X-act EDS attached to a Zeiss LEO 430i SEM at the IGe-M. Samples were metalized in C (Carbon) before readings. Structures observed were measured using ImageJ v1.4 software (Schneider et al., 2012).

2.4. Parasite morphometry

We performed ordinary least-squares (OLS) regression analysis to test the association of individual width and the total length of the parasite population (in μm) in an allometric model. Additionally, we also investigated parasite size in relation to the host area spectrum in order to recover more information regarding their autecology. All computations were performed using Minitab 17 (<https://www.minitab.com>).

2.5. Data availability

Parasite measurements, further statistical data, EDS readings, and additional images are available as supplementary material. The CT-Scan data is available for download at the Morphobank (<http://morphobank.org/permalink/?P3814>).

Specimen: fragmentary titanosaur fibula LPP-PV-0043.

Locality and horizon: Ibirá municipality, Adamantina Formation (ca. 85.2 \pm 2.7 Ma, Santonian; Castro et al., 2018), Bauru Group, São Paulo state, Southeast Brazil.

2.6. Diagnosis

The shaft is massive and its cross-section is 'D shaped' (Figs. 1 and 2.A.a1-a4). The lateral process is partially preserved and is slightly lateroanteriorly oriented (Fig. 1.B-C). Cancellous bone encloses the medullary cavity completely, a characteristic typical of sauropods (e.g. Stein et al., 2010; Klein et al., 2012; García et al., 2015; Ghilardi et al., 2016), absent in theropods (except in Spinosaurinae; see Aureliano et al., 2018; Ibrahim et al., 2020, 2014). LPP-PV-0043 is a fibula diaphysis (Fig. 1.E) associated with additional elements of a new Saltasauridae titanosaur taxon currently being described separately.

3. Results

3.1. CT-scan

Tomography slices and three-dimensional model allowed internal observation of the lesioned bone (Figs. 1,2). Lesions blend the surrounding bone with a sharply defined transition zone. In Fig. 2.B, it is noticeable the distinct densities/textures of lesioned and healthy cortical bone tissue. Erosions from the inner cortex and periosteum are united posterolaterally and extend from the medulla to the cortical surface. Periosteal reaction is focal posterolaterally and anteromedially (but it is much stronger in the former portion). It is dome-shaped, with a 'geographically eroded' surface *sensu* Rothschild and Martin (2006). Connections between extremities occur two times in tower-like structures (Fig. 2.A.a5-7). The distinct texture of pathologically-affected areas follows a filigree pattern ('aero candy-like' *sensu* Rothschild and Martin, 2006). These reactions are elliptical posteriorly and interrupted on the surface (Fig. 1.A-D). Moreover, periosteum elevates forming two outpocketings posterolaterally (Fig. 2.A.a5,6 and Fig. 2.B). Periosteal reaction presents a 'disorganized' profile *sensu* Rana et al. (2009) in a longitudinal view.

3.2. Paleohistology

Samples were well preserved and histological details could be assessed. Specific topics are subdivided below. Longitudinal and cross-sections are present in Fig. S1 (see supplementary material).

3.3. Taphonomical remarks

There are no preparation marks on the surface, but isolated spots of truncated osteons populate the external bone perimeter anteromedially (Fig. S2.A; see supplementary material). Truncation may have been caused either by pre-burial transport, reworking or by post-exhumation transport. Mineral grains fill cavities in some areas, especially in the medulla (Fig. S2.B). Thin oxide layers invade secondary osteons longitudinally in the medial shaft (Fig. S2.A, C). These are early diagenetic features (Pfretzschner, 2001), despite the current absence of sulfur in these samples (see Fig. S4 in supplementary information). There are a few longitudinal diagenetic cracks (Fig. S2.D). Well-preserved phosphatized microorganisms inside vascular cavities may indicate rapid burial. Nevertheless, thin sections show moderate infilling of mineral grains from earlier burial stages. Despite these subsequent taphonomic features, the microstructure is well preserved. Titanosaur histology and parasite microanatomy could be assessed (Fig. S2 and Figs. 3–5).

3.4. Skeletochronology

The extent and type of healthy tissue vascularization maintain its pattern across thin sections (Fig. 3.A). The entire cortex has been secondarily remodeled and lacks an interstitial laminar primary bone (Fig. 3.B). At least three generations of secondary osteons overlap one another (Fig. 3.C). These latter are longitudinally arranged and present remarkable varying sizes and shapes. Each secondary osteon contains up to six layers of centripetally deposited lamellar bone. Regarding vascularization (*sensu* Huttenlocker and Farmer, 2017), the minimum canal caliber (Can_{min}) is 26 μm and the harmonic mean canal caliber ($\text{Can}_{\text{harmean}}$) is 106 μm . No LAGs (Lines of Arrested Growth) or annuli have been identified. There is no evidence of an EFS (External Fundamental System), which is a common feature marked in the growth strategy of adult-

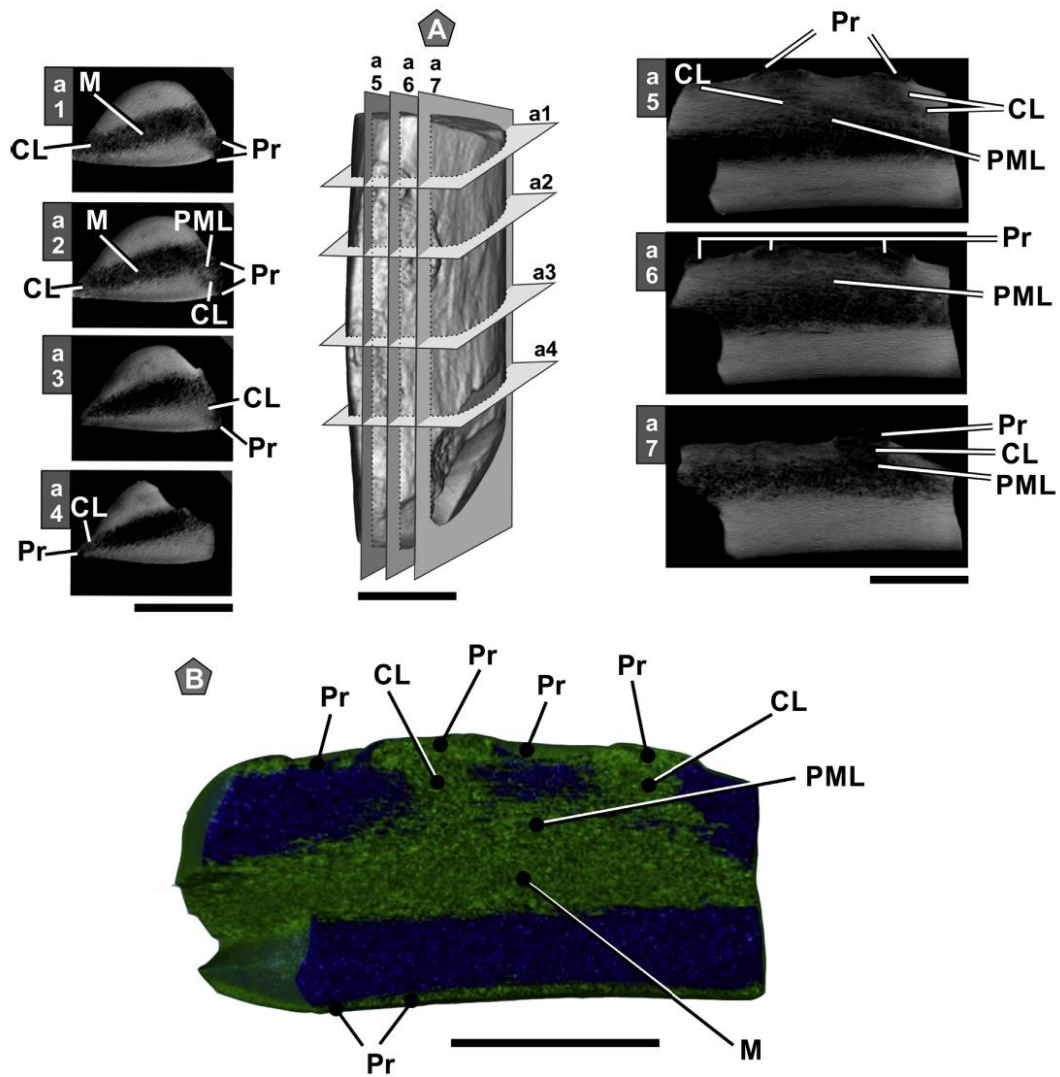


Fig. 2. A, reconstructed CT-Scan model of LPP-PV-0043 presenting transverse (a1-4) and longitudinal (a5-7) x-ray slices. B, density contrast applied to a longitudinally sliced CT-Scan model longitudinally sliced. Dark (blue) represents the denser bone matrix (eg. compacta). Light (green) comprises lower densities (eg. regular medullary spongiosa - MCb -, and lesioned cortex - Pr, CL, PML). Note the spread lesion on the surface forming two outpocketings posterolaterally. Also, observe the connection between these and the lesioned medulla throughout tower-like structures in the cortex (see CL in A.a5 and B). Abbreviations: CL, lesioned cortex; Pr, periosteal reaction; PML, perimedullary lesion; M, medulla. Scale bar = 5 cm. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

derived titanosaurs (Stein et al., 2010; García et al., 2015; Curry Rogers and Kulik, 2018).

Extreme remodeling activity completely obliterating primary tissue suggests this individual had long ceased its growth at the moment of its death (Type G bone tissue and HOS stage 13 from Klein and Sander, 2008). Furthermore, the 'senescent' status is

reinforced by applying the three-front model of (Mitchell and Sander, 2014) to the anteromedial area of the bone (Fig. 3.D). There is no precise definition of maturity status beyond 'senescent' or 'senile' in the mentioned literature. However, there is a consensus for the increasing number of successive overlapping generations of secondary osteons corresponding to an older

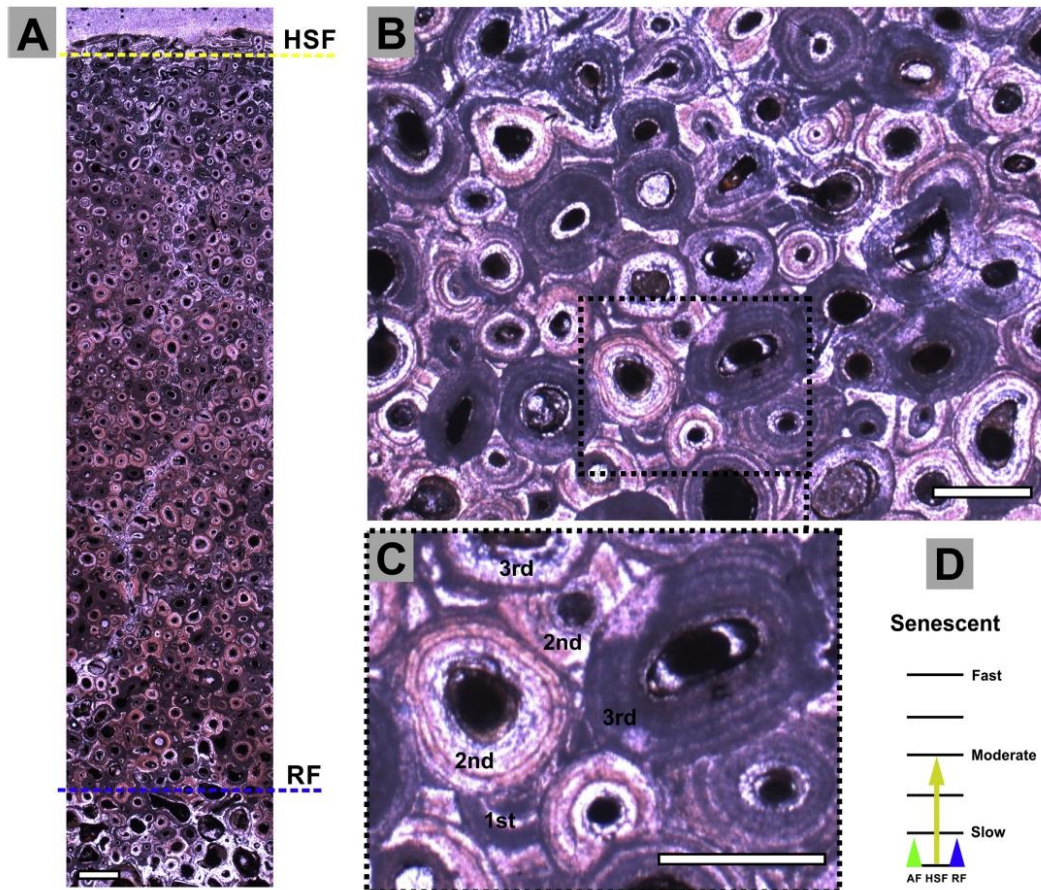


Fig. 3. Histology of titanosaur specimen LPP-PV-0043. **A**, profile at the medial portion of the shaft. Marked bone deposition fronts according to (Mitchell and Sander, 2014). **B**, longitudinally arranged secondary bone in the anteromedial inner cortex. **C**, three generations of secondary osteons overlapping one another. Note there are up to six centripetally deposited Haversian layers around osteons. Images were taken under polarized light (crossed nicols). **D**, Three-front model indicating a senile ontogenetic status according to (Mitchell and Sander, 2014). Abbreviations: **AF**, apposition front; **HSF**, Haversian substitution front; **RF**, resorption front. Scale bar in **A** = 1 mm; in **B**, **C** = 500 μ m.

individual age (Stein et al., 2010; Mitchell and Sander, 2014; García et al., 2015; Curry Rogers and Kulik, 2018).

3.5. Histology of lesion

There is no sign of ruptured tissue obstructions in the surrounding areas of the dome-shaped lesions (e.g. those expected in bite marks and other mechanical fractures) (Fig. 4A-E). The elevated periosteum producing outpocketings present reticular primary tissue. In the outer cortex, these structures (lesions) comprise highly vascularized periosteum with radial to reticulated bone (Fig. 4D, E), a condition usually observed in the fast-growing bone of juvenile amniotes (Huttenlocker et al., 2013). The frontier between senile secondary tissue and the newly formed lesioned tissue is well marked (Fig. 4A-C) and is anomalous (ontogenetically

speaking). Therefore, it could only have been formed by a disease. Lesion spreads inwards to the inner cortex with a noticeable increase in local vascularity (as seen in Fig. 2B and Fig. S1.A) and connects to the medulla.

Affected tissues are not uniform across the bone. At the moment of death, the disease was spreading in distinct stages in different areas. This enabled the observation of the graded development of this malady. In the area presenting the lowest periosteal reaction, there is a focal concentration of longitudinal fibrolamellar bone localized over the Haversian substitution front. The cortical surface shows signs of irregularity (Fig. 4.A). There is a predominance of radial canals from the surface in areas with increased periosteal reaction (Fig. 4.B,C). Zones with advanced periosteal reaction radial and reticular patterns spread all over the surface (Fig. 4.D). The most aggressive periosteal

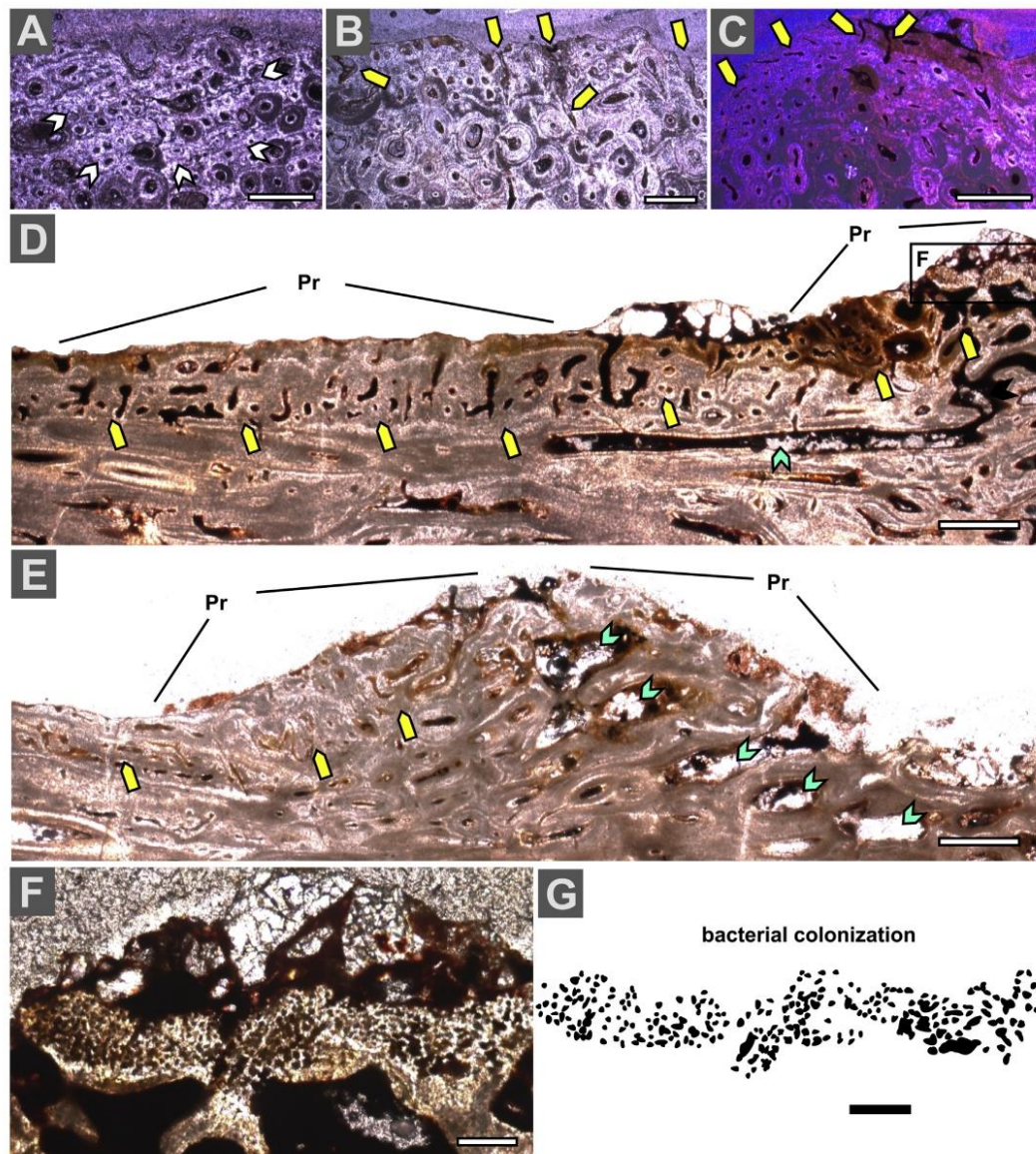


Fig. 4. Histology of the periosteal reaction to the spreading infectious lesion. Increasing tissue deformity (bone lesion) from **A** to **E**. **A**, the early stage of periosteal tissue alteration and bone sequestrum. Longitudinal fibrolamellar bone (arrow) localized over the Haversian substitution front. Note the irregular cortical surface. Localized decomposition of Haversian canals (woven matrix around osteons) in the outer cortex (white arrows). **B**, first radial canals appear from the surface (yellow arrows). **C**, the lesioned area expands on the surface and penetrates the cortex slightly. Radial vascularization is also present (arrows). **D**, aggressive periosteal reaction zone lesion spreads all over the surface comprises dominant Rad and Ret vascularization (one-tail arrows). Some spots contain Ret (one-tail arrows) and ResCav (two-tail arrow) and give rise to a small outpocketing. **E**, the well-developed outpocketing comprises predominantly Ret (one-tail arrows) containing large ResCav (two-tail arrows) in the zone with the most aggressive periosteal reaction. **F**, grouped iron oxide punctuated structures localized in the outpocketing suggest potential secondary infection with bacteria (schematic drawing in **G**). The anteromedial portion in cross-section in **A–C** were taken under (polarized light and, crossed nicols). The lateral portion in longitudinal view in **D** and **E** in (polarized light and, parallel nicols). Lambda compensator in **C**. Abbreviations: **Pr**, periosteal reaction; **Rad**, radial canals; **ResCav**, resorption cavities; **Ret**, reticulated tissue. Scale bar in **A, C–E** = 500 μ m; in **B, F, G** = 200 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

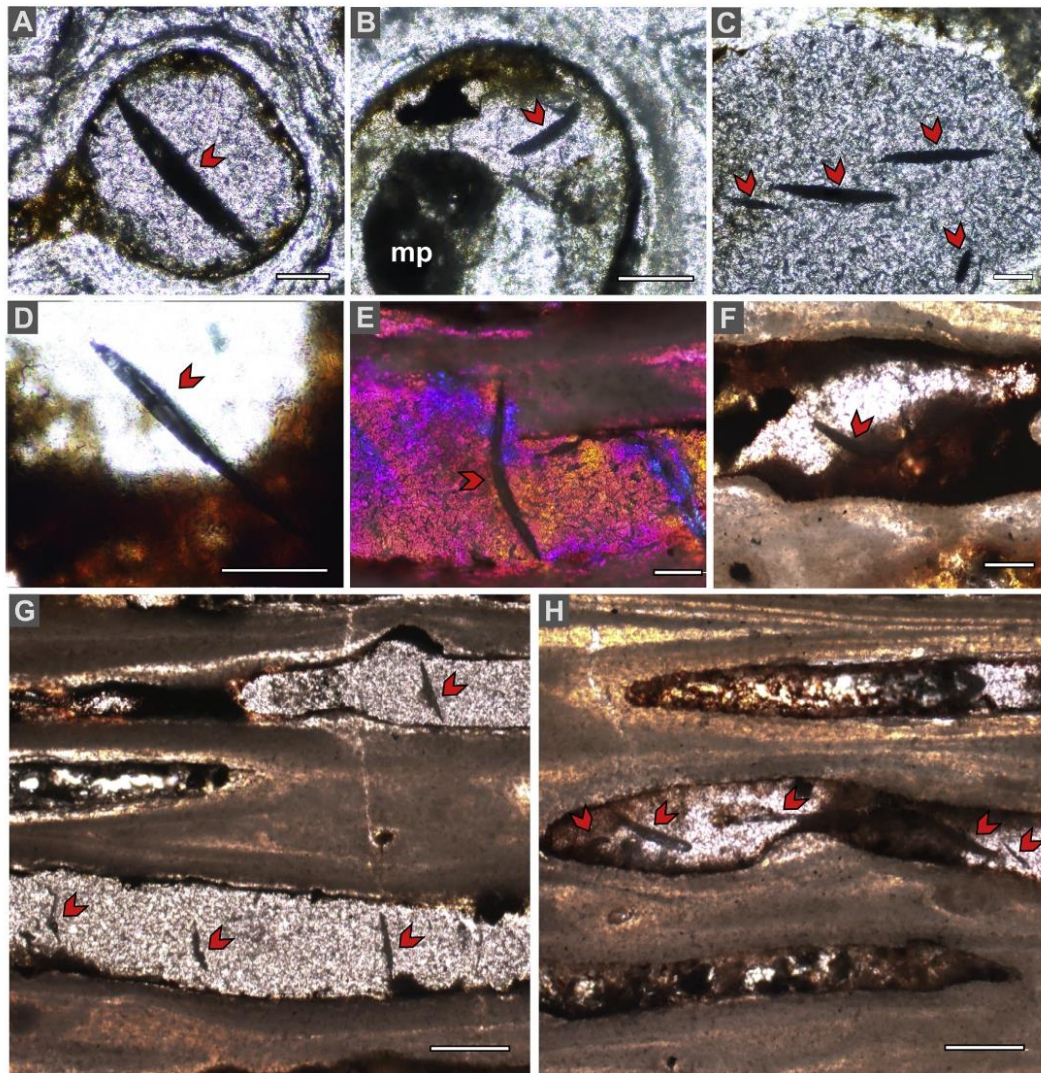


Fig. 5. Fossilized parasites preserved inside the sauropod vascular canals (A, B, E–H) and bone medulla (C, D). Individuals are indicated by red arrows. Cross-sections in A–D. Longitudinal sections in E–H. Non-filtered light in A–D. Polarized light with crossed nicols in E, and parallel nicols in F–H. Lambda compensator in E. Abbreviation: **mp**, mud pellet. Scale bar in A–D, F = 100 μ m; in G, H = 200 μ m; in E = 50 μ m. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

reaction areas comprise a predominant increase in reticular vascularization and resorption cavities, and give rise to the out-pocketings (Fig. 4.D, E).

3.6. Differential diagnosis

Since the observed area does not pertain to articulation, arthritis (e.g. spondyloarthropathies) can be discarded (Rothschild and

Martin, 2006). Identification of tuberculosis can be eliminated because tissue anomalies present a filigree pattern (Rothschild and Martin, 2006; Surmik et al., 2018). Furthermore, the lesion also does not comprise a solid avascular periosteum (as a case previously observed in a Triassic marine reptile; Surmik et al., 2018). Neoplasm (cancer) can be discarded as well because surface eruptions and tissue reactions follow a filigree pattern (Rothschild and Martin, 2006). The presence of periosteal and perimedullary

reactions, the filigree pattern, and the dome-like cortical tissue inflammation connecting Pr to medulla are indicative of osteomyelitis (Rothschild and Martin, 2006). In this work, we followed the definition that osteomyelitis is an infection-driven bone lesion not limited to the external surface (Rothschild et al., 2012). In addition, the 'disorganized' profile of the periosteal reaction, the outpocketings, the high vascularization, and the abundance of resorption chambers support an aggressive acute infection (Carek et al., 2001; Costa et al., 2009; Fondi and Franchi, 2007; Hatzenbuehler and Pulling, 2011; Rana et al., 2009) (see Fig. 4). The occurrence of concentrated horizontally-deposited dark dots localized strictly on top of an outpocketing (see Fig. 4.F, G) suggests bacterial colonization (Pesquero et al., 2010; Pfretzschner, 2001; Shapiro and Spangler, 2009; Trueman and Martill, 2002). Notwithstanding, this might have been an effect of secondary infection with bacteria after ulceration (The Institute for International Cooperation in Animal Biologics and the Center for Food Security and Public Health, 2017).

3.7. Paleoparasitology

Abundant dark grey to slightly green fusiform shapes ($n = 64$), measuring between 100 and 650 μm in length, and 10–80 μm in width, were observed inside cortical vascular canals and medullary spongiosa of both lesioned area and healthy cortex, and the medulla (Figs. 5, 6).

All referred forms have irregular anisotropy (see Fig. 5.D, E), and EDS readings demonstrate they are not chemically uniform, being mostly formed by calcium phosphate with some localized readings of clay minerals and silica (see Fig. S5 in supplementary material).

The morphology of these structures is constant, always showing one subtle more tapered end.

Two dark/more opaque spots, one larger located centrally and one smaller located close to the more tapered end, were observed in several of the analyzed specimens. When visible, these spots were of consistent size and location. Electron microscopy attested their denser nature and distinct chemical composition (Fig. S5).

The fusiform shapes here described are tentatively interpreted as indeterminate fossilized microorganisms.

The linear regression analysis performed indicated that sample size ($n = 64$) and the nature of this population fit well in a compatibility model. The resulting equation was: $Y = 6.358 + 0.09884 X$, where Y is total length, and X is width (both in μm). The relationship between the structure width and total length is mostly compatible with the model ($P < 0.001$; $R\text{-sq} = 77.38\%$). The great majority of forms lays between the 95% compatibility intervals. Few lesser compatible elements vary slightly out of these intervals (residual standard deviation = 6.7 μm ; Fig. 6).

Data also suggest the proportions of the forms may be correlated with the bone region (cortex/medulla), or available vascular space. Smaller forms were found both in the cortex and the medulla, while the largest individuals ($>500 \mu\text{m}$) were all found in the medullary region (Fig. 6).

4. Discussion

4.1. Osteomyelitis histological development

Osteomyelitis identification has been historically neglected in dinosaurs due to its rarity in modern-day archosaurs (Lew and

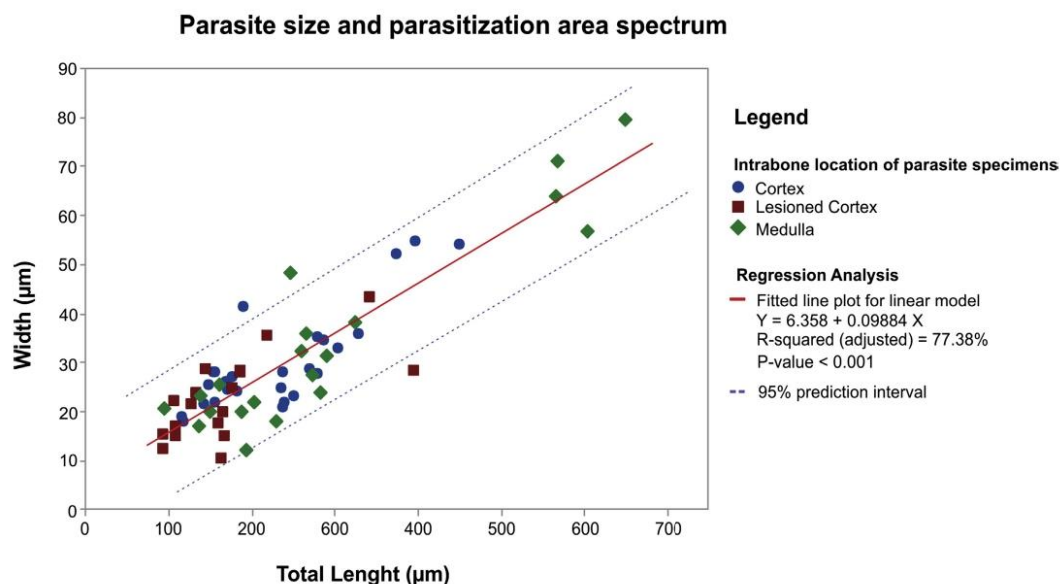


Fig. 6. Linear regression analysis relating parasite width and total length (in μm). Point cloud shapes and colors indicate the parasitized area spectrum (cortex, medulla, and lesioned cortex). Note that the medulla supports the larger forms and the lesioned cortex is the bone area that mostly restricts parasite dimensions. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)



Fig. 7. Life reconstruction of the titanosaur LPP-PV-0043 from the Upper Cretaceous Adamantina Formation in São Paulo backcountry, Southeast Brazil. The animal was reconstructed based on associated saltasaurid specimens in the area. Ulcerations reconstructed based on fossil pathologies. Artist: Hugo Cafasso.

Waldvogel, 2004). However, there are punctual occurrences in cerapods (Hunt et al., 2019; Ramírez-Velasco et al., 2017; Tanke and Rothschild, 2014), thyreophorans (McWhinney et al., 2001), and theropods (Hanna, 2002; Senter and Juengst, 2016). Furthermore, recent findings (García et al., 2017; Xing et al., 2018) and reanalyses of specimens (e.g. Barbosa et al., 2016; *sensu*; Xing et al., 2018) demonstrated this infirmity was also present in sauropodomorphs. Unfortunately, previous studies focused on diagnoses strictly based on macroscopical inspections, x-ray charts, and (rarely) tomographies (Rothschild and Martin, 2006; García et al., 2017; Barbosa et al., 2018; Xing et al., 2018).

In this titanosaur specimen, some areas remained unaffected by osteomyelitis and we were able to estimate an ontogenetic maturity. There are some natural patterns in bone growth throughout tetrapods (Francillon-Viellet et al., 1990; Huttenlocker et al., 2013). In amniotes, new bone tissue deposits centripetally around the medulla and the volume increases to the opposite direction of the latter. Every stage of skeletal maturity has its own vascularization pattern and changes dramatically throughout the life of a dinosaur. Especially titanosaurs which present high rates of secondary remodeling (Curry Rogers and Kulik, 2018). In LPP-PV-0043, there is secondary bone (Harvesian bone; see Huttenlocker et al., 2013; Klein and Sander, 2008; Mitchell and Sander, 2014; Woodward et al., 2013), even in the cortical surface of the remaining healthy area of the specimen (see Fig. 3). That is expected for a senile sauropod (Klein and Sander, 2008; Mitchell and Sander, 2014). However, the infectious periosteal reaction altered the vascularization in most of the outer cortex. Here we describe for the first time different manifestations of infection-induced periosteal reaction in detail and the histological development of the

osteomyelitis. There is a gradual increase in vascularization and a decrease in bone tissue density during the advance of the infection. The lesions of this bone are not homogeneous in scale and present different sizes throughout the fibular surface. Five different scales of periosteal reaction were detected in this specimen (Fig. 4). Furthermore, the areas with periosteal alteration present different histological profiles (distinct vascular patterns). We found that there is a certain correlation between periosteal reaction intensity and the change in vascularization pattern found in a tetrapod ontogenetic series (see Huttenlocker et al., 2013, for a resume on these patterns). Consequently, we interpreted five distinct histological manifestations of osteomyelitis development in this specimen:

- 1) In the area presenting the lowest periosteal reaction, the cortical surface shows signs of irregularity but there are no noticeable vascular alterations.
- 2) A few radial canals appear from the surface, perpendicularly.
- 3) The lesion expands along the surface and penetrates the cortex in a dominant radial pattern.
- 4) Bone reacts all over the surrounding surface in radial and reticular patterns.
- 5) Finally, the increase of both reticular vascularization and resorption cavities results in the rise of outpocketings. Additionally, the occurrence of concentrated horizontally-deposited oxidized bacterial colony traces on an outpocketing suggests there might have been ulceration and aerial exposure.

Despite the previous propositions of some classification systems of osteomyelitis in stages (Carek et al., 2001; Hatzembuehler and

Pulling, 2011; Pineda et al., 2009), those are based in radiography and other non-invasive analyses. However, most of the literature agrees that a histological profile comprising an increase in the bone lesion vascularization and resorption zones accompanied by periosteal reactions is expected for aggressive osteomyelitis prior to osteonecrosis (Carek et al., 2001; Fondi and Franchi, 2007; Hatzenbuehler and Pulling, 2011; Rana et al., 2009). Consequently, our results corroborate with previous pathology studies and provide a detailed histological description of the development of osteomyelitis.

Putative life reconstruction of the diseased dinosaur is depicted in Fig. 7.

4.2. Parasite identification

The irregular anisotropy and chemistry of the fusiform structures preserved inside the vascular regions of the analyzed fossil bone, plus the sample morphometry compatibility with an allometric model supports the biological origin of the referred structures.

The parasites described herein essentially differ from the Trypanosomatidae *Paleoleishmania* in size and behavior (Poinar, 2008b; Poinar Jr and Poinar, 2004). Our parasitic forms are much larger (~100–650 µm in length) than *Paleoleishmania* (5–10 µm in length). Size is in excess for most of the protozoan parasites, with an exception of certain amoeba-like organisms. However, further analyses and specimens are necessary to elucidate the taxonomy of these Brazilian forms.

4.3. The exceptional preservation of microorganisms

The occurrence of parasites in paleontological material is rare, especially in the Mesozoic (Dentzien-Dias et al., 2013; Poinar and Boucot, 2006; Poinar Jr and Poinar, 2004; Poinar and Poinar, 2004). Most paleoparasitological records consist of helminth eggs and, more rarely, stages of protozoan development preserved either in coprolites or amber (Dentzien-Dias et al., 2013; Leung, 2015; Poinar Jr and Poinar, 2004). While most gastrointestinal parasites generally exhibit developmental stages that confer some degree of resistance to their bodies, parasites inhabiting host tissues usually are less prone to fossilization (Poinar and Boucot, 2006). In the case here described, the exceptional preservation of trypanosomatids possibly occurred through the replication of authigenic minerals (Briggs, 2003). Si, Al, Ca, P, and other elements detected in the SEM/EDS analysis (see Fig. S5 in supplemental information) would have favored the authigenic mineralization during early diagenesis. In this stage, bone elements come into contact with the geochemical and biological systems leading to tissue decay (Keenan, 2016). Bone decomposition may have provided the ions needed for authigenic mineralization, along with the mineral grains introduced before burial, under the influence of microbial activity.

5. Conclusions

This research opened a new possibility for paleontological studies by linking the fields of parasitology, pathology, and histology. The analyzed titanosaur showed acute osteomyelitis with elliptical ulcerations, present throughout all the bone. Bone inflammation was either caused by the referred parasite or facilitated its infestation. The histological development of an aggressive case of osteomyelitis was described in detail for the first time.

This investigation contributes substantially to understanding the histology of pathological bone disease, macroevolution and ecology of blood parasites, and the early history of tropical diseases.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Paulo Saldiva, Milena Picka Santos, Ellison Cardoso, and the rest of the FM-USP team for conducting fossil tomography and providing nice comments on the material. To Renata Monteiro, for providing insights into osteomyelitis. To Fernanda Aníbal, for her observations regarding parasites. To Erica Tonetto, for conducting electron microscopy analyses. To David Soeiro and Dawid Surmik for kindly accepting to read and comment on a prior version of this manuscript. To Kai Casper, for clarifying the methodology of measuring vascular canal calibers. The authors would like to acknowledge the anonymous reviewers for their comments. To Luciana B. Fernandes, for the software license. To Paulo, for preparing the thin sections. To *Colecionadores de Ossos*TM and their crowdfunders, for financing thin sections. Author's scholarships and financial aid were provided by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq 131777/2018-1) (T.A.), the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (A.M.G. and C.S.I.N.) - Finance Code 001, and FAPESP 2016/20927-0 'Modern accumulation studies and fossil bioclast studies in continental and coastal environments' (F.R.B.).

References

- Aureliano, T., Chilardi, A.M., Buck, P.V., Fabbri, M., Samathi, A., Delcourt, R., Fernandes, M.A., Sander, M., 2018. Semi-aquatic adaptations in a spinosaur from the Lower Cretaceous of Brazil. *Cretaceous Research* 90, 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.04.024>.
- Barbosa, F.H. de S., Marinho, T. da S., Iori, F.V., Paschoa, L. da S., 2018. A case of infection in an Aeolosaurini (Sauropoda) dinosaur from the Upper Cretaceous of São Paulo, Southeastern Brazil, and the impact on its life. *Cretaceous Research*. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.12.004>.
- Barbosa, F.H. de S., Pereira, P.V.L.G. da C., Bergqvist, L.P., Rothschild, B.M., 2016. Multiple neoplasms in a single sauropod dinosaur from the Upper Cretaceous of Brazil. *Cretaceous Research* 62, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2016.01.010>.
- Briggs, D.E.G., 2003. The role of decay and mineralization in the preservation of soft-bodied fossils. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 31, 275–301. <https://doi.org/10.1146/annurev.earth.31.100901.144746>.
- Carek, P.J., Dickerson, L.M., Sackier, J.M., 2001. Diagnosis and Management of Osteomyelitis [WWW Document]. URL: https://www.aafp.org/afp/2001/0615/p2413.html?fbclid=IwAR2UazJbsGFZAnN19gmkco34EIAN59j3PhEm9q1vLmij29UwV_1stQr1 (accessed 9.25.20).
- Castro, M.C., Goin, F.J., Ortiz-Jaureguizar, E., Vieytes, E.C., Tsukui, K., Ramezani, J., Batezelli, A., Marsola, J.C.A., Langer, M.C., 2018. A Late Cretaceous mammal from Brazil and the first radioisotopic age for the Bauru Group. *R Soc Open Sci* 5, 180482. <https://doi.org/10.1098/rsos.180482>.
- Costa, A.A.U.M.L. da, Saldanha, A.C.R., Corbett, C.E.P., Barral, A.M.P., Bezerril, A.C.R., Others, 2009. Alterações ósseas causadas por *Leishmania amazonensis* na leishmaniose cutânea difusa (LCD).
- Curry Rogers, K., Kulik, Z., 2018. Osteohistology of Rapetosaurus krausei (Sauropoda: Titanosauria) from the Upper Cretaceous of Madagascar. *Journal of Vertebrate Paleontology* 1–24. <https://doi.org/10.1080/02724634.2018.1493689>.
- Dentzien-Dias, P.C., Poinar Jr., G., de Figueiredo, A.E.Q., 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, e55007. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055007>.
- Ebert, D., Herre, E.A., 1996. The evolution of parasitic diseases. *Parasitology Today* 12, 96–101. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(96\)80668-5](https://doi.org/10.1016/0169-4758(96)80668-5).
- Fedorov, A., Beichel, R., Kalpathy-Cramer, J., Finet, J., Fillion-Robin, J.-C., Pujol, S., Bauer, C., Jennings, D., Fennessy, F., Sonka, M., Buatti, J., Aylward, S., Miller, J.V., Pieper, S., Kikinis, R., 2012. 3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network. *Magnetic Resonance in Imaging* 30, 1323–1341. <https://doi.org/10.1016/j.mri.2012.05.001>.
- Fleischle, C.V., Sander, P.M., Wintrich, T., Caspar, K.R., 2019. Hematological convergence between Mesozoic marine reptiles (Sauropterygia) and extant aquatic amniotes elucidates diving adaptations in plesiosaurs. *PeerJ* 7, e8022. <https://doi.org/10.7717/peerj.8022>.
- Fondi, C., Franchi, A., 2007. Definition of bone necrosis by the pathologist. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* 4, 21–26.
- Franchillon-Viollet, H., Buffrénil, V. de, Castanet, J., Géraudie, J., Meunier, F.J., Sire, J.Y., Zylberberg, L., Ricqlès, A. de, 1990. Microstructure and mineralization of vertebrate skeletal tissues. In: Carter, J. (Ed.), *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends*, vol. 1.

- García, R.A., Cerda, I.A., Heller, M., Rothschild, B.M., Zurriaguz, V., 2017. The first evidence of osteomyelitis in a sauropod dinosaur. *Lethaia* 50, 227–236. <https://doi.org/10.1111/let.12189>.
- García, R.A., Salgado, L., Fernández, M.S., Cerda, I.A., Carabajal, A.P., Otero, A., Coria, R.A., Fiorelli, L.E., 2015. Paleobiology of Titanosaurs: Reproduction, Development, Histology, Pneumaticity, Locomotion and Neuroanatomy from the South American Fossil Record. *Ameghiniana* 52, 29–68. <https://doi.org/10.5710/AMGH.16.07.2014.829>.
- Ghilardi, A.M., Aureliano, T., Duque, R.R.C., Fernandes, M.A., Barreto, A.M.F., Chinsamy, A., 2016. A new titanosaur from the Lower Cretaceous of Brazil. *Cretaceous Research* 67, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2016.07.001>.
- Hanna, R.R., 2002. Multiple injury and infection in a sub-adult theropod dinosaur *Allosaurus fragilis* with comparisons to allosaur pathology in the Cleveland-Lloyd Dinosaur Quarry Collection. *Null* 22, 76–90. [https://doi.org/10.1671/0272-4634\(2002\)022\(0076:MIAlIA\)2.0.CO;2](https://doi.org/10.1671/0272-4634(2002)022(0076:MIAlIA)2.0.CO;2).
- Hatzenbuehler, J., Pulling, T.J., 2011. Diagnosis and Management of Osteomyelitis [WWW Document]. URL: <https://www.aafp.org/afp/2011/1101/p1027.html> (accessed 9.25.20).
- Hunt, T.C., Peterson, J.E., Frederickson, J.A., Cohen, J.E., Berry, J.L., 2019. First documented pathologies in tenontosaurus tiletiti with comments on infection in non-avian dinosaurs. *Scientific Reports* 9, 8705. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45101-6>.
- Huttenlocker, A.K., Farmer, C.G., 2017. Bone microvasculature tracks red blood cell size diminution in triassic mammal and dinosaur forelimbs. *Current Biology* 27, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.012>.
- Huttenlocker, A.K., Woodward, H.N., Hall, B.K., 2013. The biology of bone. In: *Bone Histology of Fossil Tetrapods*, University of California Press. <https://doi.org/10.1525/california/9780520273528.003.0002>.
- Ibrahim, N., Maganuco, S., Dal Sasso, C., Fabbri, M., Auditore, M., Bindellini, G., Martill, D.M., Zouhri, S., Mattarelli, D.A., Unwin, D.M., Wiemann, J., Bonadonna, D., Amare, A., Jakubczak, J., Joger, U., Lauder, G.V., Pierce, S.E., 2020. Tail-propelled aquatic locomotion in a theropod dinosaur. *Nature* 581, 67–70. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2190-3>.
- Ibrahim, N., Sereno, P.C., Dal Sasso, C., Maganuco, S., Fabbri, M., Martill, D.M., Zouhri, S., Myhrvold, N., Iurino, D.A., 2014. Semiaquatic adaptations in a giant predatory dinosaur. *Science* 345, 1613–1616. <https://doi.org/10.1126/science.1258750>.
- Keenan, S.W., 2016. From bone to fossil: A review of the diagenesis of bioapatite. *American Mineralogist* 101, 1943–1951. <https://doi.org/10.2138/am-2016-5737>.
- Klein, N., Sander, M., 2008. Ontogenetic stages in the long bone histology of sauropod dinosaurs. *Paleobiology* 34, 247–263. [https://doi.org/10.1666/0094-8373\(2008\)034\[0247:OSTILB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1666/0094-8373(2008)034[0247:OSTILB]2.0.CO;2).
- Klein, N., Sander, P.M., Stein, K., Le Loeuff, J., Carballido, J.L., Buffetaut, E., 2012. Modified laminar bone in *Ampelosaurus ataris* and other Titanosaurs (Sauropoda): implications for life history and physiology. *PLoS One* 7, e36907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036907>.
- Lamm, E.-T., 2013. Preparation and Sectioning of Specimens. In: *Bone Histology of Fossil Tetrapods*, University of California Press. <https://doi.org/10.1525/california/9780520273528.003.0004>.
- Leung, T.L.F., 2015. Fossils of parasites: what can the fossil record tell us about the evolution of parasitism? *Biological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/brv.12238>.
- Lew, D.P., Waldvogel, F.A., 2004. Osteomyelitis. *Lancet*.
- McWhinney, L.A., Rothschild, B.M., Carpenter, K., 2001. Posttraumatic chronic osteomyelitis in *Stegosaurus* dermal spikes. *The armored dinosaurs* 141–156.
- Mitchell, J., Sander, P.M., 2014. The three-front model: a developmental explanation of long bone diaphyseal histology of Sauropoda. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 112, 765–781. <https://doi.org/10.1111/bj.12324>.
- Padian, K., Lamm, E.-T., 2013. *Bone Histology of Fossil Tetrapods: Advancing Methods, Analysis, and Interpretation*, University of California Press.
- Pesquero, M.D., Ascaso, C., Alcalá, L., Fernández-Jalvo, Y., 2010. A new taphonomic bioerosion in a Miocene lakeshore environment. *Palaogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 295, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.05.037>.
- Pfretschner, H.-U., 2001. Pyrite in fossil bone. *Njgpa* 220, 1–23. <https://doi.org/10.1127/njgpa/220/2001/1>.
- Pineda, C., Espinosa, R., Pena, A., 2009. Radiographic imaging in osteomyelitis: the role of plain radiography, computed tomography, ultrasonography, magnetic resonance imaging, and scintigraphy. *Seminars in Plastic Surgery* 23, 80–89. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1214160>.
- Poinar, G., 2019. A primitive triatomine bug, *Paleotriatoma metaxyta* gen. et sp. nov. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), in mid-Cretaceous amber from northern Myanmar. *Cretaceous Research* 93, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2018.09.004>.
- Poinar Jr., G., 2008a. *Leptoconops nosopheris* sp. n. (Diptera: Ceratopogonidae) and *Paleotrypanosoma burmanicus* gen. n., sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a biting midge-trypanosome vector association from the Early Cretaceous. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 468–471.
- Poinar Jr., G., 2008b. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican amber. *Parasites & Vectors* 1, 22. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-22>.
- Poinar Jr., G., Boucot, A.J., 2006. Evidence of intestinal parasites of dinosaurs. *Parasitology* 133, 245–249. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000138>.
- Poinar Jr., G., Poinar, R., 2004. *Paleoleishmania proteus* n. gen., n. sp. (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. *Protist* 155, 305–310. <https://doi.org/10.1078/1434461041844259>.
- Poinar, G., Poinar, R., 2004. Evidence of Vector-Borne Disease of Early Cretaceous Reptiles. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 4, 281–284. <https://doi.org/10.1089/vbz.2004.4.281>.
- Ramírez-Velasco, A.A., Morales-Salinas, E., Hernández-Rivera, R., Tanke, D.H., 2017. Spinal and rib osteopathy in *Huehucanauhtlus tiquichensis* (Ornithomimidae: Hadrosauridae) from the Late Cretaceous in Mexico. *Null* 29, 208–222. <https://doi.org/10.1080/08912963.2016.1147033>.
- Rana, R.S., Wu, J.S., Eisenberg, R.L., 2009. Periosteal reaction. *American Journal of Roentgenology* 193, W259–W272. <https://doi.org/10.2214/AJR.09.3300>.
- Rothschild, B.M., Martin, L.D., 2006. *Skeletal Impact of Disease*. New Mexico Museum of Natural History and Science.
- Rothschild, B.M., Schultz, H.-P., Pellegrini, R., 2012. *Herpetological Osteopathology: Annotated Bibliography of Amphibians and Reptiles*. Springer Science & Business Media.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675.
- Senter, P., Juengst, S.L., 2016. Record-Breaking Pain: The Largest Number and Variety of Forelimb Bone Maladies in a Theropod Dinosaur. *PLoS One* 11, e0149140. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149140>.
- Shapiro, R.S., Spangler, E., 2009. Bacterial fossil record in whale-falls: Petrographic evidence of microbial sulfate reduction. *Palaogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 274, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2009.02.006>.
- Stein, K., Csiki, Z., Rogers, K.C., Weishampel, D.B., Redelstorff, R., Carballido, J.L., Sander, P.M., 2010. Small body size and extreme cortical bone remodeling indicate phyletic dwarfism in *Magyarosaurus* ducali (Sauropoda: Titanosauria). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 9258–9263. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000781107>.
- Surmik, D., Szczygielski, T., Janiszewska, K., Rothschild, B.M., 2018. Tuberculosis-like respiratory infection in 245-million-year-old marine reptile suggested by bone pathologies. *R Soc Open Sci* 5, 180225. <https://doi.org/10.1098/rsos.180225>.
- Tanke, D.H., Rothschild, B.M., 2014. In: Eberth, D., Evans, D. (Eds.), *Paleopathology in Late Cretaceous Hadrosauridae from Alberta, Canada*, with comments on a putative *Tyrannosaurus* bite injury on an *Edmontosaurus* tail. *Hadrosaurus*, pp. 540–571.
- Leishmaniasis (cutaneous and visceral). The Institute for International Cooperation in Animal Biologics and the Center for Food Security and Public Health, 2017. College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa.
- Trueman, C.N., Martill, D.M., 2002. The long-term survival of bone: the role of bioerosion. *Archaeometry* 44, 371–382. <https://doi.org/10.1111/1475-4754.t01-1-00070>.
- Woodward, H., Padian, K., Lee, A.H., 2013. *Skeletochronology*. In: *Bone Histology of Fossil Tetrapods: Advancing Methods, Analysis, and Interpretation*. University of California Press, pp. 195–215.
- Xing, L., Rothschild, B.M., Randolph-Quinney, P.S., Wang, Y., Parkinson, A.H., Ran, H., 2018. Possible bite-induced abscess and osteomyelitis in *Lufengosaurus* (Dinosauria: sauropodomorph) from the Lower Jurassic of the Yimen Basin, China. *Scientific Reports* 8, 5045. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23451-x>.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2020.104672>.

APÊNDICE D

Artigo “Marrocos e suas relíquias: novos fósseis no Marrocos apontam que a espécie humana é mais antiga do que se pensava”, publicado em 2017, na revista Temas Atuais em Biologia.

Temas Atuais em Biologia

Marrocos e suas relíquias

Novos fósseis no Marrocos apontam que a espécie humana é mais antiga do que se pensava

Mariana de Cássia Bisio
Camila Fernanda Panzeri
Carolina Santa Isabel Nascimento
Bernardo de C. P. e M. Peixoto
 decassiabisio@gmail.com

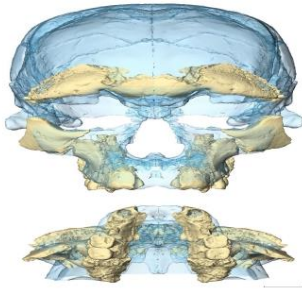


Sítio arqueológico e zoom da mandíbula encontrada. **Fonte:** Comunicado para imprensa do Instituto Max Planck (EVA). Autores: Shannon McPherron e Jean-Jacques Hublin.

A palavra relíquia, nome dado ao que resta dos santos ou aos objetos que pertenceram a um santo ou tiveram contato com seu corpo, tem sido informalmente estendida para definir algo precioso e antigo. Nesse sentido mais amplo, uma nova relíquia foi descoberta recentemente no Marrocos: um tesouro científico. São os fósseis humanos mais antigos já encontrados até então, indicando que o surgimento da nossa espécie ocorreu pelo menos 100.000 anos antes do que se pensava. O conjunto de fósseis foi encontrado no sítio arqueológico de Jebel Irhoud e ajudam a entender quando o *Homo sapiens* divergiu do grupo dos *Homo heidelbergensis*, contribuindo para a nossa compreensão da história evolutiva da espécie humana e sua dispersão pelo planeta Terra. Alguns fragmentos de crânio já haviam sido encontrados neste mesmo sítio em escavações da década de 1960, e naquela ocasião foram atribuídos à espécie neandertal. Entretanto, novos fragmentos, associados à novas tecnologias de datação e de reconstrução digital, levaram a uma nova classificação desse material, apontando maior afinidade com a nossa espécie (*Homo sapiens*).

Localizado no norte da África, o Marrocos é conhecido não só pelas lindas paisagens desérticas, mas também pela grande quantidade de tesouros arqueológicos e paleontológicos. Isso tem uma explicação: no passado, a região do Magrebe (que inclui o Marrocos) era muito diferente da paisagem desértica atual. O ambiente era mais úmido, permitindo a existência de uma savana com ampla diversidade de vida. Tais condições favoreceram a preservação de fósseis, tornando possível conhecer a vida nesse ambiente antigo, incluindo formas humanas antigas (chamadas pelos cientistas de homínios), que trazem informações importantes sobre a história evolutiva da nossa espécie.

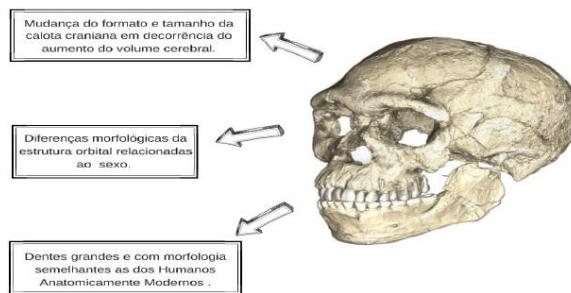
Fragments do primeiro crânio adulto foram acidentalmente encontrados na região em 1961, durante atividades de mineração, dando início a escavações arqueológicas nesta área e a descoberta de um rico sítio paleontológico que incluía também um extenso conteúdo faunístico do Pleistoceno. Os fragmentos do crânio tiveram, na época, sua antiguidade estimada em cerca de 40 mil anos. Porém, para esta datação, os cientistas não consideraram alguns fósseis da fauna que os acompanhavam. Foi apenas em escavações mais recentes que os pesquisadores puderam realizar a montagem de uma linha cronológica dos depósitos fósseis, além de encontrar novos fragmentos que foram utilizados no estudo. O novo material encontrado apresentava uma grande semelhança com o material das primeiras escavações, demonstrando que pertencia a uma mesma camada de sedimento e a uma faixa de tempo bem delimitada. Entre os novos materiais, foram encontrados um



Reconstrução do crânio e fragmentos utilizados. Fonte: Comunicado para imprensa do Instituto Max Planck (EVA). Autor: Sarah Freidline.

a hipótese de uma mudança anatômica rápida ou de uma mudança anatômica fruto de cruzamento entre diferentes espécies que habitavam o mesmo ambiente.

Além dos incríveis avanços na compreensão do aparecimento e história evolutiva da espécie humana, o estudo demonstrou como a aplicação de análises com tecnologias de ponta permite a obtenção de informações inéditas, tanto em novas descobertas como em fósseis já coletados no passado. Também demonstrou que sítios paleontológicos já conhecidos há muito tempo provavelmente ainda guardam importantes tesouros a serem descobertos. Resta aos cientistas continuar procurando, seja onde fósseis já foram encontrados, ou prospectar por novas localidades, e inovar ao explorar as possibilidades de responder perguntas complexas com a aplicação das novas técnicas de análises que surgem a cada dia.



Crânio finalizado e suas principais características. Fonte: Comunicado para imprensa do Instituto Max Planck (EVA). Autor: Philipp Gunz.

crânio adulto, fragmentos de face, elementos pós-cranianos (ossos do esqueleto), dentes e uma maxila quase completa, pertencentes a indivíduos com diferentes idades de desenvolvimento.

Novas análises envolvendo comparação morfológica e métodos mais recentes de datação foram aplicadas aos fragmentos antigos e às novas amostras, possibilitando a reconstrução digital de um crânio completo cujas características proporcionaram novas possibilidades de interpretação. A primeira é que *Homo sapiens* do norte da África teriam hibridizado com Neandertais (*Homo neanderthalensis*). A segunda refere-se a uma forma ancestral de *Homo sapiens*, divergente de *Homo heidelbergensis*, fornecendo evidências de uma fase inicial da evolução daquele hominíneo na África, com data de surgimento há quase 300 mil anos, cerca de cem mil anos mais antiga do que se pensava. Esses hominíneos de Jebel Irhoud seriam representantes norte-africanos mais antigos, confirmando a origem africana da espécie. As análises também sugerem divergência de trajetórias evolutivas entre as formas arcaicas do Pleistoceno Médio Africano e formas mais antigas de *Homo sapiens*, reforçando

A jornada humana

O gênero *Homo* está intimamente associado ao que pesquisadores consideram como sendo humano, por isso há grande curiosidade sobre seu local de origem e época de surgimento, que provavelmente ocorreu entre dois e três milhões de anos, com o aparecimento dos primeiros exemplares do *Homo habilis*. Descobertos pela primeira vez em 1960 na Tanzânia, com cerca de 1,8 milhões de anos, os restos de *Homo habilis* foram um dos grandes marcos para o gênero *Homo*, pois com eles foi encontrada grande quantidade de ferramentas de pedra lascada, sugerindo grande capacidade mental e habilidades manuais, além de contribuir para as ideias que colocam o continente Africano como centro de origem e dispersão do gênero. Evidências mostram que o *Homo habilis* transitava entre o ambiente arbóreo e terrestre, enquanto o *Homo erectus*, que teria surgido pouco mais tarde, era estritamente bípede. *Homo erectus* já apresentava semelhança morfológica com o *Homo sapiens*, sugerindo uma ligação direta entre essas duas linhagens. Seus registros indicam que este já estava presente há 1,8 milhões de anos na região do Quênia, o que sugere a convivência em tempo e espaço com os primeiros hominíneos, incluindo *Homo habilis*. Sua dispersão ocorreu por grande parte da Europa e Ásia, dando origem ao que se consideram variações regionais desta espécie. Existem diversas hipóteses que tentam explicar a dispersão dos hominíneos fora da África e o período em que se deu, acreditando estar relacionada a uma tendência evolutiva de aumento do volume do cérebro. Além dessa característica, podemos relacionar também o aumento da estatura e do tamanho dos membros inferiores, e a diminuição do tamanho dos braços, com essas proporções entre os membros sendo também fatores

vantajosos ao pioneirismo do *Homo erectus* nesta jornada.

O *Homo erectus* que permaneceu na África continuou sofrendo modificações e, há cerca de 600 mil anos, deu origem a novas populações que possuíam um desenvolvimento craniano maior e grande semelhança com nossa espécie. É o chamado *Homo heidelbergensis*, que assim como alguns de seus antepassados, migraram para fora do continente, em direção ao Oriente Médio. Já fora da África, esses indivíduos deram origem a pelo menos duas diferentes espécies, *Homo neanderthalensis* (Neandertais) e denisovanos, enquanto os que permaneceram na África deram origem a uma variante que hoje se conhece como *Homo sapiens* (a nossa espécie), há cerca de 200 mil anos.

A primeira onda de migração do *Homo sapiens* para fora da África provavelmente ocorreu há 120 mil anos, colonizando a região onde hoje é Israel e Palestina. Uma segunda grande migração, há cerca de 50 mil anos, foi responsável pela dispersão e colonização da espécie, dessa vez por todo o planeta, substituindo, talvez por competição, os demais hominíneos - *Homo neanderthalensis* e denisovanos. Acredita-se que neste processo houve hibridação entre espécies, o que explicaria a presença de traços genéticos destas outras espécies no DNA de parte da população atual.

O povoamento da América. Qual a importância do Brasil nessa discussão?

O continente americano foi o último a ser habitado por humanos, sendo que, até então, só há evidências da ocorrência de uma única espécie, o *Homo sapiens*. A chegada dos primeiros grupos humanos na América é justamente um dos principais focos nas pesquisas em Paleoantropologia no Brasil. Até a década de 1970, a teoria vigente era a de chegada desses primeiros grupos entre 11 a 13.000 anos atrás, por meio do Estreito de Bering, uma conexão terrestre entre a Sibéria (Ásia) e o Alasca (América do Norte), que ficou exposta com a diminuição dos níveis dos oceanos no último período glacial. Essa teoria foi reforçada a partir da década de 1930, com o encontro de sítios na região do Novo México, nos Estados Unidos, onde havia, associados a ossos de megafauna, artefatos líticos apresentando uma cultura específica, chamada de Cultura Clóvis (nome da região onde se encontravam os registros). Esses achados originaram a hipótese do “Clovis-First”, que defendia a chegada dos primeiros humanos por essa rota terrestre, seguindo da Ásia para a América do Norte, e posteriormente se dispersando pela América Central e por fim chegando à América do Sul.

O que é Evolução?

Evolução é um processo natural que afeta todos os seres vivos. Para que ela ocorra, necessariamente o organismo em questão tem que se reproduzir, e seus descendentes têm que herdar parte de suas características, tais como aquelas relacionadas à morfologia, fisiologia e comportamento. Portanto, pode ser definida como alterações nos organismos ao longo das gerações, com a seleção daquelas características que melhor respondem ao ambiente, e serão passadas para a prole e firmadas na população. Os fatores ambientais que influenciam a adaptação e o processo reprodutivo estão associados principalmente à alimentação, predação e conquista de hábitat.

Um dos mecanismos que promove a evolução é a seleção natural, quando os indivíduos melhor adaptados a determinados fatores ambientais possuem uma maior probabilidade de sobrevivência, chegando até a maturidade sexual, e deixando maior número de descendentes com chances de alcançarem a fase adulta.

Assim, pode-se comparar a seleção natural com uma peneira, que permite a passagem de certos elementos e retém outros: indivíduos que conseguem passar suas informações genéticas para a prole atravessam a peneira, enquanto os que não obtêm sucesso são retidos. Ao longo do tempo, as informações que foram selecionadas pelo ambiente acabam se fixando na população, e na maioria das vezes são as responsáveis pelo êxito dos indivíduos que foram selecionados. Em suma, uma parcela cada vez maior da população apresenta as características que fizeram com que o antepassado conseguisse passar pela “peneira” da seleção natural. Logo, a seleção natural atua sobre os indivíduos e, devido a ela, a população evolui com base nos caracteres que se modificam ao longo do tempo.

Os cientistas acompanham essas modificações por meio do estudo dos fósseis. Com esses remanescentes é possível acessar a história evolutiva de um grupo ao estudar as variações nas características morfológicas de organismos relacionados, ou seja, de um mesmo grupo, acompanhando seus fósseis ao longo das camadas sucessivas de rocha. As diferentes características morfológicas são fixadas pela seleção natural, de acordo com o ambiente em que cada população viveu.

O surgimento de uma nova espécie ocorre quando uma população deixa de se reproduzir com as outras, formando um grupo onde as características selecionadas ficam restritas a ele. Essa restrição acontece porque há algum tipo de isolamento reprodutivo, onde os membros de um grupo só reproduzem dentro do mesmo. O isolamento reprodutivo pode acontecer por causa de barreiras geográficas, como a separação de continentes e aparecimento de rios, ou por diferenças comportamentais, entre outras. Se um determinado grupo começa a procurar comida apenas durante o dia, enquanto outro grupo só sai à procura de alimento durante a noite, pode ser que os indivíduos destes grupos passem a não se encontrar mais para reprodução; então eles passam a ficar isolados reprodutivamente, e há a possibilidade de que se formem duas espécies distintas, pois estes passam a evoluir independentemente, ou seja, as características que vão aparecendo e se fixando em cada população são diferentes.

Assim, outro conceito importante a ser entendido é o de linhagem, que consiste nos ramos da árvore filogenética, e representam a diferenciação de um grupo em uma nova espécie, ou seja, quando um grupo de indivíduos não se reproduz mais com a população como um todo, mas apenas com indivíduos do próprio grupo gerando uma nova espécie, surge uma nova linhagem. Duas linhagens são ligadas por um descendente comum, daquela população inicial de onde a espécie se diferenciou. Esse mesmo descendente pode ser comum a várias espécies, à medida em que grupos dentro das populações se isolam e divergem em sua jornada evolutiva.

Entretanto, nas últimas décadas, novos sítios tão ou mais antigos do que os de Clóvis têm sido encontrados, especialmente na América do Sul, levando a discussões sobre novas possibilidades de rotas e de antiguidade de chegada dos primeiros humanos. Alguns dos que revolucionaram tais discussões foram os encontrados na região de Monte Verde, no Centro-Sul do Chile, com datações chegando a até 19.000 anos.

O Brasil também tem uma participação bastante importante nessas discussões, já que o território brasileiro abriga alguns dos mais antigos

registros arqueológicos já encontrados em todo o continente. É o caso da região de Lagoa Santa (Minas Gerais), onde foi encontrada a famosa Luzia e outros indivíduos do seu grupo, apresentando características morfológicas que sugerem mais de um pulso de chegada de grupos humanos no continente. No Nordeste do país há os Parques Nacionais Serra da Capivara e Serra das Confusões, ambos no estado do Piauí, com mais de 1.000 sítios, alguns chegando a até 25.000 anos, o que seriam então os vestígios mais antigos de grupos humanos no continente americano. Além de sítios em outras localidades, como Santa Elina e Cidade de Pedra (Mato Grosso), Dourado, São Manuel e Analândia (São Paulo) e tantos outros nas diversas regiões do país, ainda aguardando para serem descritos e estudados.

Leituras sugeridas

- Adovasio, James, M.; Page, Jake. Os primeiros americanos: em busca do maior mistério da arqueologia. Rio de Janeiro: Record, 2011.
- Dillehay, Tom D.; Ocampo, Carlos; Saavedra, José; Sawakuchi, Andre O.; Vega, Rodrigo M.; Pino, Mario; et al. New archaeological evidence for an early human presence at Monte Verde, Chile. PLOS ONE (10) 11: 1-27, 2015.
- Hublin, Jean-Jacques; Ben-Ncer, Abdelouahed; Bailey, Shara E.; Freidline, Sarah E.; Neubauer, Simon; Skinner, Matthew M.; et. al. New fossils from Jebel Irhoud, Morocco and the pan-African origin of Homo sapiens. Nature. 2017; (546):289-305.
- Neves, Walter A.; Rangel Junior, Miguel J; Murrieta, Rui Sergio S. Assim caminhou a humanidade. São Paulo: Palas Athena; 2015.

APÊNDICE E

“Importância dos museus, em conjunto com a educação formal, no ensino de Paleontologia”: resumo apresentado no XI Simpósio Brasileiro de Paleontologia de Vertebrados, no ano de 2017.

IMPORTÂNCIA DOS MUSEUS, EM CONJUNTO COM A EDUCAÇÃO FORMAL, NO ENSINO DE PALEONTOLOGIA

IMPORTANCE OF MUSEUMS, IN CONJUNCTION WITH FORMAL EDUCATION, IN THE TEACHING OF PALEONTOLOGY

THAÍS S. CARVALHO; CAROLINA S. I. NASCIMENTO; PIETRA M. MICHELETTI; JORGE F. M. DE JESUS & MARCELO A. FERNANDES
 Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Laboratório de Paleocologia e Paleocnologia (LPP), São Carlos, SP.
 carvalhosilthais@gmail.com



INTRODUÇÃO

Os museus são espaços de educação não-formal que estimulam a curiosidade do público por meio da realização de palestras e exposições, além de treinamentos na formação de professores (CASSAB, 2004). Muitas vezes apresentando convênio com universidades, eles atuam na difusão entre a população do papel da Ciência e sua importância, incluindo os fundamentos da Paleontologia e a importância da conservação do patrimônio fóssil (CASSAB, 2004).

METODOLOGIA

Foi realizada na cidade de São Carlos-SP (Figura 1) uma coleta de dados no Parque Ecológico de São Carlos (Fig. 2), visando investigar a percepção do público visitante sobre assuntos relacionados à Paleontologia e Evolução. No total, 63 pessoas aceitaram participar do trabalho, dentre público infanto-juvenil e seus pais, assinando um termo de consentimento e anonimato.

A ferramenta escolhida foi um questionário estruturado, com questões objetivas e subjetivas, permitindo uma abordagem quali-quantitativa. Dentre as perguntas elaboradas, havia aquelas relacionadas a termos específicos da Icnologia, já que São Carlos conta com um “museu a céu aberto” com icnofósseis espalhados pelas calçadas de toda a cidade (Fig. 3), e há ainda um Museu de Ciências - Prof. Mário Tolentino - na região central da cidade, com exposição fixa de Paleontologia (Fig. 4), composta, em sua grande maioria, por registros icnológicos de Paleovertebrados e Paleoinvertebrados.

RESULTADOS

Gráfico 1. Porcentagem de entrevistados que definiu de forma parcial ou satisfatória termos específicos de Paleontologia e Evolução.



Gráfico 2. Principais fontes de informação sobre termos paleoicnológicos apontadas pelos entrevistados.





FIGURAS 1, 2, 3 e 4: (1) Mapa do Estado de São Paulo, com a cidade de São Carlos em destaque; (2) Entrada do Parque Ecológico de São Carlos-SP; (3) Pavimentação das ruas de São Carlos-SP, com lajes de arenito apresentando icnofósseis; (4) Fachada do Museu da Ciência Prof. Mário Tolentino.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Foi possível notar entre os entrevistados o conhecimento de termos específicos paleoicnológicos (Gráfico 1), os quais, em geral, são pouco trabalhados nos espaços formais de ensino. De acordo com os entrevistados, tais conceitos foram obtidos por meio não apenas da educação formal (escolas, faculdades e outras instituições formais de ensino), mas também por outros meios, apontados nos questionários (Gráfico 2). Dentre eles, a utilização de veículos midiáticos como principal fonte de informações científicas acompanha uma preocupação, já que nem sempre são fontes confiáveis e com informações adequadas.

Já nas escolas, quando as aulas são desenvolvidas nos espaços não-formais e/ou em conjunto com estes, há a ampliação das possibilidades de aprendizagem, proporcionando um ganho de conhecimento, já que os museus de ciências atuam instigando os visitantes, e permitem que estes atuem como sujeitos ativos, por meio do uso de tecnologias e ferramentas de interação com as exposições, objetivando aumentar a percepção sobre o papel e a importância da ciência na sociedade.

REFERÊNCIAS

CASSAB, R.C.T. Objetivos e Princípios. In: CARVALHO, I.S. Paleontologia. São Paulo: Interciência, 2000. p. 1-12.
 CASSAB, R.C.T. Histórico das Pesquisas Paleontológicas no Brasil. In: CARVALHO, I.S. Paleontologia. São Paulo: Interciência, 2004. p. 13-18.

AGRADECIMENTOS



APÊNDICE F

Resumo “Confecção de materiais para acessibilidade da exposição de Paleontologia do Museu da Ciência ‘Prof. Mário Tolentino’, São Carlos, SP”, apresentado no evento Paleo SP, no ano de 2018.



Laboratório de
Paleoecologia &
Paleoicnologia

CONFECÇÃO DE MATERIAIS PARA ACESSIBILIDADE DA EXPOSIÇÃO DE PALEONTOLOGIA DO MUSEU DA CIÊNCIA “PROF. MÁRIO TOLENTINO”, SÃO CARLOS, SP

THÁIS S. CARVALHO; CAROLINA S. I. NASCIMENTO; THÂNDARA JACOB; JORGE F. M. DE JESUS; MARCELO A. FERNANDES
Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, Laboratório de Paleoecologia e Paleoicnologia (LPP), São Carlos, SP.
carvalhosilthais@gmail.com

INTRODUÇÃO

Os museus de ciências instigam a aprendizagem, por permitirem que os visitantes atuem como sujeitos ativos, tendo o objetivo de aumentar a percepção do papel e da importância da ciência na sociedade. Considerando que quase 24% da população brasileira possui alguma deficiência, o trabalho com outros sentidos, além da visão, pode ser explorado por meio de uma “mediação multisensorial”, tornando o processo de ensino-aprendizagem condizente com a realidade da pessoa com deficiência. Na cidade de São Carlos, São Paulo, foram confeccionados novos recursos didáticos na exposição de Paleontologia do Museu da Ciência “Prof. Mário Tolentino”, com o objetivo de tornar acessível a deficientes visuais (pessoas cegas e com baixa visão) a exposição paleontológica presente no Museu.

METODOLOGIA

No segundo semestre do ano de 2018, foram desenvolvidos novos recursos didáticos de maneira a permitir ao público com deficiência visual, em específico, pessoas cegas e com baixa visão, uma aproximação com a exposição paleontológica do Museu de Ciência Prof. Mário Tolentino (São Carlos/São Paulo). Alguns desses recursos preparados foram placas em Braille, confeccionadas com o auxílio de uma máquina para escrita em Braille, cedida pelo curso de Licenciatura em Educação Especial da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, as quais contêm informações como o nome do material em exposição, seu contexto e sua procedência; réplicas dos materiais da exposição paleontológica, permitindo manuseio do material; lupas manuais para ampliação das informações e dos materiais, como auxílio na leitura e visualização dos fósseis; lanternas de mão, para melhorar a iluminação do material quando necessário. Além de estar em desenvolvimento a implementação áudio descrição de cada peça exposta, de maneira a disponibilizar mais detalhes descritivos dos fósseis.

RESULTADOS



FIGURAS: 1. Localização da cidade de São Carlos, SP; 2. Museu da Ciência “Prof. Mário Tolentino”; 3a, 3b e 3c. Réplicas de parte do acervo paleontológico do referido Museu; 4. Máquina para escrita em Braille; 5. Lupa de mão 80 mm para palavras e objetos em exposição.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Visto que museus são espaços que possuem uma grande importância sociocultural e que são relevantes para a divulgação dos saberes científicos para toda a comunidade, a estruturação de exposições museológicas deve ser planejada como um ambiente democrático, que valorize toda forma de percepção e aquisição de conhecimento. Com a implementação dos novos recursos didáticos no Museu de Ciência Prof. Mário Tolentino, permitiu-se uma maior aproximação e integração de pessoas com deficiência visual no contexto de um museu e da história contada por toda a exposição.

AGRADECIMENTOS



APÊNDICE G

Proposta de pesquisa intitulada “X-ray synchrotron microtomography applied to analyze microinclusions in coprolites”, submetida ao IMX (Linha de Luz de Microtomografia por Raios-X), no CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais), na cidade de Campinas, estado de São Paulo, Brasil.

Description



Research proposal for application for beam time at LNLS

X-ray synchrotron microtomography applied to analyze microinclusions in coprolites

1) Is this a continuation of a previous proposal?

No. It is a new proposal.

2) Scientific background.


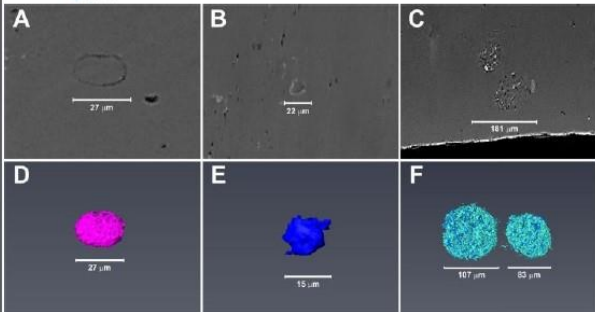
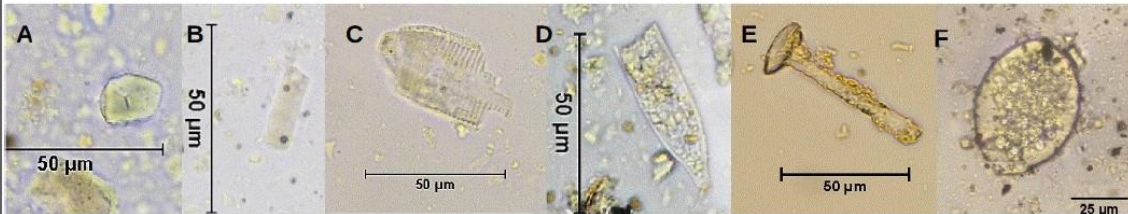
Classical techniques of paleontological investigation are informative and accessible since require equipment available in most laboratories and research institutions. However, there are some significant drawbacks. Fossils are some rare materials, sometimes fragile and even the only specimen known for an extinct organism. Therefore, the use of non-invasive and non-destructive methods is of utmost importance in Paleontology to avoid damaged or even destroyed the fossils (Tafforeau et al., 2006; Qvarnström et al., 2017; Voeten et al., 2018). Some recent examples of X-ray microtomography use in paleontology studies are the fossilized hearts of Cretaceous fish *Rhacolepis buccalis* analyzed by Maldanis et al. (2016); wing bones geometry of the extinct *Archeopteryx* demonstrating some flight characteristics of the taxon (Voeten et al., 2018); and Qvarnström et al. (2017) investigating coprolites and inclusions that revealed new palaeobiological data. Coprolites (fossilized feces) are important means of access information on trophic and ecological ancient interactions, being considered by some authors as a small Lagerstätten reservoirs (sites with exceptional fossils preservation) (Qvarnström et al., 2017). It is possible to find structures difficult to preserve in other environments, such as tissues, blood cells in capillaries (Chin et al., 2003) and eggs of parasites (Dentzien-Dias et al., 2013). However, the classical techniques of analysis (e.g. optical and electronic microscopy) can lead to great loss of information. Their preparation requires acids or other destructive substances as well as involve cutting and macerating part of the samples. In this way, parts very informative but very delicate of the inclusions can be damaged or permanently lost.

3) Expected results.

The samples for analyzes correspond to different geological periods, from the Permian to the Quaternary and various paleontological sites of the Northeast and Southeast of Brazil. They have different animal groups origin, as Mesosaurids, terrestrial and aquatic crocodylians, chelonians, and among the most recent samples (approximately 8.000 years B.P.) there are possibly *Homo sapiens* coprolites from ancient human populations. Analysis of the microinclusions can even help to solve the coprolites producer based in their diets.

The chemical composition of the microinclusions are quite different of the matrix and since it is a non-destructive technique, it is expected that the results obtained by X-ray microtomography provide innovative additional information to those obtained by classical approaches. For instance, because it does not require previous preparation with chemical substances or maceration, fragile microinclusions could be preserved, including those there are not usually recovered because they are destroyed during preparation. Thus, it is possible that greater diversity could be observed, and even additional information on morphology of the inclusions, including details that are important to taxonomic identification. Whereas 3D images represent accurate information, it also allows the possibility of quantitative analysis (Tafforeau et al., 2006), especially in cases that are several samples from the same locality (Qvarnström et al., 2017), which is the case of this proposal in question. This set of data allows us to draw possible paleoenvironmental scenarios, information about evolution of the organisms and palaeoecological interactions as trophic relations, food web and circulation of parasites in the past.

Previous analysis of part of our team at IMX beamline with rocks containing fossil pollens, acritarches and cyanobacteria showed that the absorption contrast and resolution obtained in this beamline can allow the identification of different types of cells (figure 1).

Description	
<p>Research proposal for application for beam time at LNLS</p> 	
	<p>Figure 1. Pollen (A), possibly cyanobacteria (B) and spore (C) identified by μ-CT at IMX beamline with a 5x objective. The 3D morphology and the relative density of the structures (compared to the silica matrix) can allow us to identify the different specimens present in the rock in a non-destructive way.</p>
<p>4) Previous characterization.</p> <p>Some of the samples from the present proposal were previously analyzed by part of our team using light microscopy. For such approaches, the samples needed to be prepared. It was removed 5g of each one and rehydrated using aqueous solution of trisodium phosphate (Na_3PO_4) 0.5% and hydrochloric acid (HCl) 10%. Slides were prepared with these rehydrated samples and observed by light microscopy. Some inclusions (Figures 2A-2F) were found by these method, as diatoms, starch grains, phytoliths, fungi and possible parasite eggs, some of them fragmented or with modifications (e.g. corrosion) that may have occurred during the material preparation steps. The inclusions have several sizes, from 20 to 100 μm or larger.</p>	
	
<p>Figure 2. Biological structures found in preliminary analyze by optical microscopy in some coprolites samples. Unidentified starch (A); fragmented phytolith (B), diatoms (C-D) and sponge spicules (E); probable helminth egg (F).</p>	
<p>5) Experimental method.</p> <p>Fragments of at least 30 different coprolites will be analyzed. Fragments with a maximum size of 1.5mm of each coprolite will be analyzed using lenses with a magnification of 10x, providing a resolution of approximately $0.82\mu\text{m}$ and field of 1.7mm. This resolution is appropriated to allow visualization of details of the microinclusions, including the important ones for taxonomic identification. No prior preparation of the samples is required. We plan to work with a pink beam to get the higher number of photons since our samples are relatively dense.</p>	
<p>6) Beam time requested justification.</p> <p>According to the number of samples, it will be requested approximately four (4) days to perform the analysis.</p>	
<p>7) References.</p> <p>CHIN K. et al., 2003. Remarkable Preservation of Undigested Muscle Tissue Within a Late Cretaceous Tyrannosaurid Coprolite from Alberta, Canada. <i>PALAIOS</i>, V. 18, p. 286–294.</p> <p>DENTZIEN-DIAS, P.C. et al. 2013. Tapeworm Eggs in a 270 Million-Year-Old Shark Coprolite. <i>PLoS ONE</i>, v. 8, n. 1, p. e55007.</p> <p>MALDANIS, L. et al. 2016. Heart fossilization is possible and informs the evolution of cardiac outflow tract in vertebrates. <i>eLife</i> 5: e14698. doi: 10.7554/eLife.14698</p> <p>QVARNSTRÖM, M. et al. 2017. Synchrotron phase-contrast microtomography of coprolites generates novel palaeobiological data. <i>Scientific Reports</i>, 7, Article ID 2723.</p> <p>TAFFOREAU, P. et al. 2006. Applications of X-ray synchrotron microtomography for non-destructive 3D studies of paleontological specimens. <i>Appl. Phys. A</i> 83, 195–202.</p> <p>VOETEN, D.F.A.E. et al. 2018. Wing bone geometry reveals active flight in <i>Archaeopteryx</i>. <i>Nature Communications</i> 9:923. doi: 10.1038/s41467-018-03296-8</p> <p>O LNLS integra o CNPEM, Organização Social qualificada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTIC) Campus: Rua Giuseppe Máximo Solfaro, 10.000 - Polo II de Alta Tecnologia - Caixa Postal 6192 - 13083-970 - Campinas/SP Fone: +55 19 3512 1010 Fax: +55 19 3512 1004 www.lnls.br</p>	

ANEXO A

Revista Por Dentro do CNPEM e entrevista concedida para o anuário de 2019, relatando os trabalhos desenvolvidos no Doutorado.



Implantação do sistema de vácuo do acelerador de elétrons principal do Sirius. O nível de vácuo nesse sistema é comparável ao da superfície da lua, e garante que os elétrons cumpram a trajetória planejada ao longo dos aceleradores sem colidir com outras partículas. Na imagem, Beatriz Ramos e Matheus William Feitosa vestem roupas especiais para evitar a contaminação dos componentes em vácuo por poeira e outros particulados.

Implementation of Sirius main electron accelerator vacuum system. The vacuum level in this system is comparable to that of the moon's surface, and ensures that the electrons meet the planned trajectory along the accelerators without colliding with other particles. In the image, Beatriz Ramos and Matheus William Feitosa wear special clothing to avoid contamination of vacuum components by dust and other particles.

02 2019
distribuição gratuita
17 de dezembro

POR DENTRO DO
INSIDE

CNPEM

SIRIUS
SIRIUS
Últimos avanços e próximos passos
Latest advances and next steps

DESTAQUES CIENTÍFICOS
SCIENTIFIC HIGHLIGHTS
Soluções para desafios estratégicos
Solving strategic challenges

CONHECIMENTO HUMANO
HUMAN KNOWLEDGE
Um dos principais ativos da ciência
One of the main assets of science

 **CNPEM**
Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

ARQUEOLOGIA | ARCHAEOLOGY



Carolina utilizou a linha de luz IMX para realizar microtomografias de raios X de amostras de fezes fósseis.
Carolina used the IMX beamline to perform X-ray microtomographies of fossil stool samples.

Técnicas permitem ampliar conhecimento sobre megafauna brasileira Techniques to expand knowledge on Brazilian megafauna

Carolina Santa Isabel Nascimento é estudante de doutorado do Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Um dos objetivos da pesquisa de Carolina é descobrir hábitos e comportamentos alimentares de animais da megafauna brasileira, através da identificação direta ou indireta de restos de vegetais, ossos, pelos ou parasitas. Para isso, ela estuda micro-inclusões em fezes fossilizadas de animais (coprólitos), utilizando amostras de diferentes sítios arqueológicos e paleontológicos brasileiros. Segundo a pesquisadora, as técnicas clássicas de análise desse tipo de material são destrutivas e contraindicadas para trabalhos com amostras tão raras quanto fósseis. O uso da microtomografia de raios X permite recuperar informações detalhadas sem danificar as amostras.

Ao longo de seus estudos, Carolina descobriu o potencial do uso de técnicas de luz síncrotron em sua área de pesquisa, e durante uma visita da Universidade ao Centro pôde conhecer melhor as instalações laboratoriais do CNPEM e suas potencialidades.

Carolina Santa Isabel Nascimento is a doctoral student of the Postgraduate Program in Ecology and Natural Resources (PPGERN) of the Federal University of São Carlos (UFSCar)

One of the objectives of Carolina's research is to discover the eating habits and behaviors of Brazilian megafauna animals through direct or indirect identification of plant remains, bones, hairs or parasites. For this, she studies micro-inclusions in fossilized feces of animals (coprolites), using samples from different Brazilian archaeological and paleontological sites. According to the researcher, the classical techniques of analysis of this type of material are destructive and contraindicated for works with samples as rare as fossils. The use of X-ray microtomography allows detailed information recovery without damaging the samples.

During her studies, Carolina discovered the potential of using synchrotron light techniques in her area of research. After a University's visit to the Center she could better understand the facilities at CNPEM and its potentialities.

“Muitas vezes, em um sítio paleontológico, não encontramos o esqueleto do animal, mas temos evidências de sua passagem por aquele território. O coprólito é uma dessas evidências.”

“Often in a paleontological site we do not find the skeleton of the animal, but we have evidence of its passage through that territory. Coprolites are one of such pieces of evidence”

CAROLINA SANTA ISABEL NASCIMENTO

Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)
Federal University of São Carlos (UFSCar)

Orientador | Supervisor:
Marcelo Adorna Fernandes

Título do projeto | Project title: Microtomografia por raios-X aplicada à análise de microinclusões em coprólitos/X-ray synchrotron microtomography applied to analyze microinclusions in coprolites.

Instalação utilizada | Facility used: LNLS/microtomografia por raios X (IMX)/LNLS/X-ray Microtomography (IMX)

Financiamento | Funding: CAPES

