Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

"Parasitos econtrados em hospedeiros extintos"

por

Victor Hugo Borba Nunes

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de Epidemiologia em Saúde Pública.

Orientador principal: Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo
Segunda orientadora: Prof.ª Dr.ª Juliana da Matta Furniel Dutra Santiago

Rio de Janeiro, março de 2015.

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta dissertação, intitulada

"Parasitos econtrados em hospedeiros extintos"

apresentada por

Victor Hugo Borba Nunes

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. José Roberto Machado e Silva

Prof. Dr. Sergio Augusto de Miranda Chaves

Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo – Orientador principal

Dissertação defendida e aprovada em 26 de março de 2015.

Catalogação na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

N972p Nunes, Victor Hugo Borba
Parasitos encontrados em hospedeiros extintos. / Victor Hugo Borba Nunes. -- 2015.
98 f. : il. color. ; tab. ; mapas

Orientador: Adauto José Gonçalves de Araújo
Juliana da Matta Furniel Dutra Santiago
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2015.

1. Parasitologia. 2. Paleopatologia. 3. Helmintos. 4. Oxyurida. 5. Fezes - parasitologia. 6. Ascaris. I. Título.

CDD – 22.ed. – 616.9

Aos meus pais, Eliane e Marco, por me acompanharem nessa jornada.

Viva! Viva a vida maravilhosa que está em você! Que nada se perca em você! Esteja sempre à procura de novas sensações! Não tenha medo de nada.

- Oscar Wild, ‘O Retrato de Dorian Gray’

AGRADECIMENTOS

De todas as páginas dessa dissertação, essa sem duvida é a parte mais difícil de escrever. Muitos participaram de alguma forma para completar mais essa etapa, uns mais do que outros, porém não menos importante. Como não sou bom com as palavras posso não passar o quanto o foram.

Primeiramente aos meus pais por estarem sempre ao meu lado e nunca desistirem de mim. Pela paciência, carinho e dedicação que tiveram, o que me ajudou a seguir adiante e finalizar mais uma etapa da minha vida. Obrigado pelo amor incondicional que tem por mim. Amo vocês!

Ao meu orientador, Dr. Adauto Araujo, que me mostrou a paleoparasitogia e me guiou nesse caminho. Por ter tido muita paciência mesmo com todas as complicações dessa jornada. Por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferreira, por ser uma pessoa magnífica e ter iniciado essa linha de pesquisa fascinante, e estar sempre me incentivando a crescer. É uma honra poder ter o conhecido.

Ao Dr. Sérgio Chaves, por me ensinar sempre algo mais sobre grãos de pólen e paleoecologia, e estar sempre disposto a ajudar no que fosse preciso.

A todo mundo do laboratório da paleoparasitologia, Andressa Freire, Bruna Montenegro, Isabel Teixeira, Luciana Sianto, Mônica Vieira, Morgana Camacho, Priscilla Araújo, Shênia Novo, Ricardo França e Thaila Pessanha, tanta gente que viveu bons e maus momentos comigo, tornando o trabalho muito mais divertido. Queria poder agradecer a todos em particular, mas palavras me faltariam.

Aos pesquisadores que forneceram o material para análise, Dr. Fábio Parenti, Dr. Átila Da-Rosa e Dr. Paulo Souto, sem eles esse trabalho não existiria.

A todos os funcionários da SECA e ENSP que foram muito prestativos e pacientes.

Ao CNPq e a FAPERJ, que foram os órgãos de apoio a essa pesquisa.

Aos membros da banca por aceitarem essa difícil tarefa que é avaliar.

Aos professores do curso de Epidemiologia em Saúde Pública da ENSP, por terem sido ótimos professores e terem tido a perseverança pra explicar as mais complicadas matérias.

Aos amigos da vida acadêmica, pelas incontáveis horas de estudos juntos, desespero pré e pós avaliações e também pelas horas de descontração.

A todos os meus amigos, pela paciência que tiveram comigo e pela força que me deram pra nunca desistir.

Ao Vitor Bandeira, por tudo. Por ter chegado de repente e ficado ao meu lado por toda essa etapa. Por ter mudado a minha vida.

RESUMO

Os estudos paleoparasitológicos se caracterizam pela busca de parasitos em material arqueológico e paleontológico. Em geral, a maioria das pesquisas gira em torno de material de épocas mais recentes, principalmente relacionados a grupos humanos, que não chegam a datações de um milhão de anos. A busca por explicações mais antigas em relação ao surgimento das parasitoses nos leva aos animais extintos, que revelam nos vestígios deixados por eles, os parasitos que circulavam antes do surgimento dos seres humanos. Esse trabalho objetivou identificar parasitos que por ventura fossem encontrados em vestígios de animais extintos de diferentes idades geológicas. Então, 32 coprólitos de 6 hospedeiros diferentes (caprino, hiena, duas espécies de peixes, cinodonte e dicinodonte), foram analisados nessa pesquisa, com datações que compreendem do Quaternário ao Triássico (10 mil a 240 milhões de anos antes do presente). Várias técnicas de recuperação de material mineralizado e dessecado foram utilizadas, de acordo com que cada coprólito foi preservado. Se mineralizado, técnicas com ácido e aparelho de ultrassom possibilitaram a análise, já para os coprólitos dessecados, foi feita apenas a reidratação com fosfato trissódico. Amostras de 4 hospedeiros foram positivas para parasitos. Cisto de protozoário em caprino, dois ovos de helmintos em coprólitos de hiena, um nematoda em dicinodonte, foram encontrados. Além de um ascarídeo e um oxyurídeo em coprólito de cinodonte, um réptil mamaliforme pertencente a um clado que originou os mamíferos, que apresentaram dois parasitos comumente achados em mamíferos modernos. Portanto, esses achados permitem que respostas sejam respondidas para compreender melhor a relação parasito-hospedeiro-ambiente em diferentes épocas da história da vida.

Palavras chave: paleoparasitologia, helmintos, oxiurídeo, ascarídeo, coprólito.

ABSTRACT

Paleoparasitological studies are characterized by the search for parasites in archaeological and paleontological material. In general, most research centers around more recent material, mainly related to human groups, which doesn't reach the dating of a million years. The search for older explanations in relation to the emergence of parasites leads us to extinct animals, which reveal on the traces left by them, the parasites that circulates before the appearance of humans. This study aimed to identify parasites that were found in traces of extinct animals of different geological ages. Thereby, 32 coprolites 6 different hosts (goat, hyena, two species of fish, cynodont and dicynodonte) were analyzed in this study, with dating comprising from Quaternary to Triassic (10 thousands to 240 million years before present). Several techniques for recovery of mineralized and dried material were used in accordance with the way each coprolite was preserved. If mineralized, techniques with acid and ultrasound device enabled the analysis, and for the disiccated coprolites, it was only made rehydration with trisodium phosphate. Samples of 4 hosts were positive for parasites. Protozoan cyst in goats, two eggs of helminths in coprolites of hyena and nematode in dicynodonte, were found. In addition, an ascarid and an oxyurid egg in a coprolites of cynodont, a mamaliforme reptile that belongs to a monophiletic clade that originated mammals, which showed two parasites commonly found in modern mammals. Therefore, these findings allow to fill gaps to understand the host-parasite-environment relationship better at different times in the history of life.

Key words: Paleoparasitology, helminths, oxiurid, ascarid, coprolite.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS ix
LISTA DE TABELAS xi

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 4
2.1. Objetivo geral 4
2.2. Objetivo específico 4

3. JUSTIFICATIVA 5

4. REVISÃO DA LITERATURA 6
4.1. Paleoparasitologia 6
4.2. Animais Extintos 11
4.3. Âmbar 17

5. METODOLOGIA 22
5.1. Descrições dos Sítios Paleontológicos e dos animais estudados 26
5.1.1. Caverna Estreta 26
5.1.1.1. Coprólito de caprino 26
5.1.2. Gruta de Santi 27
5.1.2.1. Coprólito de Hiena (A2742) 28
5.1.3. Caverna San Teodoro 28
5.1.3.1. Coprólito de Hiena (A2436, A2437) 29
5.1.4. Unidade São Miguel dos Campos 30
5.1.4.1. Coprólito de Mawsonidae (A2314, A2315) 30
5.1.5. Bacia do Araripe 31
5.1.5.1. Coprólito de peixe carnívoro (A2622) 32
5.1.6. Sítio Cortado 32
5.1.6.1. Coprólito de cinodonte (A1578a) 33
5.1.6.2. Coprólito de dicinodonte (A1578b) 34
5.1.7. Mar Báltico 35

5.1.7.1. Âmbar com Inclusão de Chironomidae 36
5.2. Análise Laboratorial de Coprólito 37
5.2.1. Análise macroscópica 37
5.2.2. Análise ao microscópio de luz 37
5.2.2.1. Ácido clorídrico á 10% 37
5.2.2.2. Aparelho de ultrassom 37
5.2.2.3. Reidratação com fosfato trissódico 38
5.2.3. Análise ao microscópio eletrônico de varredura 38
5.3. Análise Laboratorial do Âmbar 38
5.3.1. Análise ao microscópio de luz 38
5.3.2. Análise ao microscópio eletrônico de transmissão 39

6. RESULTADOS 40
6.1. Análise parasitológica das amostras de animais extintos 40
6.1.1. Coprólito de caprino (A1100 – A1124) 40
6.1.1.1. Cisto de protozoário 40
6.1.2. Coprólito de hiena (A2436, A2437) 41
6.1.2.1. Ovo não identificado 41
6.1.3. Coprólito de hiena (A2742) 42
6.1.3.1. Ovo de Nematoda 42
6.1.4. Coprólito de peixe (Mawsonidae) (A2314, A2315) 43
6.1.5. Coprólito de peixe (A2622) 43
6.1.6. Coprólito de cinodonte (A1578a) 44
6.1.6.1. Ovo de ascarídeo 44
6.1.6.2. Ovo de oxiurídeo 45
6.1.7. Coprólito de dicinodonte (A1578b) 47
6.1.7.1. Ovo de nematoda 47
6.1.8. Âmbar com inclusão de Chironomidae 48

7. DISCUSSÃO 49
7.1. Caprino 50
7.2. Hiena (*Crocuta crocuta spelea*) 50
7.3. Cinodonte 51
7.4. Dicinodonte 53

8. CONCLUSÕES 55

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56

ANEXO I – Tabela Cronoestratigráfica 66

ANEXO II – Artigo "A new ascarid species in cynodont coprolite dated of 240 million yers" 67

ANEXO III – Artigo "Discovery of a 240 million years old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates" 73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa das Ilhas Baleáricas. Ponto vermelho marcado indica a localização da Caverna Estreta 26

Figura 2. Exemplos de amostras de caprinos 27

Figura 3. Coprólito de Hiena proveniente da Itália, Gruta de Santi, datada do Pleistoceno 28

Figura 4. Coprólitos de hiena proveniente da Itália, caverna San Teodoro, datados do pleistoceno 29

Figura 5. Mapa da Itália com a localização da Gruta de Santi (1) e Caverna San Teodoro (2) 29

Figura 6. Mapa com a localização da Bacia Sergipe-Alagoas 30

Figura 7. Coprólito de peixe (Mawsonidae) associado a rocha datado do cretáceo 31

Figura 8. Mapa da Bacia do Araripe. (modificado de RICARDI-BRANCO et al. 2013) 31

Figura 9. Coprólito de peixe da Bacia do Araripe, datado do cretáceo 32

Figura 10. Mapa com a localização do Sítio Cortado, Rio Grande do Sul, Brasil 33

Figura 11. Coprólito de cinodonte proveniente do Rio Grande do Sul, Brasil, datado do Triássico Médio 34

Figura 12. Coprólito mineralizado de dicinodonte proveniente do Rio Grande do Sul, Brasil, datado do Triássico Médio 34

Figura 13. Mapa da região do mar Báltico 35

Figura 14. Âmbar Báltico contendo inclusão de Chironomidae datado do Cretáceo 36

Figura 15. Cisto de protozoário em coprólito de caprino 40

Figura 16. Ovo não identificado em coprólito de hiena 41

Figura 17. Ovo de Nematoda em coprólito de hiena 42

Figura 18. Ovo de ascarídeo em coprólito de cinodonte 45

Figura 19. Imagem do ovo encontrado em coprólito de cinodonte. A, imagem obtida por microscopia de luz; B, por microscopia eletrônica de varredura 46

Figura 20. Imagens da superfície lateral do ovo encontrado em coprólito de cinodonte (A e B).....46

Figura 21. Ovo de nematoide encontrado em coprólito de dicinodonte 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Achados de helmintos potencialmente zoonóticos em coprólitos humanos no Velho Mundo 8

Tabela 2. Achados de helmintos potencialmente zoonóticos em coprólitos humanos no Novo Mundo 9

Tabela 3. Lista de parasitos encontrados em coprólitos de animais extintos 15

Tabela 4. Lista de parasitos encontrados em âmbar 20

Tabela 5. Amostras a serem analisadas para buscar evidências de parasitos 23

1. INTRODUÇÃO

O conceito de parasitismo se refere à relação parasito-hospedeiro como a estabelecida entre espécies diferentes onde há dependência metabólica de grau variado, o que define o parasito como aquele que encontra em outro indivíduo, nesse caso o hospedeiro, seu nicho ecológico[1]. A presença do parasito no organismo de seu hospedeiro caracteriza uma infecção parasitária. Quando são desencadeados sinais e sintomas, podendo trazer prejuízos à saúde do hospedeiro, estabelece-se a doença parasitária[2].

As infecções parasitárias já vêm sendo estudadas há algumas décadas em populações antigas. Este ramo da ciência, que estuda os parasitos em material arqueológico e paleontológico, foi denominado de paleoparasitologia[3]. Tem como principal material de estudo o coprólito (do grego: *kopros*=fezes e *lithos*=pedra), que são fezes mineralizadas ou dessecadas. Também podem-se encontrar vestígios de parasitos em tecidos mumificados, como no encontro de ovos de *Schistosoma haematobium* em rins de múmias egípcias por Sir Marc Armand Ruffer[4], e em outros materiais como ossos e sedimento de latrina e urnas funerárias.

No Brasil, as pesquisas tiveram início com indagações sobre as doenças parasitárias nas populações pré-históricas do Novo Mundo e quais eram autóctones do continente e quais foram introduzidas após o seu descobrimento. Os primeiros resultados constataram ovos de *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos em grupos pré-Colombianos[3]. Devido a esses achados, foram definidas novas rotas sobre a vinda de populações humanas para as Américas, pois devido ao ciclo biológico destes geohelmintos, seria improvável a migração somente pelo estreito de Bering[5].

Com a aplicação de técnicas de biologia molecular em material arqueológico foi possível ter resultados antes não detectados por outras técnicas, como identificar material genético de helmintos como *Ascaris lumbricoides* em coprólitos de humanos na América do Sul[6,7], que até então eram raros em populações pré-Colombianas. Recuperou-se também ADN antigo (aDNA – *ancient* DNA) de *Trypanosoma cruzi*, em corpos mumificados datados de 4.500 – 7.000 anos[8] em território brasileiro, mostrando-se que a infecção chagásica ocorria desde a pré-história em outras regiões, do outro lado da cordilheira dos Andes. Este resultado mudou o paradigma sobre a origem da infecção

humana por *Trypanosoma cruzi* a partir da domesticação de pequenos roedores nos altiplanos bolivianos ao se comprovar a ocorrência há pelo menos 7.000 anos, em Minas Gerais[9].

Os coprólitos de animais também são fonte de informações importantes. Primeiro pelo fato de muitos dos parasitos de animais terem caráter zoonótico, como visto nos resultados obtidos por Sianto e colaboradores[10], ao encontrarem parasitos de animais em coprólitos de populações humanas pré-históricas do nordeste do Brasil. Ao se analisar infecções parasitárias em grupos de animais que precederam os hominídeos podem estabelecer-se relações evolutivas entre os parasitos do passado com os da atualidade, nas populações humanas e também de demais hospedeiros.

As primeiras análises em material de animal extinto foram feitas em coprólitos de preguiça gigante por Eames[11], porém apenas com descrições de vestígios alimentares e grãos de pólen. Posteriormente, Schmidt e colaboradores[12] descreveram ovos de helmintos e cistos de protozoários de uma espécie de preguiça gigante, *Nothrotheriops shastensis*, no Arizona, EUA.

A partir de então, foram feitas pesquisas em animais de épocas cada vez mais antigas, como, por exemplo, em *Iguadodon*, um réptil do período Cretáceo onde foram descritas novas espécies de helmintos e protozoários[13]. Assim como as pesquisas no Brasil mostraram resultados com os estudos em animais extintos ao se analisarem coprólitos de hiena, encontrados na Itália, datados de 1,5 milhões de anos, descrevendo-se larvas de nematóide[14]. Outro resultado interessante foi o achado de ovos de um helminto, *Spirometra* sp., em coprólito de onça (*Panthera onca*) datado do Pleistoceno, carnívoro ainda existente na fauna atual[15].

O grupo de Poinar Jr. pesquisou materiais pouco usuais na paleoparasitologia, como o âmbar, que mostrou resultados bem peculiares. Em uma dessas pesquisas, foram descobertos protozoários parasitos de térmitas, datados do Cretáceo[16]. E outro achado foi de uma espécie de *Plasmodium* encontrado ao se analisar um mosquito extinto da família Culicidae, também preservado em âmbar, datado de 15 a 45 milhões de anos. O achado desses parasitos nessa amostra deu suporte a teorias sobre a presença de um tipo de malária primitiva na região antes da descoberta do que hoje chama-se Novo Mundo[17].

A paleopatologia que investiga a ocorrência de doença em humanos e animais em grupos antigos, e tem provado que tais doenças acompanham a espécie humana desde o seu surgimento na terra[18], e a evidência de helmintos e protozoários em animais extintos mostra a presença de doenças infecto-parasitárias antes mesmo do surgimento dos hominídeos. Deste modo, com dados de helmintíases e protozooses em animais extintos, pode-se traçar um perfil paleoepidemiológico para tentar reconstruir espacial e temporalmente a distribuição dessas doenças e compreender suas formas evolutivas[19].

Portanto, infere-se que parasitos encontrados em animais extintos podem ser identificados e comparados com os presentes em hospedeiros atuais, filogeneticamente próximos, inclusive humanos. Assim, o presente trabalho buscou por parasitos em animais de épocas remotas e, quando encontrados, foram identificados em diferentes graus taxonômicos e traçados caminhos evolutivos até seus hospedeiros atuais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar parasitos em coprólitos de animais extintos e associados a insetos em âmbar depositados na coleção de Paleoparasitologia da ENSP/FIOCRUZ.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar cistos de protozoários, ovos e larvas de helmintos em coprólitos de animais extintos;
- Identificar evidências de protozoários, helmintos e fungos em artrópodes e outros restos orgânicos presentes em âmbar;
- Comparar os achados em animais extintos com os parasitos presentes em seus representantes atuais.

3. JUSTIFICATIVA

Este trabalho propõe-se a estudar as relações parasitárias em grupos de animais extintos que podem responder a indagações sobre o surgimento de infecções parasitárias em populações atuais. Pretende-se contribuir para o conhecimento quanto à interação parasito-hospedeiro-ambiente e, possivelmente, o perfil paleoepidemiológico.

Os trabalhos que se referem a infecções parasitárias no passado ainda são muito escassos, apesar da sua constante expansão; quando se tratam de animais extintos as referências são ainda mais raras. Estudos com esse foco ajudam a melhor compreender a continuidade ou evolução no que se refere às relações parasito-hospedeiro-ambiente. Abre também novos caminhos para que se possa entender melhor a dinâmica das infecções parasitárias em populações antigas.

A justificativa central deste projeto é pautar-se nos vestígios parasitológicos encontrados em grupos extintos e identificar se existe relação com os parasitos encontrados em grupos atuais, filogeneticamente próximos. Ainda que não se tenha dados suficientes para afirmar a ocorrência das doenças que acometiam esses animais extintos, é possível comparar as parasitoses antigas com as atuais.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1. Paleoparasitologia

O encontro de parasitos em material arqueológico foi feito pela primeira vez por Sir Marc Armand Ruffer em 1910[4]. A criação da técnica para reidratação de tecidos mumificados possibilitou o exame histológico dos rins de múmias Egípcias datadas de 3.200 anos, onde foram identificados ovos de *Schistosoma haematobium*[4].

A Paleoparasitologia foi assim nomeada em 1979 pelo Dr. Luiz Fernando Ferreira, pesquisador emérito da Fundação Oswaldo Cruz, quando iniciou essa ciência no Brasil gerando a publicação de um trabalho sobre achados de ovos de *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos em coprólitos datados do período pré-Colombiano, com o objetivo de mostrar a antiguidade das parasitoses intestinais na população do Novo Mundo[3].

Por definição, a paleoparasitologia é o estudo de parasitos em material arqueológico ou paleontológico[3]. Tem como principal material de estudo o coprólito (*Kópros* = excremento e *Lithos* = pedra)[20], que são fezes que, em condições favoráveis, preservam-se por processo de dessecação ou mineralização[21]. Coprólitos podem ser encontrados em camadas arqueológicas ou paleontológicas, assim como em fossas ou no interior de corpos mumificados[22].

Um trabalho realizado por Szidat[23] em 1944, foi um dos pioneiros a utilizar o coprólito como fonte principal da pesquisa para fins parasitológicos, ao mostrar a presença de ovos de *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* em corpos datados de 1.500 anos, preservados em um pântano na Prússia.

No Brasil, as pesquisas do fim da década de 70 publicadas por Ferreira, Araújo e Confalonieri[3] e no início da década de 80 pelos mesmos autores, que com achados de larvas e ovos de helmintos em coprólitos humanos, foram o marco inicial da paleoparasitologia no país[24,25,26,27].

Em outros países a busca por parasitos em material arqueológico também apresentou resultados positivos para diversas parasitoses. Na França, Bouchet e

colaboradores[28] encontraram ovos de *Schistosoma mansoni* em material datado de 1.500 anos em latrina na França, o que seria o primeiro registro dessa infecção na Europa, provavelmente trazida por escravos africanos. Fugassa e colaboradores[29], na Argentina, descreveram oocistos de *Eimeria macusaniensis* em coprólitos e sedimentos da Patagônia, datados do Holoceno, sugerindo uma evolução do parasito em relação a diminuição do tamanho do oocisto. E nos Estados Unidos com Reinhard e colaboradores[30], ao descrever um caso de megacolon como caso de doença de Chagas em múmia encontrada no Deserto de Chihuahuan, Texas.

Uma questão que a paleoparasitologia tenta elucidar é sobre as migrações humanas e o povoamento nas Américas. Achados como os de *Trichuris trichiura* e ancilostomídeos em populações pré-colombianas, afastam a possibilidade de povoamento das Américas apenas pelo Estreito de Bering, devido à impossibilidade da manutenção do ciclo biológico desses parasitos[31]. O que difere de achados de *Enterobius vermicularis*, que por independer das condições climáticas da região para sua manutenção na população, sua dispersão pode ter-se dado por qualquer rota proposta[32].

A partir de então, é possível ver a diferença na presença dos parasitos intestinais na época medieval no Velho Mundo e no pré-contato do Novo Mundo. Os achados nessas duas regiões, apesar de semelhantes quanto aos parasitos, diferem na frequência em que estão presentes nas amostras. No Velho Mundo há uma prevalência muito maior do que no Novo Mundo, explicado pelo modo de vida nômade dos caçadores coletores na América pré-histórica que dificultava a manutenção do ciclo de alguns parasitos[33,34].

Devido a diferentes ambientes, períodos de escassez de alimentos e adaptações culturais, o contato entre humanos e parasitos de animais se tornou mais constante[35]. As zoonoses, definidas como qualquer doença ou infecção que acomete humanos, transmitida por animais[36], foram observadas em populações pré-históricas do Novo e Velho Mundo nas teses de Fugassa[37] e Le Bailly[38]. O primeiro autor pôde constatar parasitoses zoonóticas em grupos de caçadores-coletores da Patagônia com a comparação de parasitos encontrados em coprólitos animais[37]; já o segundo faz comparações entre diferentes vilarejos lacustres que tem a carga parasitária variando com o tempo devido a mudanças na sua alimentação, com consumo de diferentes fontes animais e no clima da região[38].

A tese de Sianto[39] apresentou uma revisão dos parasitos zoonóticos encontrados em coprólitos humanos no Velho e Novo Mundo. Demonstrou por localidades os principais achados, e que desde o passado recente (Holoceno) há evidência da circulação de parasitos de animais em populações humanas. As tabelas 1 e 2 mostram um resumo por hospedeiro dessa revisão.

Tabela 1. Achados de helmintos potencialmente zoonóticos em coprólitos humanos no Velho Mundo.

Hospedeiro Natural	**Parasitos encontrados**	**Espécies identificadas**
Herbívoros	Trematoda	*Dicrocoelium* sp. *Dicrocoelium dendriticum*
Ruminantes e outros herbívoros	Trematoda	*Fasciola* sp. *Fasciola hepática*
Bovinos e suínos	Cestoda	*Taenia* sp.
Carnívoros	Trematoda Cestoda Nematoda	*Opistorchis* sp. Opistochiformes *Clonorchis sinensis* *Diphylobothrium* sp. *Diphylobothrium latum* *Dioctophyma renale*
Mamífero (Carnívoros)	Trematoda	*Paragonimus* sp.
Vários mamíferos e aves	Nematoda	*Capillaria* spp.
Cães, gatos, suínos e aves	Trematoda	*Metagonimus yokogawai*
Aves (Ostraceiros)	Trematoda	*Gymnophalloides seoi*
Herbívoros, carnívoros, suínos e roedores	Trematoda	*Schistosoma japonicum*

Tabela adaptada de Sianto[39].

Tabela 2. Achados de helmintos potencialmente zoonóticos em coprólitos humanos no Novo Mundo.

Hospedeiro Natural	Parasitos encontrados	Espécies identificadas
Mamíferos e aves	Trematoda Nematoda	*Echinostoma* sp. *Capillaria* spp.
Vários mamíferos	Nematoda Acantocephala	*Trichuris* spp. *Moniliformis clarki*
Mamíferos (Carnívoros)	Trematoda	*Paragonimus* sp.
Carnívoros	Cestoda	*Diphylobothrium* sp. *Diphylobothrium latum* *Diphylobothrium pacificum*
Canídeos e primatas	Nematoda	*Strongyloides* sp.
Ruminantes e outros mamíferos	Nematoda	*Trichostrongylus* sp.
Vários vertebrados	Trematoda	*Physaloptera* sp.

Tabela adaptada de Sianto[39].

Mais evidências de zoonoses são relatadas em tempos passados. Beltrame e colaboradoes[40] encontraram oocistos de *Eimeria macusaniensis*, além de ovos de capilarídeos, tricostrongilídeos e tenídeos. Apesar da origem humana do coprólito ser incerta, esse estudo evidencia a circulação de parasitos com potencial zoonótico em um sítio holocênico, com intensa atividade antrópica, na Patagônia.

Há também casos de falso parasitismo, como visto em coprólitos humanos de 10 mil anos antes do presente (AP), oriundos do nordeste do Brasil. O achado de ovos de Pharyngodonidae, um nematódeo típico de lagartos, nesses coprólitos, não representa uma infecção verdadeira. O consumo do lagarto, que ocorre até os dias atuais na região, explica os ovos encontrados[41].

Uma importante contribuição na paleoparasitologia foi a introdução de técnicas de biologia molecular aplicadas ao material arqueológico, que com o aperfeiçoamento de técnicas para a recuperação de DNA antigo possibilitou, como por exemplo, a identificação de ascarídeos em material humano da América do Sul

datados do pré-contato[6,7]. Até então esta infecção parasitária era considerara muita rara no continente sul americano.

Identificou-se uma grande ocorrência, ou frequência, da infecção por *Trypanosoma cruzi* em tecidos mumificados datados de 9.000 – 450 AP, em populações da costa pacífica da América do Sul[42]. Isto foi possível com as técnicas de PCR, pois a doença de Chagas em sua fase aguda não deixaria marcas detectáveis em corpos mumificados.

A par dos dados parasitológicos, junta-se a palinologia para preencher algumas lacunas não esclarecidas. Essa ciência se caracteriza pelo estudo de palinomorfos, grãos de pólen e esporos em seu ciclo reprodutivo. Além de estruturas vegetais, os esporos de fungos e algas estão incluídos nessa ciência que pode ser aplicada tanto em registros atuais como em paleontologia e arqueologia[43,44]. Seus dados podem informar sobre a paleovegetação e o paleoclima do ambiente[45,46,47,48], e com o coprólito como objeto de estudo, pode-se também, determinar a paleodieta[49].

Assim foi possível identificar o uso de plantas medicinais em grupos pré-históricos da América do Sul, datados de 8450 ± 80 e 7230 ± 80 anos, pelo encontro de sementes, grãos de pólen e fitólitos presentes nos coprólitos[50]. Isto também foi objeto de estudo na dissertação de mestrado de Teixeira-Santos[51], em que foi sugerido o uso destas plantas com propriedades anti-helmínticas por povos pré-históricos das Américas.

Com os dados obtidos dos estudos paleoparasitológicos aliados a outras ciências é possível inferir sobre a origem e distribuição de infecções parasitárias, contribuir para revelar as migrações humanas do passado e entender a relação parasito-hospedeiro-ambiente[21].

4.2. Animais Extintos

Os estudos com animais extintos, tanto parasitológicos como de paleodieta, tentam buscar nos vestígios coprológicos explicações sobre as relações da vida no passado e suas relações parasitárias. Os primeiros a trabalhar com coprólitos de animais extintos foram Renault e Bertrand em 1895[52], que ao analisar coprólitos de vertebrados identificaram estruturas identificadas como bactérias. Logo após, Eames[53], em 1930, ao analisar coprólitos de preguiça gigante do Novo México, descreveu restos alimentares e grãos de pólen, porém negativo para parasitos. Ringuelet[54] por sua vez, encontrou prováveis ovos de nematóides em coprólitos de preguiça gigante (*Mylodon listai*) datada de mais de 10.000 anos.

Posteriormente, Schmidt, Duszynski e Martin[55] descreveram cistos de protozoários, ovos de helmintos e larvas de nematóides em coprólitos de preguiça gigante de outra espécie (*Nothrotheriops shastensi).* Já Poinar e colaboradores[56] ao utilizarem técnicas de biologia molecular descreveram a dieta de *N. shastensi*, porém, não foi investigado evidências parasitológicas.

Coprólitos de outros animais que viveram na época do Pleistoceno também forem estudados. Assim Backwell e colaboradores[57] acharam prováveis cabelos humanos em coprólitos de hiena (*Parahyena brunnea*). Concluem que podem ter sido devido ao hábito carniceiro das hienas o que torna improvável a hipótese de predação.

Bouchet e colaboradores[22] examinaram sedimentos datados do Pleistoceno de cavernas na França, encontraram ovos de *Toxocara canis*. Concluíram que hienas extintas da espécie *Crocuta spelaea* eram o hospedeiro do parasito por serem os carnívoros predominantes na região àquela época, obtendo assim, novos dados de infecções parasitárias no passado. Já em pesquisas realizadas no Brasil, Ferreira, Araújo e Duarte[14] analisaram coprólitos de hiena, encontrada na Itália e datada de 1,5 milhões de anos, onde foram encontradas larvas de nematóides. Este foi o primeiro trabalho com animais extintos realizado no Brasil.

Outro coprólito de carnívoro datado do Pleistoceno foi analisado com relato da presença de ovos de *Spirometra* sp. O carnívoro era provavelmente uma onça (*Panthera onca*), ainda existente na fauna atual[15]. Contudo, ainda há espaço para

estudos da relação filogenética desse parasito, embora não tenham sido abordados maiores detalhes acerca do achado. Com a *Palaeolama major* (Camelidae), outro animal da megafauna das Américas, confirmou-se a preferência por uma alimentação em ambientes de floresta a ingestão de gramíneas em áreas abertas, devido a analises realizadas em coprólito para investigar os componentes de sua dieta[58].

Os achados em animais extintos vão além dos datados de tempos mais recentes como o Pleistoceno. Chin e colaboradores[59] descreveram fragmentos de ossos em um grande coprólito de carnívoro datado do Cretáceo, sendo provavelmente de um tiranossaurídeo. Até então, este foi o maior coprólito analisado, medindo 44cm de comprimento e pesando 7,1kg. Por análise tafonômica concluiu-se que coprólitos de carnívoros têm uma preservação melhor devido a altas concentrações de cálcio. Isto se confirma pela pesquisa desenvolvida por Dentzien-Dias[60] que, ao estudar uma área em que havia concentração de muitos coprólitos, relacionou a morfologia de cada um aos respectivos animais excretores, chegou então, a mesma conclusão de que coprólitos de animais carnívoros são melhor preservados devido à presença mais frequente de coprólitos dos mesmos.

Em Alberta, Canadá, outro coprólito de tiranossaurídeo datado do Cretáceo revelou tecidos musculares bem preservados, o que possibilita propor sua digestão e a história diagênica do tecido[61]. Pela análise de coprólito de dinossauro na Bélgica, foi descoberta a presença de parasitismo pela presença de ovos de helmintos e cistos de protozoários. Também, foram encontrados resquícios vegetais e grãos de pólen, porém, estes não foram descritos detalhadamente[62]. Também em tiranossaurídeo (*Tyrannosaurus rex*), foi diagnosticada através de analises de mandíbulas lesionadas, infecção por *Trichomonas gallinae*, o que representa a mais antiga referência da infecção por esse protozoário em um grupo não aviário, sugerindo sua transmissão pela predação de animais infectados[63].

Sharma e colaboradores[64] sugeriram que o *Isisaurus* (*Titanosaurus*), um saurópode do Cretáceo, vivia em um clima tropical-subtropical, descrevendo sua dieta através da presença de esporos de fungos no coprólito do animal, possibilitando descrever os tipos vegetais de que se alimentavam. Datados da mesma época, coprólitos de titanossaurídeo foram estudados com o auxílio de isótopos de

carbono e nitrogênio que mostraram variadas plantas que estavam presentes na dieta e indicaram ausência de fermentação na digestão desse herbívoro[65].

Wood e colaboradores[66] analisaram 84 coprólitos de 4 espécies extintas de aves terrestres (Dinornithiformes), onde foram encontrados coccídeos, nematódeos e trematódeos, aparentemente, muitos desses parasitos eram hospedeiro-específicos e sugerem, assim, que estudos paleoparasitológicos podem elucidar a ideia de co-extinção de parasito-hospedeiro. Já com a análise de 116 coprólitos, também com espécies de aves terrestres, foi revelado que a dieta desses animais variava mais de acordo com o ambiente do que entre espécies, além de evidenciar a diferença na ecologia alimentar dessas aves com os mamíferos herbívoros[67].

Foi sugerida uma dieta onívora de um crocodilomorfo extinto (*Mariliasuchus amarali*) no Brasil através de analises da composição química e da morfologia do coprólito, e também da estrutura dentária e maxilar[68]. Elaborou-se uma hipótese de extinção da cabra da espécie *Myotragus balearicus* a partir de análises de seu coprólito, ao mostrar sua dependência alimentar com a planta *Buxus baleárica,* endêmicas das Ilhas Baleáricas no Mediterrâneo, que por ter sua distribuição afetada pela mudança climática provocou o desaparecimento desta espécie de cabra[69].

O achado mais antigo de evidência de parasitismo foi em coprólito de tubarão datado de 270 milhões de anos, período Permiano, que evidencia a presença de cestódeos em grupos de arraias e tubarões primitivos que não eram considerados como hospedeiros até então[70].

Não só em coprólitos são feitos achados de parasitos em animais extintos. Um estudo realizado na Argentina analisou material regurgitado de aves de rapina (pelotas/bolota de regurgitação), datado do Holoceno, identificaram-se parasitos intestinais como *Trichuris, Calodium* e tenídeo, provavelmente parasitos da presa dessa ave, sugerindo-se roedores[71]. Assim como estudos com fósseis de 349 peixes teleósteos de cinco espécies do norte da Itália, onde foram encontrado nódulos na epiderme desses peixes, apesar de serem de causa inespecífica podem ser causados por parasitos[72].

Como visto, algumas pesquisas com animais extintos apresentaram resultados parasitológicos que evidenciam a presença da relação parasito-hospedeiro

desde tempos pretéritos e que se preservaram até hoje. E em alguns casos pode-se inferir sobre sua distribuição, extinção e manifestação de doenças naqueles animais. Pode-se ver na tabela abaixo (tabela 1) uma lista dos parasitos e seus hospedeiros para melhor visualização dos achados.

Tabela 3. Parasitos encontrados em coprólitos de animais extintos.

Hospedeiro	Organismos Encontrados	Organismos Identificados	Datação	Referência
Vertebrado (não identificado)	Vestígios de cocos e bacilos	-	Permiano	Renault e Bertrand (1895)[52]
Mamífero (Preguiça gigante)	Ovo de nematódeo	-	Pleistoceno	Ringuelet (1957)[54]
Mamífero (Preguiça gigante)	Ovos de nematódeos Protozoários	*Agamofilaria Oxyura* *Strongyloides shatensis* *Archeococcidea antiques* *Archeococcidea nothotheriopsae*	Pleistoceno	Schmidt et al. (1992)[55]
Réptil	Protozoários Ovos de nematódeo	*Entamoebites antiquus* *Digenites proterus* *Ascarites priscus* *Ascarites gerus*	Cretáceo	Poinar Jr. e Boucot (2006)[62]
Dinossauro (Tiranossaurídeo)	Protozoários	*Trichomonas gallinae*	Terciário	Wolff et al.(2009)[63]

Hospedeiro	Organismos Encontrados	Organismos Identificados	Datação	Referência
Aves Terrestres	Protozoários Ovos de nematódeos Ovos de trematódeos	*Cryptosporidium* Eimeriorina Heterakoidea Trichostrongylidae Echinostomida	Holoceno	Wood et al. (2013)[66]
Dinossauro (Saurópode)	Esporos de fungos	-	Cretáceo	Sharma et al. (2005)[64]
Mamífero (Hiena)	Ovo de nematódeo	*Toxocara canis*	Pleistoceno	Bouchet et al. (2003)[22]
Mamífero (Hiena)	Larva de nematódeo	-	Pleistoceno	Ferreira et al., (1993)[14]
Elasmobranchii	Ovos de cestódeo	-	Permiano	Dentzien-Dias et al. (2013)[70]

4.3. Âmbar

O âmbar se origina da fossilização de resinas provenientes de diferentes espécies vegetais encontradas em várias partes do mundo. Essa resina tem como principal função a de proteção do vegetal contra diversos agentes que possam causar ferimentos em seus caules, como microrganismos e insetos, agindo assim como cicatrizantes[73]. Ao expeli-la artrópodes, microrganismos, folhas e evidências de vertebrados, como pelos e penas, podem ser aderidos e fossilizados juntos a ela.

Existem importantes depósitos onde os âmbares são encontrados, estes localizam-se principalmente no México, Burna, Líbano e Nova Jersey, os que mais frequentemente apresentam âmbares com inclusões são os da região Báltica e da República Dominicana[73], achados importantes para estudos de cunho paleontológico. Esses depósitos apresentam datações principalmente a partir do Triássico, quando começaram a se tornar mais abundantes.

As inclusões desempenham um importante papel na reconstrução dos cenários paleontológicos, pois no âmbar a preservação de artrópodes é abundante ao contrário do que é encontrado em rochas, onde os achados são escassos. Além de responder questões no que se refere à existência de alguns invertebrados em tempos remotos, determinados artrópodes encontrados representam um grupo importante para estudos da evolução das doenças parasitárias, os vetores. Achado como de triatomíneos, culicídeos e flebotomíneos mostram evidências de circulação de protozoários em tempos remotos.

Em âmbar proveniente da República Dominicana, foi possível estabelecer que a simbiose entre o gênero *Theope* de lagarta de borboleta e formigas, começou a se estabelecer há pelo menos 20 milhões de anos, devido a estruturas secretoras e acústicas presentes nessa lagarta, que são responsáveis por essa simbiose, evidenciam essa relação entre os dois insetos[74]. Também a descoberta de uma nova espécie do gênero *Stylops* em âmbar dominicano, não só traz evidências de um clima mais temperado nas Antilhas, baseados em comportamentos de espécies viventes atuais, mas a provável relação de parasitismo entre essa espécie com abelhas encontradas no mesmo âmbar, *Protandrena eickworti* Rozen Jr., assim sugerida devido a ambos terem o tamanho reduzido em comparação às espécies atuais[75].

Outro caso de relação interespecífica benéfica é o das baratas (família Blattellidae) com protistas flagelados encontrados em âmbar, datado de 100 milhões de anos. Foram identificados em um desses insetos, duas ordens de protozoários, Trichonymphida e Oxymonadida, que só são encontradas em baratas de algumas espécies da família Cryptocercidae na atualidade[76], sugerindo que esses flagelados eram mais comuns em diversas baratas na época do Cretáceo do que na atualidade.

Poinar Jr[77], descreveu uma nova espécie de térmita (*Kalotermis burmensis* n. sp.) em âmbar datado do Cretáceo. Neste espécime, que apresentava o abdômen destruído, foi possível a identificação de 11 protozoários, 10 flagelados das famílias Trichomonada, Hypermastigida e Oxymonadea, e um novo gênero fóssil de ameba, alguns deles ainda presentes em cupins viventes.

Também é evidenciada em âmbar da República Dominicana a presença de ectoparasitos como as pulgas, a exemplo de um exemplar do gênero *Pulex* descrito por Lewis e Grimaldi[78], onde a presença de pelos juntos a ela, identificados como sendo de mamíferos, indicava o ectoparasitismo desse grupo no Mioceno. Essa relação foi sugerida devido a raridades dos dois achados, tanto de pelos quanto de pulgas, em âmbares dessa região. Assim, quando encontrados em uma mesma peça, pode-se deduzir que a pulga foi preservada junto aos restos de seu hospedeiro mamífero[78].

No trabalho de Zavortink[79], encontraram-se ovos e fêmea de *Anopheles* em âmbar proveniente do que hoje é tido como Novo Mundo com idade do Terciário Médio, contradizendo a ideia do seu surgimento no Velho Mundo. Este achado corrobora os de Poinar Jr[17], que descreveu uma nova espécie de plasmódio em âmbar dominicano do mesmo período. No entanto tais estudos detectaram este parasito em um mosquito pertencente do gênero *Culex* sp.

Poinar Jr[80] em 2008 também sugere a circulação de tripanosomatídeos há cerca de 25 milhões de anos em áreas neotropicais, com a descrição de uma nova espécie de flebotomíneo (*Lutzomyia adiketis* sp. n.) que encontrava em sua probóscide formas amastigotas, promastigotas e paramastigotas de *Paleoleishmania neotropicum* sp. n., que segundo ele poderia ter originado alguma das atuais espécies de leishmania neotropicais. Assim como um achado mais antigo dessas mesmas formas de tripanosomatideos em âmbar datado de 100 milhões de anos, que indica a relação do vetor com o parasito desde o Cretáceo, porém na região da Birmânia[81]. Foi descrito uma

nova espécie, *Paleoleishmania proterus* n. gen. com o achado do tripanossomatídeo associado ao flebotomíneo nessa região por Poinar Jr e Poinar [82].

Outro achado envolvendo *Leishmania* sp. foi o encontrado em uma larva de flebotomíneo em âmbar datado do período Cretáceo, que apresentava formas flageladas com características de tripanosomatídeos. A partir desta descoberta, Poinar Jr.[83] sugeriu que os tripomastigotas foram ingeridos pelas larvas, se mantiveram até a fase adulta e passaram consequentemente para hospedeiros vertebrados.

Foi encontrado em fezes inclusas em âmbar junto com um triatomíneo (*Triatoma dominicana*), o protozoário *Trypanosoma antiquus* sp. n., o que representa a evidência dessa relação com o vetor há milhões de anos nas Américas. Foi sugerido, pela presença de pelo de morcego no material, que esse animal poderia ser o hospedeiro desse parasito[84].

Há registro de nematódeos em âmbar de 100 milhões de anos. Um Mermithidae, que estava emergindo de um mosquito da família Ceratopogonidae e outro nematóide, do filo Nematomorpha, que não estava associado a nenhum artrópode presente na peça de âmbar[85].

Para melhor visualização da ocorrência paleontológica da relação dos insetos com os parasitos, tanto como possíveis vetores ou não, ver a tabela a seguir (tabela 2).

Tabela 4. Parasitos encontrados em âmbar.

Hospedeiro	Organismo Encontrado	Organismos Identificados	Datação	Referência
Inseto (Flebotomíneo)	Protozoário	*Paleoleishmania proterus*	Cretáceo	Poinar Jr e Poinar (2004)[82]
Inseto (Flebotomíneo)	Protozoário	*Paleoleishmania neotropicum*	Cretáceo	Poinar Jr (2008)[80]
Inseto (Triatomíneo)	Protozoário	*Trypanosoma antiquus*	Cretáceo	Poinar Jr (2005)[84]
Inseto (Térmita)	Protozoários	*Foainites icelus* *Spiromastigites acanthodes* *Trichonymphites henis* *Teranymphites rhabdotis* *Oxymonas protus* *Oxymonites gerus* *Microrhopalodites polynucleatis* *Sauromonites katatonis* *Dinenymphites spiris* *Pyrsonymphites cordylinis* *Entamoebites proterus*	Cretáceo	Poinar Jr (2009)[77]

Hospedeiro	Organismo Encontrado	Organismos Identificados	Datação	Referência
Inseto (Culex)	Protozoário	*Plasmodium dominicana*	Terciário	Poinar Jr (2005)[17]
Inseto (Ceratopogonidae)	Nematódeo	Mermithidae	Cretáceo	Poinar Jr e Buckley (2006)[85]
Inseto (Blattellidae)	Protozoáros	Trichonymphida Oxymonadida	Cretáceo	Poinar Jr (2009)[76]
Mamífero	Artrópode	*Pulex*	Mioceno	Lewis e Grimaldi (1997)[78]

5. METODOLOGIA

Foram estudadas 33 amostras disponíveis na Coleção do Laboratório de Paleoparasitologia e analisadas 2.500 lâminas de 25 coprólitos dessecados, 7 coprólitos mineralizados e 1 peça de âmbar com inclusão de inseto, de diferentes idades geológicas que compreendem do Pleistoceno ao Triássico, com o auxilio de microscopia de luz e eletrônica (varredura e transmissão) para buscar evidências de parasitismo. A tabela com a lista de amostras com especificações da origem zoológica, idade da amostra, local de coleta, técnica utilizada e número de lâminas analisados, pode ser vista pagina a seguir (tabela 3).

Tabela 5. Amostras analisadas para buscar evidência de parasitos.

Amostra	Origem Zoológica	Período	Local da Coleta	Técnica Utilizada	Nº de lâminas analisadas
A1100	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1101	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1102	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1103	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1104	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1105	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1106	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1107	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1108	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1109	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1110	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20

Amostra	Origem Zoológica	Período	Local da Coleta	Técnica Utilizada	Nº de lâminas analisadas
A1111	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1112	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1113	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1114	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1115	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1116	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1117	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1118	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1119	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1120	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1121	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1122	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20

Amostra	Origem Zoológica	Período	Local da Coleta	Técnica Utilizada	Nº de lâminas analisadas
A1123	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A1124	Caprino	Pleistoceno	Caverna Estreta / Ilha Mallorca / Espanha	Reidratação com Fosfato Trissódico	20
A2436	Hiena	Quaternário	Caverna San Teodoro / Itália	Ácido Clorídrico	200
A2437	Hiena	Quaternário	Caverna San Teodoro / Itália	Ácido Clorídrico	200
A2742	Hiena	Quaternário	Gruta de Santi / Itália	Ácido Clorídrico, Ultrassom	100*
A2314	Peixe	Cretáceo	Un. São Miguel dos Campos / AL	Ácido Clorídrico	100
A2315	Peixe	Cretáceo	Un. São Miguel dos Campos / AL	Ácido Clorídrico	100
A2622	Peixe	Cretáceo	Bacia do Araripe / CE	Ácido Clorídrico, Ultrassom	200*
A1578a	Cinodonte (réptil)	Triássico	Sítio Cortado / RS	Ácido Clorídrico	525
A1578b	Dicinodonte (réptil)	Triássico	Sítio Cortado / RS	Ácido Clorídrico	525
Âmbar	Mosquito	Cretáceo	Região Báltica	- **	- **

***** Cada metade das lâminas foi analisada por uma das técnicas especificadas. ** Não foi processado nem analisado.

5.1. Descrição dos Sítios Paleontológicos e dos coprólitos de animais estudados

5.1.1. Caverna Estreta

A caverna Estreta localiza-se no arquipélago mediterrâneo Ilhas Baleáricas (Fig 1). Encontra-se na parte norte da maior das ilhas, chamada de Mallorca. É uma caverna pequena com uma entrada de 3 m de largura, 3,5 m de profundidade e 4 m de altura máxima, e possui outros compartimentos em seu interior. Encontram-se nesses compartimentos vestígios de *Myotragus balearicus* e *Hypnomys morpheus*, respectivamente cabra e roedor endêmicos das ilhas baleáricas, extintos há cerca de 6.000 anos[86].

Figura 1. Mapa das Ilhas Baleáricas. O ponto vermelho marcado indica a localização da Caverna Estreta[87].

5.1.1.1. Coprólito de caprino (A1100 – A1124)

O caprino da espécie *Myotragus balearicus*, é um espécime de porte pequeno que habitava as ilhas baleáricas ao sul da Espanha, apesar do seu tamanho, que não ultrapassava os 50 cm de altura, era o maior mamífero que habitava essas ilhas. Existem duas hipóteses para sua extinção, uma delas seria devido a ocupação humana na ilha e a outra por causa das mudanças climáticas, porém estudos refutaram a segunda suposição[88]. Os coprólitos analisados estão representados na figura 2.

Figura 2. Amostras de caprinos analisadas.

5.1.2. Gruta de Santi

Localizada na Itália, em Monte Argentario, Grosseto, a Gruta de Santi (Fig 5), é um sítio arqueológico com material datado do Pleistoceno. Esta localizada a 18 m acima do mar, tendo 45 m de largura e 40 m de altura na sua parte mais alta. A gruta apresenta evidencias de habitação humana no paleolítico médio e achados de restos faunísticos de mamíferos, aves, répteis e moluscos, apresentando grande concentração de coprólitos identificados como sendo de hienas[89].

5.1.2.1. Coprólito de Hiena (A2742)

A Hiena extinta, *Crocuta crocuta spelaea*, é um dos carnívoros mais importantes da região Africana e Euroasiática na época do Pleitoceno[90]. Surgiram na época do Mioceno, cerca de 10 milhões de anos AP, extinguido-se na Europa durante o período glacial, ao final do Pleistoceno[91]. Algumas evidências apontam a convivência desta espécie com humanos pré-históricos, porém não apresentavam uma relação de predação[57]. Uma amostra de coprólito de hiena, enviada pelo pesquisador Fábio Parenti do *Istituto Italiano di Paleontologia Umana*, em Roma, foi analisada (fig 3).

Figura 3. Coprólito de Hiena proveniente da Itália, Gruta de Santi, datada do Pleistoceno.

5.1.3. Caverna San Teodoro

A caverna de San Teodoro está localizada na Sicília, em uma cidade chamada de Acquedolci (fig 5). É uma caverna grande, com 60 m de profundidade, 20 de extensão e 20 de altura. O grupo de maior representatividade nos achados paleontológicos foram os de hiena, *Crocuta crocuta spelaea*, e veados, *Cervus elaphus siciliae*. Também foram encontrados outros grupos animais, como porcos, raposas, bovinos e quinos, além de coprólitos[92].

5.1.3.1. Coprólitos de Hiena (A2436, A2437)

Coprólito de hiena também da subespécie *Crocuta crocuta spelaea*, encontrada na Caverna San Teodoro. As duas amostras totalizam 10 coprólitos de hiena representados na figura 4. Essas amostras também foram enviadas pelo pesquisador Fábio Parenti.

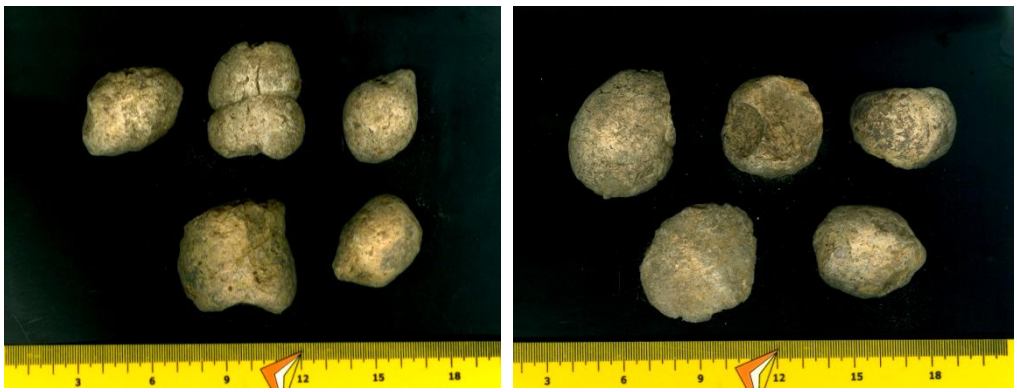

Figura 4. Coprólitos de hiena proveniente da Itália, caverna San Teodoro, datados do pleistoceno.

Figura 5. Mapa da Itália com a localização da Gruta de Santi (1) e Caverna San Teodoro (2).

5.1.4. Unidade São Miguel dos Campos

Esta unidade estratigráfica está localizada em São Miguel dos Campos, pertencente a Formação Morro do Chaves, bacia de Sergipe-Alagoas, na região costeira do nordeste do Brasil[93] (fig 6). Formada a partir de um ambiente salino e lacustre, passado por períodos de secas e grandes áreas de exposição. Com sua paleofauna composta principalmente pela ictiofauna[94,95].

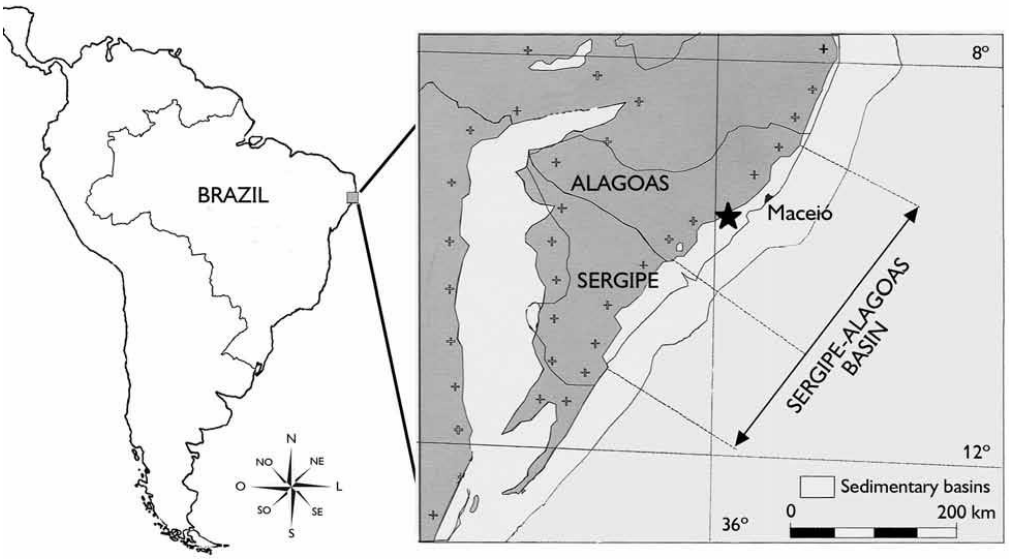

Figura 6. Mapa com a localização da Bacia Sergipe-Alagoas[93].

5.1.4.1. Coprólito de Mawsonidae (A2314, A2315)

Os coprólitos estão associados a rochas provenientes da Unidade São Miguel dos Campos, são pertencentes a peixes do gênero *Mawsonia* descritos por Gallo e colaboradores[93], da família Mawsonidae, conhecida como celacantos (Sarcopterigii). Além do gênero estudado, outros dois foram registrados em escavações no Brasil, *Axelrodichthys e Parnaibaia.* Dois coprólitos associados a rocha foram estudados, representados na figura 7.

Figura 7. Coprólito de peixe (Mawsonidae) associado à rocha datado do cretáceo.

5.1.5. Bacia do Araripe

Esta bacia localiza-se entre os estados do Ceará, Piaui e Pernambuco (fig. 8), e tem aproximadamente 9.000 km² de área e uma espessura sedimentar de 1700m[96], datada do Cretáceo inferior, apresenta uma assembleia fossilífera bem diversificada, onde são encontrados exemplares de répteis, anfíbios, tubarões, artrópodes, vegetais e uma grande quantidade de espécies de peixes[97].

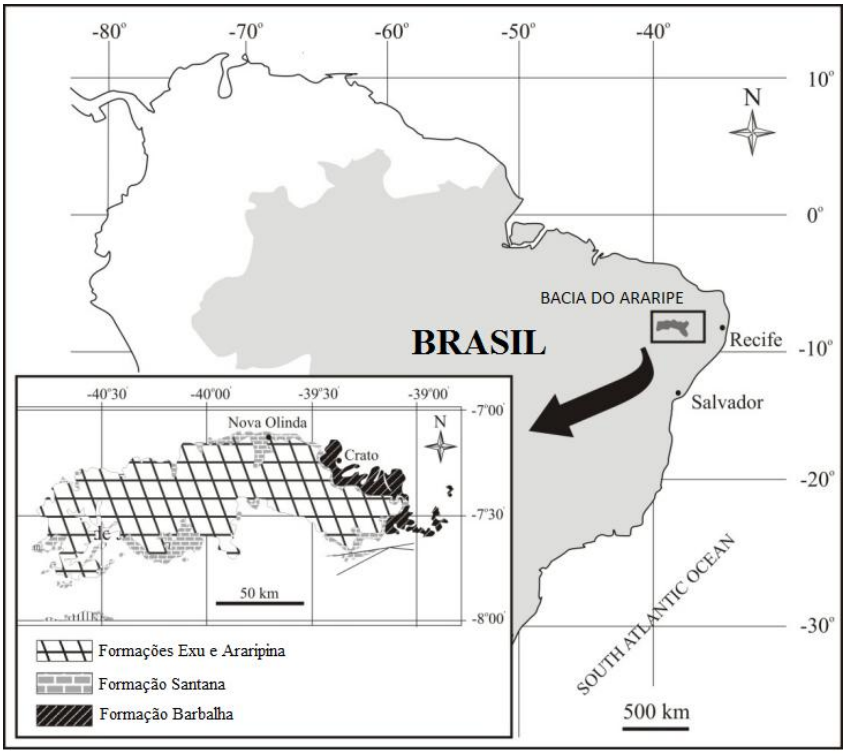

Figura 8. Mapa da Bacia do Araripe. (modificado de Ricardi-Branco e colaboradores[98]).

5.1.5.1. Coprólito de peixe carnívoro (A2622)

Coprólito proveniente de peixe carnívoro, encontrado da bacia do Araripe e identificado como pertencente ao gênero *Calamopleurus* ou *Cladocyclus*, grandes predadores encontrados em abundância nessa região[99]. Um coprólito enviado pelo pesquisador Dr. Paulo Souto da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), foi analisado, representado na figura 9.

Figura 9. Coprólito de peixe da Bacia do Araripe, datado do cretáceo.

5.1.6. Sítio Cortado

O Sítio Cortado esta localizado no Rio Grande do Sul, Brasil, nas coordenadas S 29º44’55’’; W 53º00’06’’ (fig 10). Foram encontrados na Sequência Santa Maria 1, na Cenozona Therapsida, da idade Ladiniana do Período Triássico (234,3 – 227,4 MA). Podem ser encontrados nesta cenozona, grupos de Cinodontes, Dicinodontes, Procolofonídeos, Rincossauros, Arcossauromorfos e Arcossauros, que assim, constituíam a fauna de terapsídeos do Triássico Médio do Sul do Brasil[100].

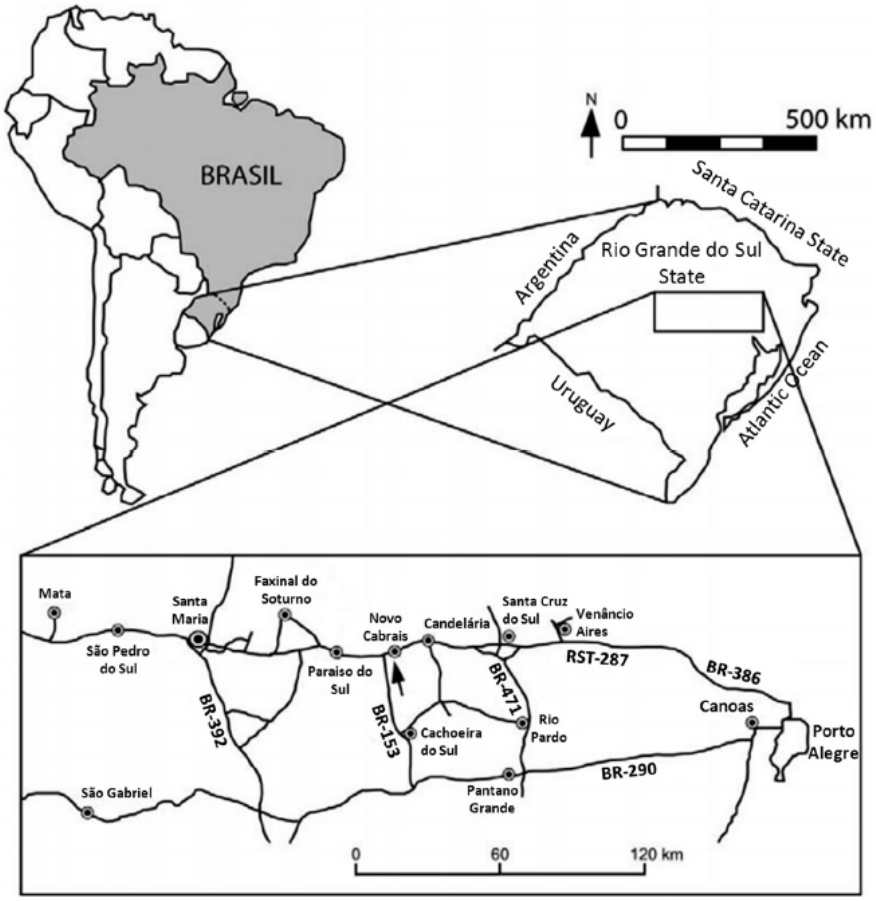

Figura 10. Mapa com a localização do Sítio Cortado, Rio Grande do Sul, Brasil (Schultz e Langer, 2007)[100].

5.1.6.1. Coprólito de cinodonte (A1578a)

Os cinodontes (cino = cão + odontos = dentes) são répteis mamaliformes[100] que surgiram no final do permiano[101]. Pertencem a um clado monofilético que deu origem aos mamíferos[102], e podem ser divididos em cinodontes mamalianos, que é a própria linhagem dos mamíferos, e cinodontes não-mamalianos, que são representados pelos répteis mamaliformes do grupo[100]. Quanto à alimentação, os cinodontes não-mamalianos podem ser carnívoros ou herbívoros, estes chamados de gonfodontes[100,103,104]. Um coprólito, enviado pelo pesquisador Átila da Rosa, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foi analisado nesse trabalho, representado na figura 11.

Figura 11. Coprólito mineralizado de cinodonte proveniente do Rio Grande do Sul, Brasil, datado do Triássico Médio.

5.1.6.2. Coprólito de dicinodonte (A1578b)

Os dicinodontes eram répteis de alimentação herbívora, que apresentavam mandíbula adaptada para movimentos de maceração, o que permitia triturar melhor os alimentos antes de engolir. Aluns autores sugerem que viviam em ambientes semiaquáticos[105] e tinham tamanhos que variavam desde muito pequeno, como roedores, até o tamanho de um hipopótamo[100,104]. O coprólito analisado nesse trabalho está representado na figura 12.

Figura 12. Coprólito mineralizado de dicinodonte proveniente do Rio Grande do Sul, Brasil, datado do Triássico Médio.

5.1.7. Mar Báltico

O mar do Báltico localiza-se no nordeste da Europa formado pelas costas dos países como a Dinamarca, Alemanha, Finlândia, Suécia, Estônia, Rússia, Letônia, Lituânia e Polônia (fig. 13). É uma região com grandes depósitos de âmbar, que aparecem nas costas desses países trazidos por tempestades e correntes[106].

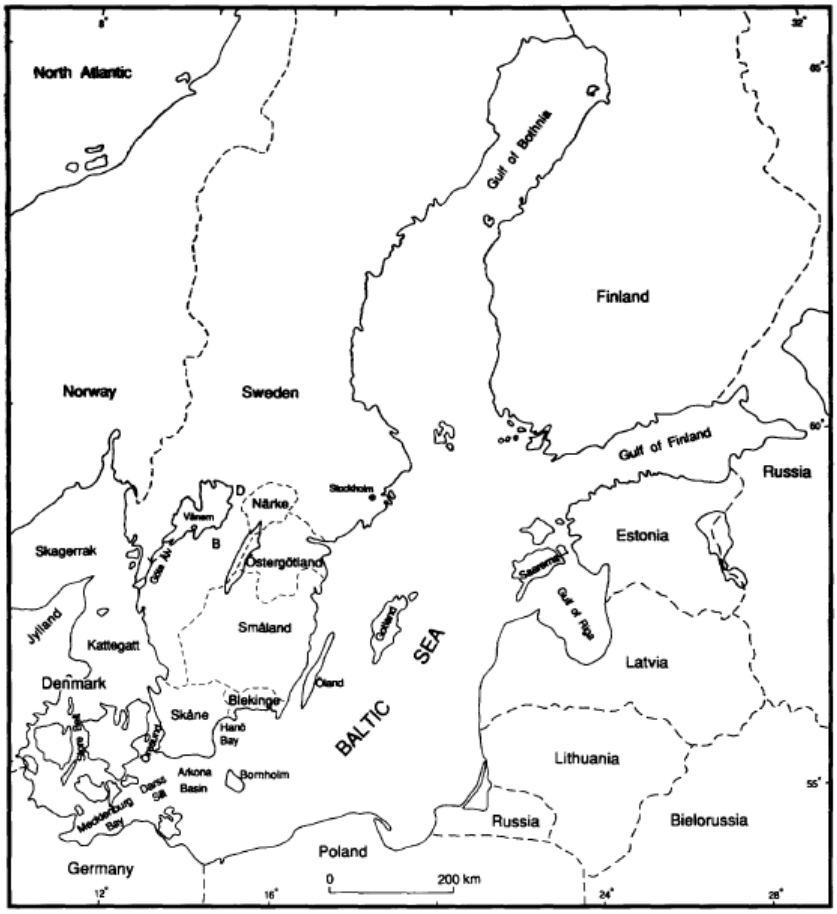

Figura 13. Mapa da região do mar Báltico[107].

5.1.7.1. Âmbar com Inclusão de Chironomidae

Os insetos da família Chironomidae apresentam uma grande diversidade habitando a maioria dos ambientes aquáticos, por isso, importantes bioindicadores de qualidade de água[108]. Então, seus achados em âmbar podem representar um paleoecossistema aquático estável[109]. Podem também ser parasitados por nematódeos da família Mermithidae, família esta que parasitam artrópodes, sendo mais comum em insetos. Ajudam, assim, a estabelecer o quão antiga é essa infecção se encontrada em material paleontológico. O inseto incluso no âmbar proposto a ser estudado nesse trabalho está representado na figura 14.

Figura 14. Âmbar Báltico contendo inclusão de Chironomidae datado do Cretáceo.

5.2. Análise Laboratorial de coprólitos

5.2.1. Análise macroscópica

Os coprólitos foram analisados macroscopicamente com o auxilio de lupa, nos aumentos que vão de 1x a 7,5x, no laboratório de paleoparasitologia da ENSP – Fiocruz, para examinar sua morfologia e buscar restos macroscópicos de alimentação em sua superfície, como sementes, pelos, penas, unhas, ossos e outras estruturas onde seja possível a identificação da origem do alimento ingerido.

5.2.2. Análise ao microscópio de luz

Para a análise do material (coprólito), é necessário processá-lo para sua visualização ao microscópio de luz. Três técnicas foram utilizadas nessa pesquisa, utilizando ácido clorídrico ou ondas de ultrassom para coprólitos mineralizados, e a reidratação com fosfato trissódico para coprólitos dessecados, como explicado abaixo.

5.2.2.1. Ácido clorídrico á 10%

Uma das técnicas para processar o coprólito mineralizado é com ácido clorídrico (HCl) a 10% para a dissociar os carbonatos e então com o uso de água destilada essa ação é interrompida para não haver perda de material orgânico, como sugerido por Jones[110]. Após esse tratamento, com o sedimento resultante, foram confeccionadas lâminas e analisadas ao microscópio de luz.

5.2.2.2. Aparelho de ultrassom

Outra técnica utilizada para esse tipo de material (mineralizado) é com o uso de um aparelho de ultrassom. Um fragmento de coprólito é colocado em tubo de vidro com fundo cônico, imerso em fosfato trissódico a 0,5%. O tubo é colocado dentro do aparelho que libera ondas de ultrassom que dissociam os minerais. Essas ondas são liberadas com repetições de 2 minutos até o coprólito apresentar um grau de dissolução que permita a sua análise.

5.2.2.3. Reidratação com fosfato trissódico

Fragmentos dos coprólitos dessecados foram imersos em fosfato trissódico á 0,5% por 72 horas, então homogeneizados e coados por gaze triplamente dobrada em um cálice de vidro com fundo cônico e sedimentado por 24 horas segundo a técnica de Lutz (1919)[111]. Porém, como as amostras de coprólitos dessecadas tinham muito pouco material e como o sedimento era bem fino, a etapa de coar em gaze triplamente dobrada foi retirada da técnica para um melhor aproveitamento do material.

5.2.3. Análise ao microscópio eletrônico de varredura

Para relacionarmos melhor as estruturas parasitárias de grupos evolutivamente próximos na atualidade com o material antigo analisado, para uma melhor visualização de sua morfologia e organização ultraestrutural, usamos a microscopia eletrônica de varredura. Nessa técnica, é necessária a lâmina contendo o achado, que então foi extraído por um corte feito na lamínula. O material foi colado em uma fita de carbono e fixado a um *stub*, para ser fotografado no microscópio eletrônico de varredura Quanta (FEI Company), no aumento em que melhor capturar a estrtura alvo. Esta análise foi feita no laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5.3. Análise Laboratorial de Âmbar

5.3.1. Análise ao microscópio de luz

Para analisar uma peça de âmbar ao microscópio de luz, foi necessário desbastá-lo em duas laterais opostas, com o auxílio de uma lixa metálica e lâminas cortantes, até ficar com a menor espessura possível, sem danificar o espécime, preferencialmente com 200 micrometros, para melhor visualização ao microscópio.

5.3.2. Análise ao microscópio eletrônico de transmissão

O âmbar foi lixado, com o auxilio de uma lixa de metal, até chegar próximo ao inseto. Então foi desbastado, com o uso de uma lâmina, ao redor do inseto para formar uma pirâmide, que assim, com a utilização do ultramicrótomo, seria feito cortes de 60 nm. Estes seriam contrastados com acetado de uranila (C4H6O6U 2(H2O)) a 5% e citrato de chumbo(C12H10O14Pb3) a 1% para serem analisados ao microscópio eletrônico de transmissão no laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

6. RESULTADOS

6.1. Análise parasitológica das amostras de animais extintos

Foram analisados um total de 32 amostras provenientes de 6 hospedeiros extintos diferentes (caprino, hiena, duas espécies de peixes, cinodonte e dicinodonte), com um total de 2.500 lâminas. Os resultados serão expostos abaixo de acordo com o hospedeiro.

6.1.1. Coprólito de caprino (A1100 – A1124)

As 25 amostras de cabra proveniente das Ilhas Baleáricas na Espanha, apresentam granulometria fina e de fácil dissociação. Algumas das amostras estavam em estado pulverizado. Para cada amostra foi analisada 20 lâminas, totalizando 500 lâminas analisadas.

6.1.1.1. Cisto de protozoário

Cisto nucleado de protozoário ainda não identificado, com medidas de 22x22um (Fig 15).

Diagnóstico: n=1

Figura 15. Cisto de protozoário em coprólito de caprino.

6.1.2. Coprólito de hiena (A2436, A2437)

Cada amostra de hiena possuíam 5 coprólitos de formato arredondado e estrutura sólida, totalizando 10 coprólitos com as duas amostras (A2436 e A2437). Apresentavam granulometria do sedimento fina, porém de difícil dissociação no processamento. Apenas a amostra A2437 apresentou resultado positivo para parasito. Foram processadas e analisadas 40 lâminas de cada coprólito de ambas as amostras, totalizando 400 lâminas analisadas.

6.1.2.1. Ovo não identificado

Ovo com formato ovóide, apresentando uma das extremidades mais afilada que a outra e medidas de 83,78 x 50,02 um (Fig. 16).

Diagnóstico: n=1

Localidade: Encontrado em coprólito de hiena extinta (*Crocuta crocuta spelea*) proveniente de caverna San Theodoro, Aquedolcci, Sicilia, Italia.

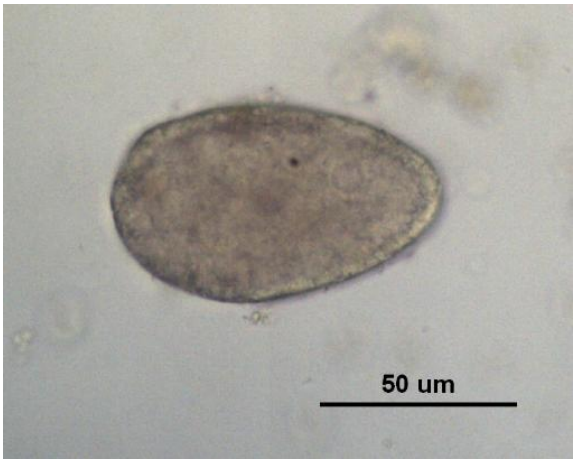

Figura 16. Ovo não identificado em coprólito de hiena.

6.1.3. Coprólito de hiena (A2742)

O coprólito de hiena proveniente da Itália na região de Toscana, apresentava superfície esbranquiçada com sedimento de granulometria fina e de fácil dissociação. Foram processadas e analisadas 100 lâminas desse material.

6.1.3.1. Ovo de Nematoda

Ovo com formato oval, casca espessa e rugosa, sem a presença de material embrionário visível, com medidas de 77,86 x 41,85 um (fig 17). A presença de características inespecíficas impossibilitou a identificação além da classe Nematoda.

Diagnóstico: n=1

Localidade: Encontrado em coprólito de hiena extinta (*Crocuta crocuta spelea*), localizado na Gruta de Santi, Monte Argentário, Grosseto, Italia.

Figura 17. Ovo de Nematoda em coprólito de hiena.

6.1.4. Coprólito de peixe (Mawsonidae) (A2314, A2315)

As duas amostras de coprólitos de peixe pertencentes ao gênero *Mawsonia*, provenientes da Unidade São Miguel dos Campos, na costa do Nordeste brasileiro, entre Sergipe e Alagoas, estão associadas a rochas e apresentam uma textura fina e de fácil dissociação da rocha, observado ao microscópio esterioscópio (lupa).

Foram analisadas 200 lâminas, sendo 100 de cada amostra. A amostra foi submetida a dois processos de preparação, pelo ácido clorídrico a 10% e pelo aparelho de ultrassom. Metade (50 lâminas de cada amostra) foi analisada para cada processamento.

Todas as lâminas analisadas foram negativas para parasitos.

6.1.5. Coprólito de peixe (A2622)

O coprólito proveniente da Bacia do Araripe, datada do Cretáceo, pertencente a um peixe de alimentação carnívora, apresenta a coloração esbranquiçada com textura do sedimento fina e de fácil dissociação observado ao microscópio estereoscópio (lupa).

A amostra foi submetida a dois processos de preparação, pelo ácido clorídrico a 10% e pelo aparelho de ultrassom. Foram analisadas 100 lâminas originárias de cada um dos processos, totalizando 200 lâminas.

Todas as lâminas analisadas foram negativas para parasito.

6.1.6. Coprólito de cinodonte (A1578a)

O coprólito de cinodonte, proveniente do sul do Brasil, apresenta formato cilíndrico com granulometria do sedimento grossa e de difícil dissociação. Foi processado com ácido clorídrico a 10% e analisado um total de 550 lâminas.

6.1.6.1. Ovo de ascarídeo

Ovo com formato esférico com medidas de 62,60 x 60,17 µm, com casca fina e superfície rugosa, apresentando conteúdo embrionário preservado (fig 18). Assemelha-se com as características dos ovos do grupo de ascarídeos, sendo colocado, então, neste grupo. Foi denominada uma nova espécie seguindo o gênero sugerido por Poinar e Boucot (2006)[62].

Filo: Nematoda (Rudolphi, 1808)

Ordem: Ascaridida (Skrjabin e Shulz, 1940)

Família: Ascarididae (Baird, 1853)

Gênero: *Ascarites* (Poinar e Boucot, 2006)[62]

Espécie: *rufferi* (Silva et al, 2014)[112]

Ascarites rufferi sp.n.(Silva et al, 2014)[112] (fig. 18)

Diagnostico: n=1

Etimologia: "*Ascarites*", para seguir ao gênero proposto por Poinar e Boucot (2006)[62], e "*rufferi*" como homenagem ao Sir Marc Armand Ruffer que foi o primeiro a registrar ovos de parasitos em material arqueológico.

Localidade: Parasito encontrado em coprólito de cinodonte, proveniente de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil (nas coordenadas S 29º44'55''; W 53º00'06''). Datado do Triássico Superior.

Figura 18. Ovo de ascarídeo em coprólito de cinodonte.

6.1.6.2. Ovo de oxiurídeo

O ovo encontrado tem formato elíptico com medidas de 113,51 x 77,08 µm, com duas camadas (fig. 19) e superfície lisa. Apresenta uma das extremidades afilada e a outra arredondada, possui massa embrionária visível, porém amorfa. Pela microscopia eletrônica pode-se observar a trama das camadas, que se apresenta de forma trançada e espessa (figura 20 – A e B). Foi descrito um novo gênero e uma nova espécie para este parasito.

Filo Nematoda (Rudolphi, 1808)

Ordem Oxyurida (Railliet, 1916)

Família Heteroxynematidae (Skrjabin e Shikhobalova, 1948)

Gênero *Paleoxyuris* (Hugot et al, 2014)[113]

Espécie *cockburni* (Hugot et al, 2014)[113]

Paleoxyuris cockburni gen.n., sp.n. (Hugo et al, 2014)[113] (Fig. 19)

Diagnóstico: n=1

Etimologia: *Paleoxyuris* - “paleo” significa antigo e “oxyuris”, representa um gênero da família Oxyuridae. O nome da espécie é uma homenagem ao criador da Associação de Paleopatologia, Aidan Cockburn.

Localidade: Encontrado em um coprólito de cinodonte, proveniente de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil (nas coordenadas S 29º44’55’’; W 53º00’06’’). Datado do Triássico Superior.

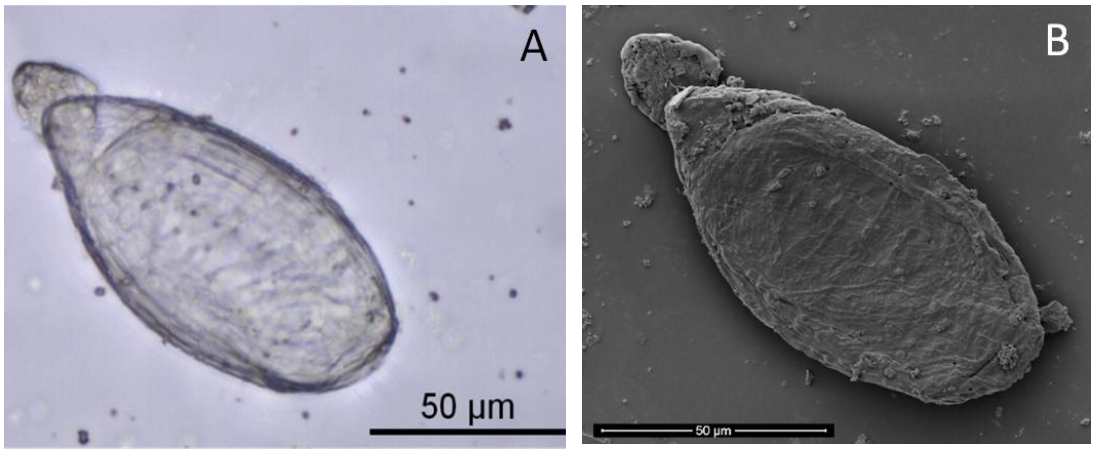

Figura 19. Imagem do ovo encontrado no coprólito de cinodonte. A, imagem obtida por microscopia de luz; B, por microscopia eletrônica de varredura.

Pela microscopia eletrônica podemos observar na figura 20 (A e B) a estrutura ornamentada da membrana do oxiúrideo. Nota-se que as camadas se apresentam de forma trançada e espessa.

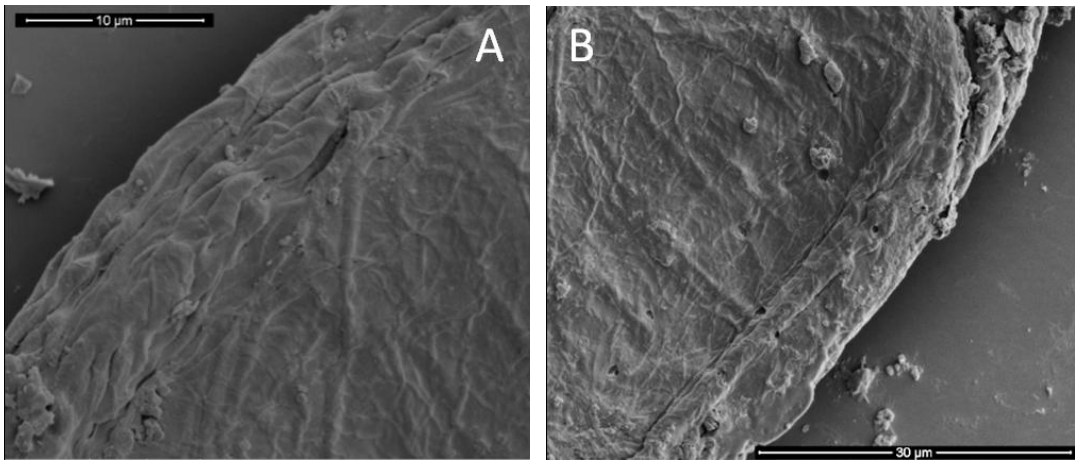

Figura 20. Imagens da superfície lateral do ovo encontrado no cinodonte (A e B).

6.1.7. Coprólito de Dicinodonte (A1578b)

O coprólito proveniente da região sul do Brasil, apresenta um formato arredondado e superfície lisa. Material de difícil dissociação. Foram processadas e analisadas 550 lâminas.

6.1.7.1. Ovo de nematóide

Ovo com formato arredondado, casca fina e superfície lisa, com medidas de 73,15 x 46,15 µm (fig. 21). Apresenta conteúdo embrionário visível em seu interior, o que pode ser uma larva. Até o momento só foi possível identificá-lo como nematóide, devido à falta de estruturas mais características para uma identificação precisa.

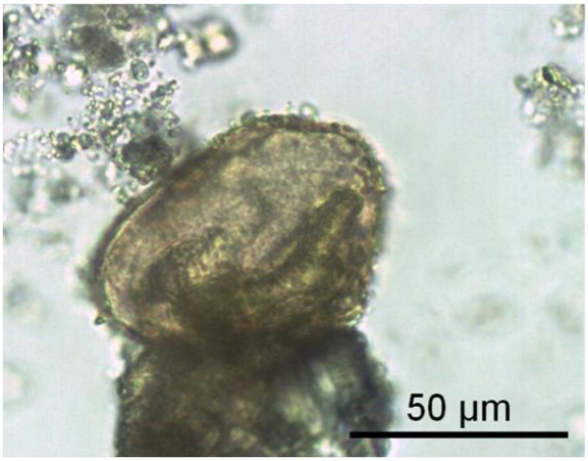

Figura 21. Ovo de nematoide encontrado no coprólito de dicinodonte.

6.1.8. Âmbar com inclusão de Chironomidae

O inseto foi identificado por um entomólogo qualificado como exemplar da família Chironomidae. A peça de âmbar contendo a inclusão do espécimen foi analisada primariamente ao microscópio estereoscópio, para uma visualização mais ampla do que continha em seu interior. Foi identificada a presença de uma folha e um segmento de outra espécie de inseto.

Não foi obtido nenhum resultado, pois as técnicas previstas para serem realizadas nesse material não puderam ser feitas.

7. DISCUSSÃO

Pesquisas a cerca de vestígios de microfósseis em animais extintos, tanto em paleodieta quanto na evidência de parasitos, são escassas. Talvez pelas limitações impostas pela própria idade do material e/ou os processos tafonômicos pelos quais foram submetidos, os quais não favoreceram sua preservação. Porém, com as novas técnicas de recuperação desses materiais e a persistência dos pesquisadores em encontrar evidências e respostas para a origem do parasitismo em diversos grupos, fazem essa ciência estar em constante expansão.

A maioria das amostras que foram analisadas para essa dissertação apresentou resultado negativo, mesmo em um grande esforço de busca com 2.500 lâminas analisadas. O motivo pode ter sido o sugerido anteriormente, ou seja, a não preservação das estruturas, pelo simples fato do animal não estar infectado por nenhum parasito ou ter eliminado uma quantidade muito pequena de formas parasitárias, impossíveis de serem recuperadas nas análises microscópicas, ou devido a elementos inerentes a técnica com ácido.

Embora tenha sido possível identificar o inseto no fragmento de âmbar (Identificação feita pelo pesquisador Rubens Melo), sua análise para parasitos não pode ser feita pela falta de material, só recentemente importado. Os cortes com facas especializadas para microscopia eletrônica estão no laboratório Herta Meyer, no Instituto de Biofísica ICB, UFRJ, ainda aguardando análise.

Já para as amostras positivas, os ovos de parasitos encontrados não possuem características iguais aos encontrados em outras análises no laboratório de Paleoparasitologia (ENSP/Fiocruz) que ocorrem concomitantes às dos animais extintos, porém preservam a morfologia básica que os colocam nas suas respectivas classificações. Essa observação é importante para evitar suspeitas de contaminação das amostras.

Deve-se considerar a impossibilidade de cumprir todos os requisitos para a descrição de novas espécies por não descrevermos o parasito adulto, e os vestígios parasitários encontrados serem apenas dos ovos. Porém dadas as circunstâncias do material analisado, como idade muito antiga e a restrição por ter sido recuperado

somente o coprólito do animal, a descrição foi feita a partir dos dados que puderam ser obtidos.

Para melhor discussão dos resultados positivos, estas serão separadas por hospedeiro.

7.1. Caprino

Das 24 amostras de cabra proveniente das ilhas Baleáricas localizadas no mar mediterrâneo, apenas uma apresentou resultado parasitológico. Outros trabalhos com animais extintos obtiveram resultados positivos para cisto de protozoários[29,55,62], o que mostra a potencialidade de se encontrar esses vestígios em material arqueológico pelas técnicas existentes.

O encontro de um cisto nucleado em um dos coprólitos representa a presença de protozoários em cabras desde a época do Pleistoceno. Como existe infecção em diversos grupos de vertebrados em dias atuais, inclusive em cabras[117], isso mostra o sucesso da relação parasito-hospedeiro por protozoários, principalmente no grupo dos ruminantes.

A identificação do cisto de protozoário não foi possível, devido à preservação do material e à falta de características mais especificas.

7.2. Hiena (*Crocuta crocuta spelea*)

Duas amostras de hiena (*Crocuta crocuta spelea*) enviadas pelo Dr. Fábio Parenti, pertencentes a duas localidades da Itália, uma da Sicília e outra da região da Toscana, foram positivas para parasito. Porém esses ovos não apresentaram uma boa preservação, dificultando a identificação. Portanto apenas um dos ovos foi identificado como do grupo nematoda.

Já foram identificados diversos parasitos do grupo nematoda em hienas viventes como *Ancylostoma* sp., *Toxocaris* sp., *Cylicospirura* sp., *Aelurostrongylus* sp., *Nematodirus* sp.[114,115]. Porém em nenhum desses foi encontrado semelhança nas suas características que justificasse incluir o ovo encontrado em um desses gêneros.

Outros parasitos são encontrados em hienas atuais, como o *Spirometra* sp., que apresenta uma morfologia e membrana semelhante ao ovo encontrado na região da Sicília. Porém as medidas entre os ovos recuperados da hiena extinta são maiores do que os ovos desse gênero, assemelhando mais ao tamanho do gênero *Paragonimus*. Apesar de pertencerem a um gênero que não é encontrado nesse hospedeiro, há evidências de parasitismo em outros grupos filogeneticamente próximos da família Hyaeniadae[116].

É possível especular-se sobre a extinção de uma espécie de parasito em hospedeiro também extinto, embora nas espécies atuais de hospedeiro possam ser encontrados parasitos a ela relacionados. Isto poderia ter ocorrido tanto a uma espécie de nematóide como a espécies de trematódeos.

Entretanto, esse achado é uma evidência de parasitismo por grupos diversos em hienas na Europa sugerindo sua circulação nessa espécie na época do Pleistoceno. Pesquisas a cerca de parasitismo em hienas da região italiana ainda estão em curso para elucidar melhor essa relação parasitária.

7.3. Cinodonte

O coprólito de cinodonte analisado foi recuperado do sítio Cortado, da Formação Santa Maria, da Cenozona Therapsida pelo paleontólogo Dr. Átila da Rosa. Neste local são encontradas cinco espécies de cinodonte, *Massetognathus ochagaviae*; *Chiniquodon theotonicus*; *Traversodon stahleckeri*; *Luangwa sudamericana*; *Protheriodon estudianti*. Dentre estes, *C. theotonicus* e *P. estudianti* apresentam dentição própria de alimentação carnívora[100], já as outras três espécies, *M. ochagaviae, T. stahleckeri*, as duas espécies com representação fóssil mais abundante no sítio, e *L. sudamericana* são pertencentes a família Traversodontidae, caracterizada por sua diversificada dentição adaptada para alimentação herbívora[118].

Como todos os hospedeiros de oxiurídeos apresentam uma alimentação herbívora ou com o consumo de grande quantidade de celulose, presume-se que a espécie de cinodonte infectado pelo ovo encontrado deva ser herbívora. Portanto, é possível dizer que a família Traversodontidae são os hospedeiros mais prováveis.

No coprólito de cinodonte foram encontrados dois ovos de parasitos com características distintas, pertencentes a espécies diferentes. Um desses achados pode ser identificado como ascarídeo segundo a descrição feita por O'Lorcain e Holland[119], que descreve o ovo de ascarídeo com uma casca externa mamilonada, cor castanho-amarelada, formato oval ou esférico, com medidas aproximadas de 60 x 45 µm. Assim, foi possível identificar o ovo achado como pertencente ao grupo dos ascarídeos.

É possível, apenas pelas características morfológicas do ovo de nematódeo diagnosticar de maneira confiável grupos taxonômicos tanto de família, gênero ou até mesmo espécie[120].

Poinar Jr. e Boucot[62] descreveram um novo gênero e espécie de ascarídeo em um *Iguanodon* datado do período Cretáceo, nomeado de *Ascarites priscus*. Pela semelhança morfológica entre esta e a espécie encontrada no presente trabalho, e por terem ambos sido descritos em animais extintos, adotamos o mesmo gênero "*Ascarites*". Como homenagem ao Sir Marc Armand Ruffer, um dos primeiros a descrever ovos de parasito em material arqueológico foi sugerido o nome de *Ascarites rufferi* para a espécie de ascarídeo encontrada[112].

Muitos mamíferos atualmente, como porcos, canídeos, equinos, felinos, roedores e primatas, assim como o homem, são hospedeiros de várias espécies de ascarídeos[121]. O cinodonte, réptil mamaliforme que representa a transição entre réptil e mamífero, demonstra como a infecção parasitária desse grupo de parasitos precede o surgimento doa mamíferos. Assim como se pode constatar que a sua morfologia básica foi mantida ao longo dos anos.

Quando parasitos são transmitidos por contato próximo, são normalmente específicos para uma única espécies hospedeiras[121]. Assim, parasitos com ciclos de vida diretos, como os oxiurídeos, que ocorre em hospedeiros que manifestam comportamentos que aumentam a probabilidade de auto-infecção parecem ser capazes de manter essa associação por longos períodos de tempo. Uma conseqüência evolutiva dessa especificidade do hospedeiro é uma associação de longa data entre o hospedeiro e o parasito através do tempo.

Pelas características básicas do segundo ovo encontrado no coprólito de cinodonte, formato elipsoide, assimétrico, sendo mais arredondado em uma das

extremidades e afilado na outra, apresentando um plug polar, foi possível descrevê-lo na família Heteroxynematide[122]. Pois se compararmos com as espécies de Oxyurida existentes, os gêneros *Syphasciella* e *Heteroxynema*, apresentam um plug polar, e tem medidas aproximadas do espécimen encontrado. Ambos são classificados na família Heteroxynematidae, o que permitiu descrever uma nova espécie, *Paleoxyuris Cockburni* nessa família[115].

Seguindo a forma como foi descrito o ascarídeo encontrado no mesmo coprólito, foi determinado como nova espécie. Portanto, como Poinar e Boucot[62], foi criado um novo gênero, "*Paleoxyuris*" e como homenagem ao Aiden Cockburn a espécie foi nomeada de "*Paleoxyuris Cockburni*".

7.4. Dicinodonte

O coprólito analisado de dicinodonte foi recuperado do sítio cortado, no Rio Grande do sul, Brasil, na Formação Santa Maria, também pelo paleontólogo Dr. Átila da Rosa. Na Cenozona Therapsida, onde o coprólito foi coletado, encontravam-se vestígios fósseis de duas espécies de dicinodonte, *Stahleckeria potens* e *Dinodontosaurus pedroanum*. Como a espécie mais abundante nesse sítio era de *D. pedroanum*, há maiores probabilidades de o coprólito pertencer este animal.

O ovo encontrado foi identificado como do grupo Nematoda, por conter morfologia e características genéricas da classe, como casca delgada e fina, e apresentar uma provável larva no seu interior[118]. Porém não foi possível uma classificação mais especificas devido à falta de características mais particulares.

Com os resultados que foram apresentados pode-se constatar que mesmo com dificuldades e limitações é possível encontrar parasitos em animais extintos de diferentes épocas, das mais recentes às mais antigas, usando diferentes técnicas de recuperação do material, mesmo que tenha suas dificuldades e limitações. E com esses achados é possível ir preenchendo as diversas lacunas existentes entre o surgimento de relações parasitarias em vários grupos zoológicos até os dias atuais. Como um dos achados mais antigos até hoje de um grupo de helmintos que atualmente tem caráter zoonótico. O que mostra a contribuição real desses resultados para a compreensão da linha evolutiva da relação parasito-hospedeiro-ambiente.

8. CONCLUSÕES

- A identificação de helmintos em coprólitos de animais extintos é possível mesmo com datações do material em milhões de anos.

- Parasitos como os ascarídeos e oxiurídeos estão presentes em animais vertebrados há pelo menos 240 milhões de anos.

- Protozoários estavam presentes em caprinos endêmicos das Ilhas Baleáricas, Espanha. Assim como helmintos em hienas da região européia.

- Ovos de parasitos podem maner sua morfologia através dos milhões de anos que separam os seus hospedeiros extintos dos seus representantes atuais filogeneticamente próximos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araújo A, Jansen AM, Bouchet F, Reinhard KJ, Ferreira LF. Parasitism, the Diversity of life, and Paleoparasitology. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(1): 5-11.

2. Ferreira LF. O Fenômeno Parasitismo. Rev Soc Bras Med Trop. 1973; 7(4): 261-277.

3. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U. Subsídios para a paleoparasitologia do Brasil. I. Parasitos encontrados em coprólitos no município de Unaí, MG. Resumos do IV Congresso Brasileiro de Parasitologia. 1979; 56.

4. Ruffer MA. Remarks on the histology and pathological anatomy of Egyptian mummies. Cairo Scient J. 1910; 4(40): 1-5.

5. Araújo A, Reinhard KJ, Ferreira LF, Gardner SL. Parasites as probes for prehistoric human migrations? Trends Parasitol. 2008; 24(3): 112-115.

6. Leles D, Araújo A, Vicente ACP, Iñiguez AM. Molecular diagnosis of ascariasis from human feces and description of a new *Ascaris* sp. genotype in Brazil. Vet Parasitol. 2009; 163: 167 – 170.

7. Leles D, Reinhard KJ, Fugassa M, Ferreira LF, Iñiguez AM, Araújo A. A parasitological paradox: why is ascarid infection so rare in the prehistoric Americas? J Archaeol Sci. 2010; 37: 1510-1520.

8. Lima V, Iñiguez A, Otsuki K, Ferreira LF, Araújo A, Vicente A, et al. Chagas disease by *Trypanosoma cruzi* lineage I in a hunter-gatherer ancient population in Brazil. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 1001 – 1002.

9. Ferreira LF, Jansen AM, Araujo A. Chagas disease in prehistory. An. Acad. Bras. Ciênc. 2011; 83(3): 1041-44.

10. Sianto L, Chame M, Silva CSP, Gonçalves MLC, Reinhard K, Fugassa MH, et al. Animal helminths in human archaeological remains: a review. Rev Inst Med Trop. 2009; 51: 119 - 130.

11. Eames AJ. Report on ground sloth coprolite from Dona Ana County, New Mexico. Am J Sci. 1930; 20: 353-356.

12. Schmidt G, Duszynski D, Martin P. Parasites of the extinct shasta ground sloth *Nothrotheriops shastensis*, in Rampart Cave, Arizona. J Parasitol. 1993; 78: 811-816.

13. Poinar Jr G, Boucot AJ. Evidence of intestinal parasite of dinosaurs. Parasitol. 2006; 133: 245-249.

14. Ferreira LF, Araújo A, Duarte AN. Nematode larvae in fossilized animal coprolites from lower and middle pleistocene sites, central Italy. J Parasitol. 1993; 79: 440 – 442.

15. Duarte AN, Verde M, Ubilla M, Araújo A. Note on parasite eggs in mineralized carnivora coprolites from the upper Pleistocene (Sopas Formation), Uruguay. Paleopathol News. 1999; 107: 6 – 8.

16. Poinar Jr G. Description of an early Cretaceous termite (Isoptera: Kalotermitidae) and its associated intestinal protozoa, with comments on their co-evolution. Parasit vectors. 2009; 2: 1-17.

17. Poinar Jr G. *Plasmodium dominicana* n. sp. (Plasmodiidae: Haemospororida) from Tertiary Dominican amber. Syst Parasitol. 2005; 61: 47-52.

18. Souza SMF, Carvalho DM, Lessa A. Paleoepidemiology: is there a case to answer? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98: 21-27.

19. Waldron T. Counting the Dead.The Epidemiology of Skeketal Populations. Chinchester: Willey & Sons. 1994; 103p.

20. Souto P. Coprólitos do Brasil: Principais ocorrências e estudo. Rio de Janeiro: Publit; 2008.

21. Araújo A, Ferreira LF. Paleoparasitology and the Antiquity of Human Host-parasite Relationships.Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000; 95(1): 89-93.

22. Bouchet F, Guidon N, Dittmar K, Harter S, Ferreira LF, Chaves SM, et al. Parasite remains in Archaeological Sites. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003; 98(1): 47-52.

23. Szidat L. Uber die Erhaltungsfähigkeit von Helmimtaheneirm in Vor-und frühgeschichlichen Moorleichen. Z Parasitenkd. 1944; 13: 265 -274.

24. Araújo A, Confalonieri U, Ferreira LF.Oxyurid infestations in small animals from 9,000 B.P. in Brazil. Paleopathol News. 1980; 31: 13-4.

25. Araújo A, Ferreira LF, Confalonieri U. A contribution to the study of helminthes findings in archaeological material in Brazil. Rev Bras Biol. 1981; 41: 873-881.

26. Confalonieri U, Araújo A, Ferreira LF. Subsídios para a paleoparasitologia do Brasil - III. Sobre a infestação de *Trichuris trichiura* (L) no período colonial brasileiro. VI Congresso Brasileiro de Parasitologia. 1981; 138. (Resumo)

27. Ferreira LF, Araújo A, Confalonieri U. The finding of helminthes eggs in a Brazilian mummy. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983; 77(1): 65-7.

28. Bouchet F, Harter S, Paicheler JC, Araújo A, Ferreira LF. First Recovery of *Schistosoma mansoni* Eggs from a Latrine in Europe (15–16th Centuries). J Parasitol. 2002 ; 88(2) : 404-405.

29. Fugassa M, Sardella NH, Taglioretti V, Reinhard KJ, Araújo A. Eimeriid Oocysts from Archaeological Samples in Patagonia, Argentina. J Parasitol. 2008; 94(6): 1418-1420.

30. Reinhard K, Fink TM, Skiles J.A case of megacolon in Rio Grande Valley as a possible case of chagas disease. Mem Int Oswaldo Cruz. 2003; 98(1): 165-172.

31. Araújo A, Ferreira, LF. Homens e parasitos: a contribuição da paleoparasitologia para a questão da origem do homem na América. Rev USP. 1997; 34: 58-70.

32. Araújo A, Ferreira LF. Oxiuríase e migrações pré-históricas. História, Ciência, Saúde – Manguinhos. 1995; 2(1): 99-109.

33. Gonçalves MLC, Araujo A, Ferreira LF. Human intestinal parasites inthe past: new findings and a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98 (Suppl 1):103-118.

34. Rocha GC, Harter S, Le Bailly M, Araújo A, Ferreira LF, Serra-Freire, NM, et al. Paleoparasitological remains revealed by seven historic contexts from Place d Armes, Namur, Belgium. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101 (Suppl 2):S43-S52.

35. Sianto L, Chame M, Silva CSP, Gonçalves MLC, Reinhard K, Fugassa M, et al. Animal helminthes in human archaeological remains: a review of zoonoses in the past. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2009; 51(3): 119-130.

36. OMS - Organização Mundial de Saúde. Veterinary public health. 2014 [Acessado em 10 de janeiro de 2014]; Disponível em: <http://www.who.int/zoonoses/vph/en/>.

37. Fugassa M. Enteroparasitosis em poblaciones cazadoras-recolectoras de Patagonia Austral [tese]. Universidad Nacinal de Mar del Plata; 2006.

38. Le Bailly M. Evolution de la relation hôte/parasite dans les systems lacustresnordalpins au Néolithique (3900-2900 BC), etnouvellesdonnéesdans la detection des paléoantigènes de Protozoa [tese]. Universite de Reims Champagne-Ardenne; 2005.

39. Sianto L. Parasitismo em Populações Pré-Colombianas: helmintos de animais em coprólitos de origem humana do Parque Nacional Serra da Capivara, PI, Brasil [tese]. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. 2009.

40. Beltrame MO, Fugassa MH, Sardella NH. First Paleoparasitological Results From Late Holocene in Patagonian Coprolites. J Parasitol. 2010; 96(3): 648-51.

41. Sianto L, Teixeira-Santos I, Chame M, Chaves SM, Souza SM, Ferreira LF, et al. Eating lizards: a millenary habit evidenced by paleoparasitology. BMC Res Notes. 2012; 5: 586.

42. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9.000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2004; 101(7): 2034-9.

43. Salgado-LabouriauML. Contribuição à palinologia dos cerrados. Rio de Janeiro: Acad Bras Ciên; 1973.

44. Salgado-Labouriau, ML. Reconstruindo as comunidades vegetais e o clima no passado. Humanidades. 2001; 48(1): 24-40.

45. Cordeiro SH. Palinologia de sedimentos da lagoa dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil. [dissertação]. UFRGS; 1991.

46. Behling H. Late quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. Amsterdam: Rev Palaeobot Palyno. 1998; 99: 143-156.

47. Freitas FO. Uso de Grãos de Amido na Identificação e Análise de Materiais Arqueológicos. Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa. 2002; 23.

48. Bauermann SG. Análises palinológicas e evolução paleovegetacional das turfeiras de Águas Claras e Barrocadas, Planície Costeira do Rio Grande do Sul, Brasil. [tese]. UFRGS; 2003.

49. Shahack-Gross R. Herbivorous livestock dung: formation, taphonomy, methods for identification, and archaeological significance. J Archaeol Sci. 2001; 38: 205 – 218.

50. Chaves SAM, Reinhard K. Paleopharmacology and Pollen: Theory, Method, and Application. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003 ; 98(1) : 207-211.

51. Teixeira-Santos I. Resíduos alimentares, infecções parasitárias e evidência do uso de plantas medicinais em grupos pré-históricos das Américas. [dissertação]. Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca; 2010.

52. Renault B.; Bertrand CE. 1895, *Apud* Souto PRF. Estudo de Microinclusões em coprólitos. Fundamentos da Paleoparasitologia. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2011.

53. Eames AJ. Report on ground sloth coprolite from Dona Ana County, New Mexico. Am J Sci.1930; 20: 353-356.

54. Ringuelet R. Restos de probableshuevos de nematodes en el estiercol del edentado extinguido *Mylodon listai* (Ameghino). Ameghiniana. 1957.

55. Schmidt G, Duszynski D, Martin P. Parasites of the extinct shasta ground sloth *Nothrotheriops shastensis,* in Rampart Cave, Arizona. J Parasitol. 1992; 78: 811-816.

56. Poinar H, Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, et al. Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. Sci. 1998; 281(5375): 402-6406.

57. Backwell L, Pickering R, Brothwell D, Berger L, Witcomb M, Martill D, et al. Probable human hair found in a fossil hyaena coprolite from Gladysvale cave, South África. J Archaeol Sci. 2009; 36(6) : 1269-76.

58. Marcolino PC, Isaias RMS, Cozzuol MA, Cartelle C, Dantas MAT. Diet of Palaeolama major (Camelidae) of Bahia, Brazil, inferred from coprolites. Quatern Int 2012; 278: 81-86.

59. Chin K, Tokaryk TT, Erickson GM, Calk LC. A king-sized theropod coprolite. Nature. 1998; 393:680-682.

60. Dentzien-Dias PC, Figueiredo AEQ, Horn B, Cisneros JC, Shultz CL. Paleobiology of a unique vertebrate coprolites concentration from Rio do Rasto Formation (Middle/Upper Permian), Paraná Basin, Brazil. J S Am Earth Sci. 2012; 40: 53-62.

61. Chin K. Remarkable Preservation of undigested Muscle Tissue within a Late Cretaceous Tyrannosaurid Coprolite from Alberta, Canadá. Palaios. 2003; 18: 286-294.

62. PoinarJr G, Boucot AJ. Evidence of intestinal parasite of dinosaurs. Parasitol.2006; 133: 245-249.

63. Wolff EDS, Salisbury SW, Horner JR, Varricchio DJ. Common Avian Infection Plagued the Tyrant Dinosaurs. Plos one. 2009; 4(9).

64. Sharma N, Kar RK, Agarwal A, Kar R. Fungi in dinosaurian (Isisaurus) coprolites from the Lameta Formation (Maastrichtian) and its reflection on food habit and environment. Micropaleontol. 2005; 51: 73-82.

65. Gosh P, Bhattacharya SK, Sahni A, Kar RK, Mohabey DM, Ambwani K. Dinosaur coprolites from the Late Cretaceous (Maastrichtian) Lameta Formation of India: isotopic and other markers suggesting a C3 plant diet. Cretaceous Res. 2003; 24: 743-750.

66. Wood JR, Wilmshurst JM, Rawlence NJ, Bonner KI, Worthy TH, Kinsella JM, et al. A Megafauna's Microfauna: Gastrointestinal Parasites of New Zealand's Extinct Moa (Aves: Dinornithiformes). Plos one. 2013; 8(2).

67. Wood J, Rawlence NJ, Rogers GM, Austin JJ, Worthy TH, Cooper A. Coprolite deposits revel the diet and ecology of the extinct New Zealand megaherbivore moa (Aves, Dinornithiformes). Quaternary Sci Rev. 2008; 27(27): 2593-2602.

68. Nobre PH, Carvalho IS, Vasconselos FM, Souto PR. Feeding behavior of the Gondwanic Crocodylomorpha *Mariliasuchus amarali* from the Upper Cretaceous Bauru Basin, Brazil. Gondwana Res. 2008; 13: 139 – 145.

69. Welker F, Duijm E, Gaag KJ, Geel B, Knijff P, Leeuwen J, et al. Analysis of coprolites from the extinct mountain goat *Myotragus balearicus*. Quaternary Res. 2014; 81: 106-116.

70. Dentzien-Dias PC, Poinar Jr G, Figueiredo AEQ, Pacheco ACL, Horn BLD, Shultz CL. Tapeworm Eggs in a 270 Million-Year-Old Shark Coprolite. Plos one. 2013 ; 8(1).

71. Beltrame OM, Fugassa MH, Sardella NH, Civalero MT, Aschero C. Raptor pellets as zooarchaeological material for paleoparasitological studies in Patagonia. J Archaeol Sci. 2011; 38: 1511-15.

72. Petit G. Skin nodules in fóssil fishes from Monte Bolca (Eocene, Northern Italy). Geodiversitas. 2010; 32(1): 157-163.

73. Brazil RP, Andrade-Filho JD. Artrópodes e Parasitos encontrados em âmbar. P-161-169 in Ferreira LF, Reinhard KJ, Araújo A, editores. Fundamentos da Paleoparasitologia. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2011.

74. Devries PJ, Poinar GO. Ancient butterfly – ant symbiosis : direct evidence from Dominican amber. Proc R Soc Lond B. 1997 ; 264 : 1137-1140.

75. Kogan ME, PoinarJr G.New Fossil *Stylops* (Strepsiptera: Stylopidae) from Dominican Amber. Neotrop Entomol. 2010; 39(2).

76. Poinar Jr G. Description of an early Cretaceous termite (Isoptera: Kalotermitidae) and its associated intestinal protozoa, with comments on their co-evolution. Parasit vectors. 2009; 2: 1-17.

77. PoinarJr GO. Descriptiom of na early Cretaceous térmites (Isoptera: Kalotermitidae) and its associated intestinal protozoa, with comments on their co-evolution. Parasit Vectors. 2009, 2(12)

78. Lewis RE, Grimaldi D. A pulicid Flea in Miocene Amber from the Dominican Republic (Insecta: Siphonaptera: Pulicidae). Am Mus Nat Hist. 1997; 3205.

79. Zavortink TJ, PoinarJr G. Anopheles (Nyssorhynchus) dominicanus sp. n. (Diptera: Culicidae) from Dominican Amber. Entomol Soc Am. 2000; 93(6).

80. Poinar Jr G. *Lutzomyia adiketis* sp. n. (Diptera: Phlebotomidae), a vector of *Paleoleishmania neotropicum* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in Dominican Amber. Parasit Vectors. 2008; 1(22).

81. Poinar Jr G, Poinar R. Fossil evidence of insect pathogens. J invertebr Pathol. 2005; 89: 243-250.

82. Poinar Jr GO, Poinar R. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: Kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. Protist. 2004, 155: 305–310.

83. PoinarJr G. Early Cretaceous trypanosomatids associated with fossil sand fly larvae in Burmese amber. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(5): 635-637.

84. Poinar Jr G. *Triatoma dominicana* sp. n. (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), and *Trypanosoma antiquus* sp. n. (Stercoraria: Trypanosomatidae), the First Fossil Evidence of a Triatomine-Trypanosomatid Vector Association. Vector Borne zoonotic dis. 2005, 5(1).

85. Poinar Jr G, Buckley R. Nematode (Nematoda: Mermithidae) and Hairworm (Nematomorpha: Chordodidae) parasites in Early Cretaceous amber. J Invertebr Pathol. 2006; 93: 36-41.

86. Encinas JA, Alcover JA. El Jaciment Fossilífer de la cova estreta (pollença). Endins. 1997; 21: 83-92.

87. Welker F, duijm E, Gaag KJ, Geel B, Kniff P, Leeuwen J. Analysis of coprolites from the extinct mountain goat *Myotragus balearicus*. Quaternary Res. 2014; 81(1): 106-116.

88. Bover P, Alcover JÁ. Understanding late quaternary extintions: the case of *Myotragus balearicus*. J Biogeogr. 2003; 30:771-781.

89. Lanfredini AM, Freguglia M, Bernardini F, Boschian G, Cavanna C, Crezzini J et al. Nuove ricerche alla Grotta dei Santi (Monte Argentario, Grosseto). Nono Incontrodi Studi, Preistoria e Protostoria in Etruria. 2008.

90. Sardella R, Petrucci M. The earliest Middle Pleistocene Crocutacrocuta (Erxleben, 1777) at Casal Selce (Rome, Italy). Quatern Int. 2012; 267: 103-110.

91. Varela S, Lobo JM, Rodriguez J, Batra P. Were the Late pleistocene climatic changes responsible for the disappearance of the European spotterd hyena populations? Hindcasting a species geographic distribution across time. Quatern Sci Rev. 29, 2027-2035. 2010

92. Mangano G. An exclusively hyena-collected bone assemblage in the Late Pleistocene of Sicily: taphonomy and stratigraphic context of the large mammal remains from San Teodoro Cave (North-Eastern Sicily, Italy), J Archaeol Sci. 2011; 38: 3584-95.

93. Gallo V, Carvalho MSS, Santos HRS. New occurrence of Mawsoniidae (Sarcopterygii, Actinistia) in the Morro do Chaves Formation, Lower Cretaceous of the Sergipe-Alagoas Basin, Northeastern Brazil. Bol Mus Para Emílio Goeldi Ciênc Nat. 2010; 5: 195-205.

94. Gallo V, Coelho PM. First occurrence of aulopiform fish in the Barremian of the Sergipe-Alagoas Basin, northeastern Brazil. P-351-371 in Arratia G, Shultze HP, Wilson MVH, editores. Mesozoic Fishes 4 – Homology and Phylogeny. Munchen, Dr. Friederich Pfeil, 2008.

95. Figueiredo FJ. A new clupeiform fish from the Lower Cretaceous (Barremian) of Sergipe-Alagoas Basin, Northeastern Brazil. J Vertebr Paleontol. 2009; 29(4): 993-1005.

96. Assine M. Análise estratigrafica da bacia do araripe, nordeste do Brasil. Rev Brasil Geociênc. 1992; 22(3): 289-300.

97. Campos HBN. Arcossauros da Bacia do Araripe: Uma revisão. Rev Elet Lab Arqueol Paleontol UEPB. 2011; 1(2).

98. Ricardi-Branco F, Torres M, Tavares SS, Carvalho IS, Tavares PGE, Campos ACAl. *Itajuba yansanae* Gen and SP NOV of Gnetales, Araripe Basin (Albian-Aptian) in Northeast Brazil. Clim Change Regional/Local Responses. 2013; 7: 187-205.

99. Antunes MT, Balbino AC, Freitas I. Early (18th century) Discovery of Cretaceous fishes from Chapada do Araripe, Ceará, Brazil – Specimenskeptatthe 'Academia das Ciências de Lisboa' Museum. Palevol. 2005; 4: 375-384.

100. Schultz CL, Langer MC. Tetrápodes triássicos do Rio Grande do Sul, Brasil. P-269-282 in Carvalho IS, et al. Paleontologia: Cenários de Vida. Rio de Janeiro, Interciência, 2007.

101. Benton M, Harper D. Introduction to paleobiology and the fossil record. Oxford, Wiley-blackwell, 2009.

102. Kardong K. Vertebrate: comparative anatomy, function, evolution. Dubuque, WCB Publishers, 1995.

103. Battail B. La Phylogénie dês cynodontes gonphodontes. Palaeontologica. 1983; 28: 19-30.

104. Benton M. Vertebrate Paleontology. Bristol, Blackwell Publishing, 2005.

105. Ray S, Chinsamy A, Bandyopadhyay S. *Lystrosaurus murrayi* (Therapsida, Dicynodontia): Bone histology, growth and lifestyle adaptations. Palaeontol. 2005; 48: 1169-85.

106. Weitschat W, Wichard W. Baltic Amber. P-80-115 in Penney D, editor. Biodiversity of fossils in amber from major world deposits. Siri Sci Press, 2010.

107. Bjorck S. A review of the history of the Baltic Sea, 13.0-8.0 ka BP. Quatern Int. 1995; 27: 19-40.

108. Leite RC. Distribuição especial de Chironomidae (Diptera) em riachos da região norte da Serra do Mar, Estado de São Paulo. [dissertação]. Universidade de São Paulo. 2010.

109. Grund M. Chironomidae (Diptera) in Dominican amber as indicators for ecosystem stability in Caribbean. Palaeogeo Palaeoclim Palaeoecol. 2006; 241: 410-416.

110. Jones AKG.Recent finds of intestinal parasite ova at York, England. Papers on Paleopathology, 4th European Members Meeting, Middelburg, Antwerpen, 1982.

111. Lutz A. O *Schistosomum mansoni* e a schistosomatose segundo observações, feitas no Brasil. Mem Inst Oswaldo Cruz, 11: 121-155, 1919.

112. Silva P, Borba VH, Dutra JMF, Leles D, Da-Rosa, AAS, Ferreira LF, et al. A new ascarid species in cynodont coprolite dated of 240 million years. An Acad Bras Cienc. 2014. 86: 265 - 269.

113. Hugot JP, Gardner SL, Borba VH, Silva P, Leles D, Da-Rosa AAS, et al. Discovery of a 240 million year old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates. Parasit Vectors. 2014; 7: 486.

114. Engh AL et al. Coprologic survey of parasites of spotted hyenas (*Crocuta crocuta*) in the masai Mara national reserve, Kenya. J wildlife dis. 39(1), 224-227. 2003.

115. Berentsen R, Becker MS, Stockdale-Walden H, Matandiko W, McRobb R. Survey of gastrointestinal parasite infection in african Lion (*Panthera leo*), african wild dog (*Lyncaon pictus*) and Spotted hyaena (*Crocuta crocuta*) in the LuangwaValley, Zambia. African Zool. 2012; 47(2), 363 - 368.

116. Koepfli KP, Jenks SM, Eizirik E, Zahirpour T, Van Valkenburgh B, Wayne RK. Molecular systematic of the Hyaenidae: Relationships of a relictual lineage resolved by a molecular supermatrix. Mol Phylogenet Evol. 2006; 38: 603 - 620.

117. Cerbo AR, Manfredi MT. Gastrointestinal infection in goat farms in Lombardy (Northern Italy): Analysis on community and spatial distribution of parasites. Small Ruminant Res. 2010; 88: 102 - 112.

118. Reichel M, Schultz CL, Soares M.B. A new Traversodontid cynodont (Therapsida, Eucynodontia) from the middle triassic Santa Maria formation of Rio Grande do Sul, Brazil. Paleontol. 2009; 2: 229 – 250.

119. O'Lorcain P, Holland CV (). The public health importance of Ascaris lumbricoides. Parasitol. 2000; 121: 51 - 71.

120. Chitwood BG, Chitwood MB. Introduction to Nematology. Baltimore, Maryland: University Park Press; 1950.

121. Pedersen AB, Altizer S, Poss M, Cunningham AA, Nunn CL: Patterns of host specificity and transmission among parasites of wild primates. Int J Parasitol. 2005; 35:647–657.

122. Vicente JJ, Rodrigues HO, Gomes DC, Pinto RM. Nematóides do Brasil. Parte V. Nematóides de mamíferos**.** Rev Brasil Zool**.** 1997; 14(1): 1 – 452.

ANEXO I – Tabela Cronoestratigráfica

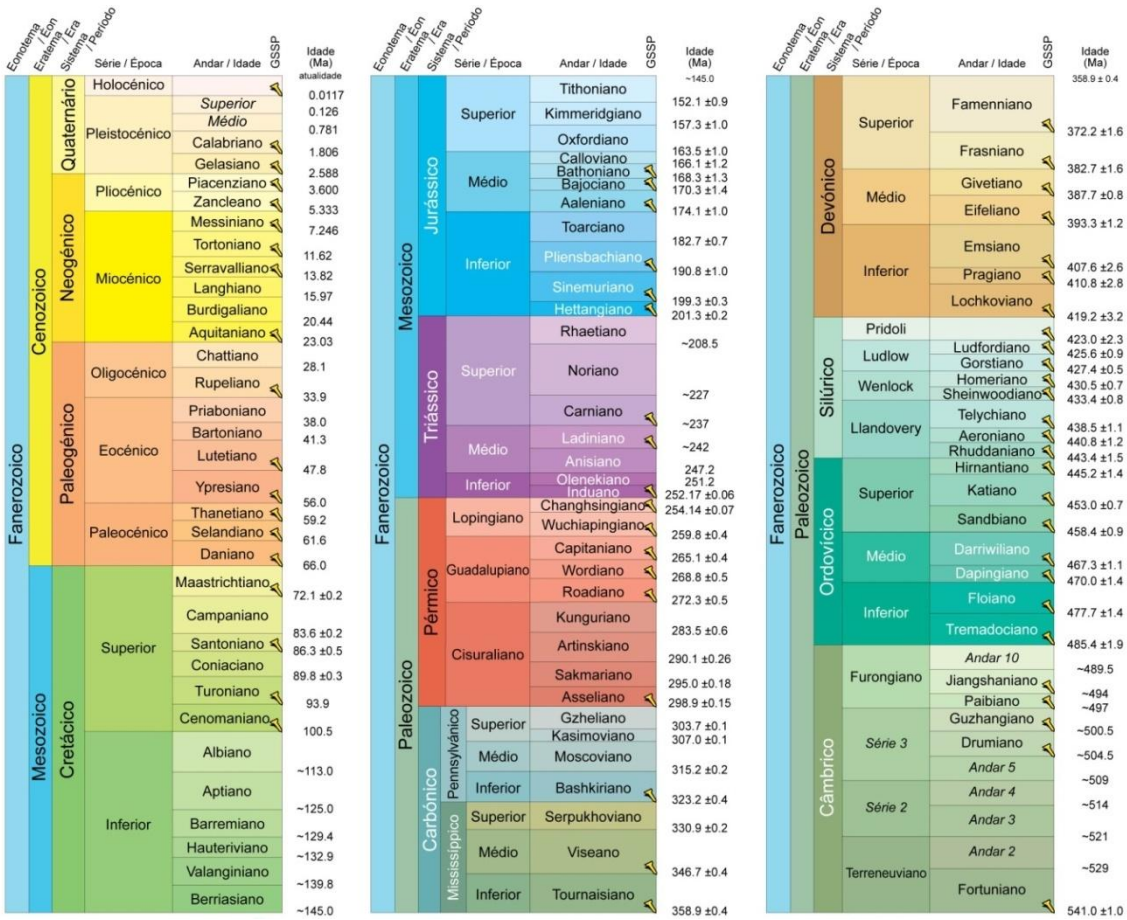

Tabela cronoestratigráfica. http:// www.stratigraphy.org

ANEXO II – Artigo "A new ascarid species in cynodont coprolite dated of 240 million years".

Anais da Academia Brasileira de Ciências (2014) 86(1): 265-269
(Annals of the Brazilian Academy of Sciences)
Printed version ISSN 0001-3765 / Online version ISSN 1678-2690
http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201320130036
www.scielo.br/aabc

A new ascarid species in cynodont coprolite dated of 240 million years

PRISCILLA A. DA SILVA[1], VICTOR H. BORBA[1], JULIANA M.F. DUTRA[1], DANIELA LELES[3], ATILA A.S. DA-ROSA[2], LUIZ F. FERREIRA[1] and ADAUTO ARAUJO[1]

[1]Laboratório de Paleoparasitologia, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões, 1480, Manguinhos, 21041-210 Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[2]Laboratório de Estratigrafia e Paleobiologia, Departamento de Geociências, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima, 1000, Prédio 17 - Sala 1131B, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil
[3]Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, MIP-UFF, Rua Professor Hernani Melo, 101, São Domingos, 24210-130 Niterói, RJ, Brasil

Manuscript received on January 30, 2013; accepted for publication on April 4, 2013

ABSTRACT

Cynodonts represent the transition from reptiles to mammals. They are classified as synapsids, or tetrapod animals with mammalian characteristics. We present here the finding of helminth eggs in a coprolite identified as of cynodont origin dated of nearly 240 million years. Microscopy revealed the presence of very well preserved intestinal parasite eggs. Up to now we identified an ascarid egg by morphological characteristics. Based on a previous description of the new genus *Ascarites* Poinar Jr and Boucot 2006 in coprolites of iguanodons from Belgium, we propose a new species, *Ascarites rufferi* n.sp. in cynodonts, a host that inhabited the Southern Region of Brazil in the Triassic period.

Key words: Ascarids, coprolites, cynodont, evolution, paleoparasitology.

INTRODUCTION

The finding of coprolites – desiccated, fossilized or permineralized feces - associated with skeletons of extinct animals is not uncommon (Souto 2000, 2011). Besides the possible presence of parasites, important information such as dietary habits, paleoclimate and paleoecological adaptations can be evidenced (Wolff et al. 2009). The first study was conducted by Renault and Bertrand (1895), describing structures classified as bacteria on vertebrate coprolites dated from the Permian of France. However, studies of parasites in this kind of material only recently began to be developed.

Correspondence to: Adauto Araujo
E-mail: adauto@ensp.fiocruz.br

The study of coprolites from extinct animals has revealed new species and genus of parasites, demonstrating its potential. Parasite eggs and cysts have been found in different extinct animals, such as unidentifi nematode eggs in a giant sloth (Ringuelet 1957); oocysts of two new species of Coccidia *Archeococcidia antiques* and *Archeococcidea nothrotheriopsae* in coprolite of a giant sloth (Schmidt et al. 1992); nematode larva in an extinct hyena species (Ferreira et al. 1993); *Toxocara canis* eggs in an extinct hyena species (Bouchet et al. 2003); *Paleoleishmania proterus* in blood from the digestive tract of a sandfl preserved in amber (Poinar Jr and Poinar 2004); three new genera of fungi from two categories, mycorrhizal and

epiphyllous, in dinosaurian (*Isisaurus*) coprolites (Sharma et al. 2005); *Plasmodium dominicana* in digestive tract of a mosquito of the genus *Culex* (Poinar 2005); Ascaridae eggs and protozoa cysts in a dinosaur coprolite from the Cretaceous of Belgium, showing the antiquity of that host-parasite relationship (Poinar Jr and Boucot 2006); oocysts of *Eimeria* sp. in coprolite of palaeollama (Fugassa et al. 2008) and a probable infection by *Trichomonas gallinae* in tyrannosaurid (Wolff et al. 2009).

The finding of cynodont coprolites in a fossiliferous deposit is herein first reported. These animals are classified as tetrapods synapsids of the order Therapsida that includes mammaliamorph reptiles (Schultz and Langer 2007), which appeared at the end of Permian (Benton and Harper 2009). Belonging to a monophyletic clade that gave rise to mammals (kardong 1995), the cynodonts can be divided into mammalian cynodonts, which are the mammals themselves, and non-mammalian cynodonts, including the group of mammaliaphorm reptiles (Schultz and Langer 2007). Regarding diet, the non-mammalian cynodonts are classified as either carnivores or herbivores; these last are called gonfodonts (Battail 1983, Benton 2005, Schultz and Langer 2007). They were almost vanished with the mass extinction of the Permo-Triassic, which extinguished 90% of animal species, but after that the cynodonts have diversified and dominated the Triassic period (Benton 2005).

The presence of tetrapod fossils is well documented in paleontological excavations in Southern Brazil (Holz et al. 2010). Coprolites were found associated with fossils of these animals (Schultz et al. 2000, Da-Rosa et al. 2004, 2005).

Schultz and Langer (2007) recognized fi different species belonging to this cenozone: *Massetognathus ochagaviae* (Barberena 1981); *Chiniquodon theotonicus* (Huene 1938); *Traversodonst ahleckeri* (Huene 1938); *Luangwa sudamericana* (Abdala and Sá-Teixeira 2004); *Protheriodone studianti* (Bonaparte et al. 2006). More recently, Reichel et al. (2009) described a new traversodontid herbivorous form, *Protuberum cabralensis*, characterized by rib tuberosities. Fossils from *Massetognathus* and *Traversodon* (cynodonts with special dentition for herbivorous habits) are in great number. *Chiniquodon theotonicus* is the only species that possessed specialized teeth for carnivorous diet (Reichel et al. 2009).

On this paper we describe a new species of ascarid found in a herbivorous cynodont coprolite from the Triassic of Southern Brazil.

MATERIALS AND METHODS

The coprolite was collected and identified by a multidisciplinary group of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The paleontological site is called Cortado site, located at Rio Grande do Sul state, Brazil, at coordinates S 29°44'55''; W 53°00'06''(Da-Rosa et al. 2004). The coprolite was found on Santa Maria Sequence 1 in Therapsida Cenozone, or *Dinodontosaurus* Association zone, as it is called nowadays, dated as Ladinian (Schultz and Langer 2007) of Triassic Period (241 to 237 M.y., according to the most recent chronostratigraphic ICS and GSA charts) (Cohen et al. 2012, Walker et al. 2012).

Coprolites were identified based on their shape, content and associated fauna. Archosaurs and procolophonoids were discarded as the coprolite producers, for being too big or small, respectively. Dicynodonts recorded at the outcrops ranging from juvenile to adult forms, thus from medium to big size. Cynodonts in the outcrop occur as both forms, herbivores and carnivores. Herbivorous cynodonts are medium-sized forms, while carnivorous cynodonts are medium- to small-sized forms.

The coprolite was examined under stereomicroscope at 75x to look for macroscopic food remains on its surface. Texture and morphology were also examined.

The surface was scraped, and material was also extracted from the interior of the coprolite by

using a drill. Instruments were sterilized before using. The small fragments were transferred into a Petri dish to separate smaller fragments that were placed into microtubes. Subsequently, the small fragments were treated with 10% hydrochloric acid (HCl) to dissociate minerals, washing immediately with distilled water to cease reaction.

Each 100µl of demineralized sediment was used to settle 20 microscope slides for bright field microscopy analysis at 100x and 400x final magnification. A total of 550 slides were examined under light microscopy (275 slides of the coprolite surface and 275 from inside).

RESULTS

The coprolite has a cylindrical shape and a rough surface, with one subdivision at the middle. Food remains were not identified in the surface.

Microscopically, two different kinds of helminth eggs were identified. First, an egg with a round mammilated eggshell, measuring 62.60 x 60.17µm (Figure 1); the other kind of egg is oval-shaped, with a double thin eggshell, measuring 106.52 x 53.26µm. Both eggs were found in the material collected from the interior of the coprolite.

DISCUSSION

The round mammilated egg is characteristic of the order Ascaridida, and was identifi as such due to their morphological similarity assigned to this family (Figure 1). Parasites of this family are found in many mammals today, including aquatic mammals. Poinar Jr and Boucot (2006) found different eggs of Ascaridae in dinosaurs, identifi as iguanodons, semi-aquatic reptiles. The eggs were described as a new genus and species of parasites, *Ascarites priscus*; *Ascarites gerus*. Although morphological characteristics are comparable, the ascarid egg in cynodont coprolite differs in size.

Considering the rules for description of a new species, it would be impossible to fulfi all the steps required. In that case, there is a supposed host, a species of the cynodont group, and a parasite, a species of ascarid, of which the only trace found was an egg similar to current Ascaridae in their morphometry. Therefore, ascarid infection dated of 240 million years and apparently there was no distinct change in the eggs morphology of this group of parasite, enabling their identifi To follow the genus *Ascarites* proposed by Poinar Jr and Boucot (2006), we suggest the name of the species found in the cynodonts, *Ascarites rufferi*, in honor of Sir Marc Armand Ruffer, the fi to register eggs of parasites in ancient material (Ruffer 1921).

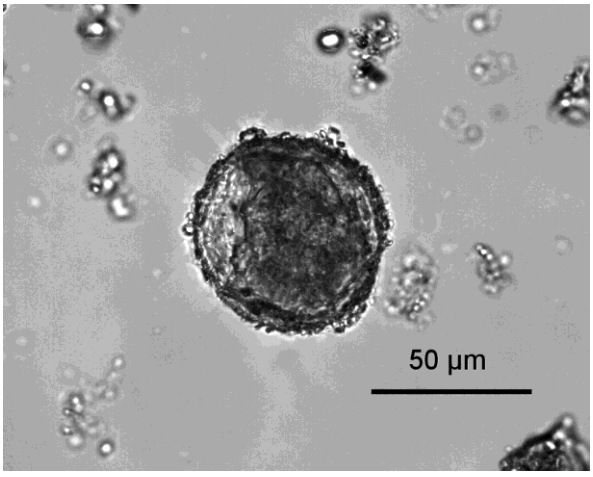

Figure 1 - Ascaridae egg found in cynodont coprolite dated 240 million years old.

A suggested classification is proposed below, following Poinar Jr and Boucot (2006):

Phylum: Nematoda (Rudolphi 1808)
Order: Ascaridida (Skrjabin and Shulz 1940)
Family: Ascarididae (Baird 1853)
Genus: *Ascarites* (Poinar and Boucot 2006)
Species: *Ascarites rufferi* n. sp.

Digital pictures of the egg are kept in the Data Bank of the Laboratory of Paleoparasitology, Fundação Oswaldo Cruz.

The cynodonts were both herbivores and carnivores, therefore, presence of ascarids is consistent with parasitism of this group in current species,

but the parasitism by ascarids is also common in omnivores such as pigs and humans (Leles et al. 2012). The long persistence of parasitism and its breadth and diversity of hosts attests to the success of this group of nematodes.

Because these animals represent a group of transition from reptiles to mammals, as long as 240 million years, this fi shows how old the infection is, as well as the presence of this parasite in a host that would be the ancestor of mammals. The egg morphology was preserved for million of years, allowing it to be identified by the usual microscopic techniques.

As for the other kind of helminth egg found in the cynodont coprolite, studies are still in course.

The finding of these parasite eggs in Cynodontia shows the antiquity of parasitism at the reptile-mammal transition point, some 240 million years ago. This shows that, contrary to what was previously thought, there are fossil records of nematodes. Dorris et al. (1999) went as far as to state that the absence of fossils made it impossible to date the stages of evolution in nematodes. The present finding and other previous results (Dentzien-Dias et al. in press) show the ability of paleoparasitology to find evidence of parasitism in extinct animals, enhancing the potential of studies in fossils dating from millions of years. Lastly, this is an evidence of parasitism in a group of hosts that were ancestors of mammals, showing the scope for comparative studies, which for the moment are limited to morphology.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)/CNPq (Ciência sem Fronteiras). We would like to thank the valuable suggestions of the two reviewers.

RESUMO

Cinodontes representam o passo de transição de répteis para mamíferos. São classificados como sinapsídeos, ou tetrápodes, animais com características de mamíferos. Apresentamos aqui o achado de ovos de helmintos em um coprólito identificado como originário de cinodontes, datado de cerca de 240 milhões de anos antes do presente. A microscopia revelou a presença de ovos de parasitos intestinais muito bem preservados. Até o momento, identificamos um ovo de ascarídio pelas características morfológicas. Baseados na descrição prévia do novo gênero *Ascarites* Poinar Jr e Boucot 2006 em coprólitos de iguanodontes na Bélgica, propomos uma nova espécie, *Ascarites rufferi* n.sp. em cinodontes, um hospedeiro que habitava a região sul do Brasil no período Triássico.

Palavras-chave: Ascarideos, coprólitos, cinodontes, evolução, paleoparasitologia.

REFERENCES

BATTAIL B. 1983. La phylogenie des cynodontes gonphodontes. Acta Palaeont. Polonica 28: 1-2, 19-30.

BENTON M. 2005. Vertebrate Paleontology. 3rd. ed., Bristol: Blackwell Publishing, 472 p.

BENTON M AND HARPER D. 2009. Introduction to paleobiology and the fossil record. 1st ed., Oxford: Wiley-blackwell, 560 p.

BOUCHET F, GUIDON N, DITTMAR k, HARTER S, FERREIRA LF, CHAVES SM, REINHARD k AND ARAUJO A. 2003. Parasite remains in archaeological sites. Mem Inst Oswaldo Cruz 98: 47-52.

COHEN kM, FINNEy S AND GIBBARD PL. 2012. International Chronostratigraphic Chart: International Commission on Stratigraphy. www.stratigraphy.org (last accessed May 2012).

DA-ROSA AAS, SCHWANkE C, AURELIO PLP, POITEVIN M AND WITECk NETO L. 2005. Sítio Linha Várzea - uma nova assembleia fossilífera do Triássico Médio do sul do Brasil. Geociências 24: 115-129.

DA-ROSA AAS, SCHWANkE C, CISNEROS JC, WITECk NETO L, AURELIO PLP AND POITEVIN M. 2004. Sítio Cortado - Uma nova assembleia fossilífera para o Triássico Médio do sul do Brasil. Rev Bras Paleontol 7: 289-300.

DENTzIEN-DIAS PC, POINAR JR G, DE FIGUEIREDO AE, PACHECO AC, HORN BL AND SCHULTz CL. IN PRESS. Tapeworm eggs in a 270 million-year-old shark coprolite. PLoS One 8(1): e55007. doi: 10.1371/journal.pone.0055007.

DORRIS M, DE LEy P AND BLAxTER ML. 1999. Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. Parasitol Today 15: 188-193.

FERREIRA LF, ARAUJO A AND DUARTE AN. 1993. Nematode larvae in fossilized animal coprolites from lower and middle Pleistocene sites, central Italy. J Parasitol 79: 440-442.

FUGASSA M, SARDELLA NH, TAGLIORETTI V, REINHARD kJ AND ARAUJO A. 2008. Eimeriid oocysts from archaeological samples in Patagonia, Argentina. J Parasitol 94: 1418-1420.

HOLz M, BERTONI-MACHADO C AND SIMõES MG. 2010. A estratigrafia de sequências e o registro fóssil. In: CARVALHO IS (Org), Paleontologia, Rio de Janeiro: Interciência, p. 111-138.

kARDONG k. 1995. Vertebrate: comparative anatomy, function, evolution. Dubuque: WCB Publishers, 777 p.

LELES D, GARDNER SL, REINHARD k, IÑIGUEz A AND ARAUJO A. 2012. Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species? Parasit Vectors 5: 42.

POINAR JR G 2005. *Plasmodium dominicana* n. sp. (Plasmodiidae: Haemospororida) from Tertiary Dominican amber. Syst Parasitol 61: 47-52.

POINAR JR G AND BOUCOT AJ. 2006. Evidence of intestinal parasite of dinosaurs. Parasitology 133: 245-249.

POINAR JR G AND POINAR R. 2004. *Paleoleishmania proterus* n. gen., n. sp., (Trypanosomatidae: kinetoplastida) from Cretaceous Burmese amber. Protist 155: 305-310.

REICHEL M, SCHULTz CL AND SOARES M. 2009. A new traversodontid cynodont (Therapsida, Eucynodontia) from the Middle Triassic Santa Maria Formation of Rio Grande do Sul, Brazil. Palaeontology 52: 229-250.

RENAULT B AND BERTRAND CE. 1895. Premières observations sur des bactéries coprophiles de l' époque Permiènne. Sciences (CR, Caenoizoique 1) 894: 583-587.

RINGUELET RA. 1957. Restos de probables huevos de nematodes en el estiércol del edentado extinguido *Mylodon listai* (Ameghino). Ameghiniana 1: 15-16.

RUFFER MA. 1921. Studies in paleopathology of Egypt. 1st ed., Nova york: University of Chicago Press, 546 p.

SCHMIDT G, DUSzyNSkI D AND MARTIN P. 1992. Parasites of the extinct shasta ground sloth *Nothrotheriops shastensis*, in Rampart Cave, Arizona. J Parasitol 78: 811-816.

SCHULTz CL AND LANGER MC. 2007. Tetrápodes triássicos do Rio Grande do Sul, Brasil. In: CARVALHO IS (Org), Paleontologia: Cenários de Vida, Rio de Janeiro: Interciência, p. 269-282.

SCHULTz CL, SCHERER CMS AND BARBERENA MC. 2000. Biostratigraphy of southern Brazilian middle-upper Triassic. Rev Bras Geoc 30: 491-494.

SHARMA N, kAR Rk, AGARWAL A AND kAR R. 2005. Fungi in dinosaurian (*Isisaurus*) coprolites from the Lameta Formation (Maastrichtian) and its reflection on food habit and environment. Micropaleontology 51: 73-82.

SOUTO PRF. 2000. Tetrapode coprolites from the middle Triassic of southern Brazil. Gaia, Geosci J 16: 51-57.

SOUTO PRF. 2011. Estudo de micro inclusões em coprólitos. In: Ferreira LF, Reinhard k and Araujo A (Orgs), Fundamentos da Paleoparasitologia, Ed Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 153-159.

WALkER JD, GEISSMAN JW, BOWRING SA AND BABCOCk LE. 2012. Geologic Time Scale v. 4.0: Geological Society of America. http://www.geosociety.org/science/timescale/timescl.pdf (last accessed May 2012).

WOLFF EDS, SLISBURy SW, HORNER JR AND VARRICCHIO DJ. 2009. Common avian infection plagued the tyrant dinosaurs. PLoS ONE 4: e7288.

ANEXO III – "Discovery of a 240 million year old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates".

Parasites & Vectors

RESEARCH Open Access

Discovery of a 240 million year old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates

Jean-Pierre Hugot[1], Scott L Gardner[2*], Victor Borba[3], Priscilla Araujo[4], Daniela Leles[4], Átila Augusto Stock Da-Rosa[5], Juliana Dutra[3], Luiz Fernando Ferreira[3] and Adauto Araújo[3]

Abstract

Background: We report the discovery of a nematode parasite egg (Nemata: Oxyurida) from a coprolite closely associated with the remains of several species of Cynodontia, dated to 240 million years old. This finding is particularly significant because this is the oldest record of an oxyurid nematode yet discovered, and because the cynodonts are considered a stem-group of the mammals.

Methods: We extracted material from a fully mineralized coprolite by both scraping the surface, and removing fragments from its interior with clean dental instruments used a single time. A single drop of glycerol from a new vial was added as a clearing reagent. Each slide was sealed with wax and examined with an optical microscope at 100× to 400× magnification.

Results: From one coprolite, 550 slides were examined; from 275 of these slides, sediment was examined that was scraped from the surface of the coprolite, and from the other 275 slides, material was examined that was extracted from the interior of the coprolite. All microscopic structures encountered were photographed, measured, and identified when possible.

Conclusions: From the coprolite examined, we discovered an egg representing a new species of pinworm that, based on the egg structure, clearly places it in the family Heteroxynematidae. Nematodes of the order Oxyurida have very constrained life-histories, occurring only in animals that are not strictly carnivorous and also ingest large amounts of plant material. This fact enabled us to determine which species of cynodont, from several collected at the site in Brazil, are most likely the depositors of the coprolite, and therefore were the putative host of the parasite.

Keywords: Brazil, Cynodont, Coprolite, Haplodiploid, Heteroxynematidae, Oxyurida, Paleoparasitology, Pinworm, Upper Triassic

Background

The field of paleoparasitology has developed rapidly since its inception in the early 20th century up to the present time. Fossil parasites of both plants and animals have been found from a broad geological time-spectrum, ranging from the Holocene as far back as the lower Cambrian (over 500 million years) [1-3]. Studies of parasites in paleo-faunas can provide firm data on ages of fossilized organisms and allow establishment of both dates of origin and diversification for host-parasite associations, including groups of parasites associated with extinct vertebrates [4,5]. Coprolites can be important sources of data because the study of fossilized fecal material provides simultaneous information on both host and parasite enabling a better understanding of their ecological relationships [4-7].

Herein, we describe the egg of a nematode parasite (Nemata: Oxyurida) discovered in a single coprolite associated with species of primitive proto-mammals of the

* Correspondence: slg@unl.edu
[2]Harold W Manter Laboratory of Parasitology, University of Nebraska State Museum and School of Biological Sciences, University of Nebraska–Lincoln, W529 Nebraska Hall, Lincoln, NB 685880514, USA
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2014 Hugot et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Class Cynodontia that is estimated to be about 240 million years old (MYO). The discovery is particularly significant for two reasons that include: a) This finding reports the most ancient pinworm yet discovered, and b) the host group, the cynodonts, are part of the stem group of the lineage of early vertebrates that includes the mammals.

All pinworms in the order Oxyurida have a very specific ecological/life-history trait, which is that almost all known hosts of these nematodes have a portion of their gut that acts as a cellulose decomposition chamber (via anaerobic bacterial/protistan digestion). This allows us to speculate as to which species of cynodont, from several that were recorded at the collection site, is most probably the depositor of the coprolite and, therefore, the host of the new parasite. Because of this finding, we can speculate as to the presence of Oxyurida in other extinct lineages of vertebrates.

Methods

We extracted material from a single, fully mineralized coprolite by both scraping the surface, and removing fragments from the interior with clean dental instruments used a single time for each sample. Material extracted from each was examined separately. The material obtained was placed in EppendorfTM tubes and labeled. The material was then dissociated in this tube with a solution of 10% hydrochloric acid (HCl) and double distilled water (v/v) and immediately washed with distilled water until a neutral pH was achieved. Slides were prepared by placing a single drop of sediment from the material that was dissociated in HCl on a depression slide. To each slide, a single drop of glycerol from a new vial was added as a clearing reagent. The slide was sealed with wax and examined with an optical microscope at 100× to 400× magnification. From one coprolite, 550 slides were examined; from 275 of these slides, sediment was examined that was scraped from the surface of the coprolite, and from the other 275 slides, material was examined that was extracted from the interior of the coprolite. All microscopic structures encountered were photographed, measured, and identified when possible.

Results

The coprolite that we studied originated from excavations conducted at the Sítio Cortado site, Rio Grande do Sul State, Brazil [7-9] (Figure 1) and is completely permineralized and petrified with calcite ($CaCO_3$). The coprolite was identified as fossilized feces that were derived from a cynodont because of its intimate association with abundant fossil remains of these animals at the site of collection. The single coprolite studied (Figure 2) was examined with a stereomicroscope to ascertain its texture and morphological features. During our work, nematode eggs representing two different species were found: An ascarid-like egg (previously described [9]) and the egg of a pinworm that we report and describe as a new species in the following.

Taxonomic description

Paleoxyuris cockburni n. gen., n. sp.

The single egg of this pinworm nematode is ellipsoidal, slightly flattened on one side, one extremity more rounded, two-layered, smooth-surfaced shell, measuring 113.51 × 77.08 μm. Embryonic mass visible, but amorphous; polar cap visible (Figure 3A).

Phylum: Nemata

Order: Oxyurida Railliet, 1916

Family: Heteroxynematidae (Skrjabin and Shikhobalova, 1948)

Genus: *Paleoxyuris* n. gen.

Species: *cockburni* n. sp.

Paleoxyuris cockburni n. gen., n. sp.

LSID (Zoobank): urn:lsid:zoobank.org:pub:49EFE6C7-860 F-436 F-8FE3-178A3F77C49B

Etymology: "paleo," ancient, archaic, and "oxyuris". The species name is a tribute to Aidan Cockburn, founder of the Paleopathology Association.

Type locality: In a cynodont coprolite, Upper Triassic, Rio Grande do Sul State, Brazil. Latitude longitude and date collected. (S29 °30′-S29 °45′–W53 °15′-52 °45′, collected in 2007).

Type specimen: Coprolite collected by Átila Da-Rosa in the field and deposited in the collection of coprolites and archeological and paleontological remains, Paleoparasitology Laboratory, Sergio Arouca National School of Public Health, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil; slide and digitized image #A-1578B.

Differential diagnosis

In an extensive review of the taxonomic characteristics of the Nemata, Chitwood and Chitwood [12] demonstrated that the morphology of the eggs of nematodes provide reliable and robust information for the diagnosis of the taxonomic groups at level of families, genera, and sometimes species. Most known species of Oxyurida have eggs with an operculum, or with a lateral cap; a few species have a polar cap (as seen in our specimen) and these (with polar or terminal caps) are all classified in the family Heteroxynematidae Skrjabin and Shikhobalova, 1948. A comparison of the egg of *P. cockburni* n. sp. with all the eggs of the Oxyurida pictured in Chitwood and Chitwood [12] shows that it is very similar in size and shape to the eggs of several species of the genera *Heteroxynema* Hall, 1916 (Figure 3F,G and H) and *Syphaciella* Mönnig, 1924 (Figure 3C,D and E). These characteristics enable us to place *Paleoxyuris* in the family Heteroxynematidae. Nematodes of the genus *Heteroxynema* are

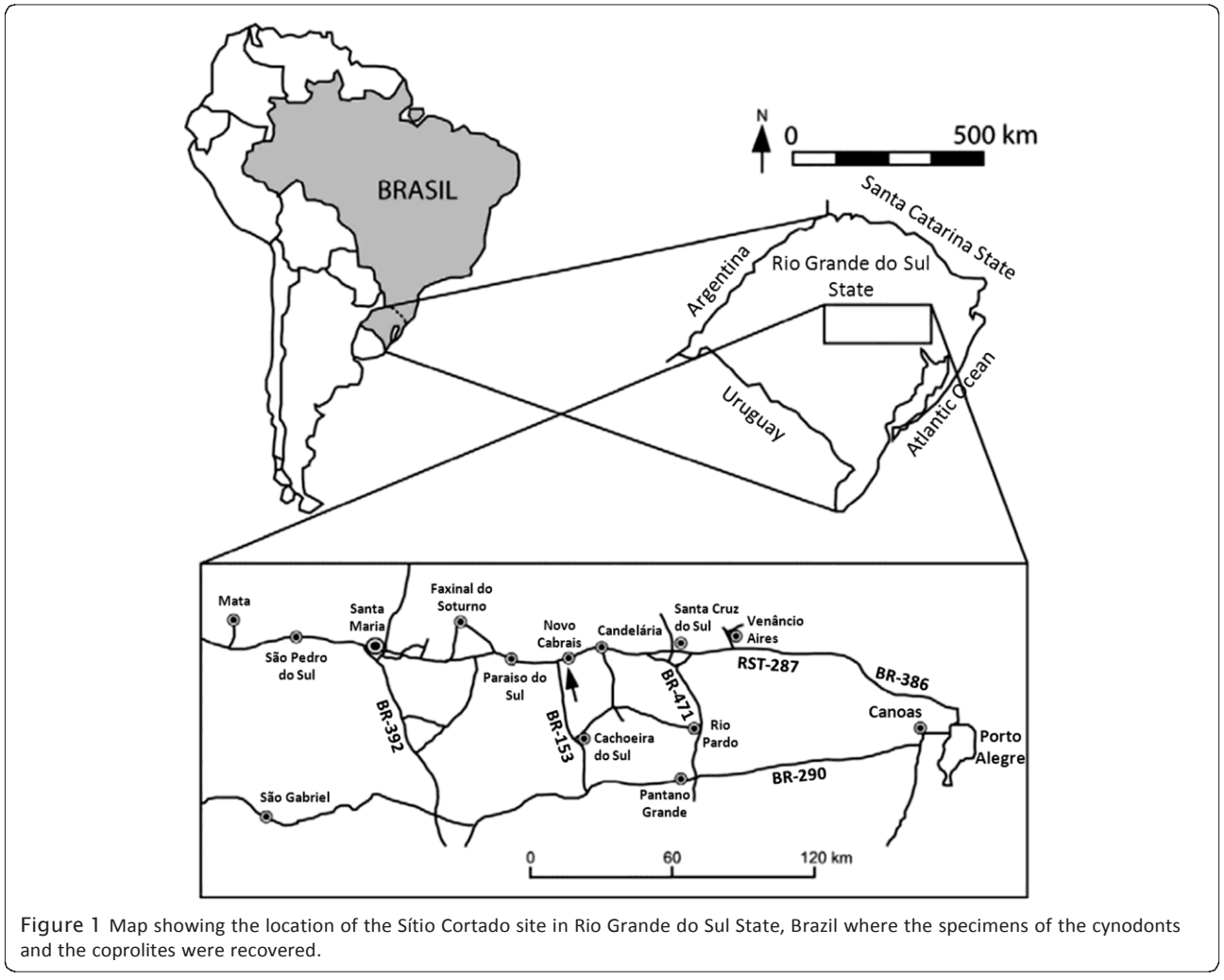

Figure 1 Map showing the location of the Sítio Cortado site in Rio Grande do Sul State, Brazil where the specimens of the cynodonts and the coprolites were recovered.

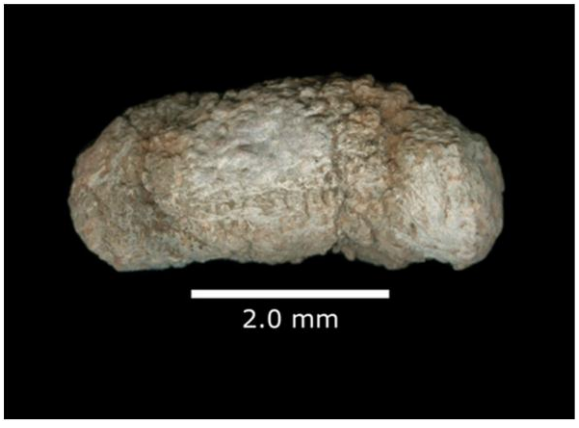

Figure 2 Cynodont coprolite from the Upper Triassic, Sítio Cortado site, Rio Grande do Sul State, Brazil.

known parasites of both rodents and lagomorphs, species of *Syphaciella* (also in the Heteroxynematidae) are parasites of sand grouse of the genera *Syrrhaptes* and *Pterocles* (Pterocliformes: Pteroclidae) that are ground-nesting birds restricted to desert and semi-deserts of the Palearctic zoogeographic region. *Paleoxyuris cockburni* n. gen., n. sp. can be separated from the only other nematode parasite known from cynodonts collected from the same time stratum by the shape [9] with *P. cockburni* showing the typical pinworm shape while the other nematode is obviously an ascarid [9] with a completely different shape and structure.

Discussion

Pinworms as a natural group

Within the Nemata, the Oxyurida is the only order with representative species occurring as parasites in both vertebrates and invertebrates (Figure 4). They are found in arthropods [12,13], fishes, birds, lizards, amphibians, and mammals [13]. Whatever their host group, pinworms

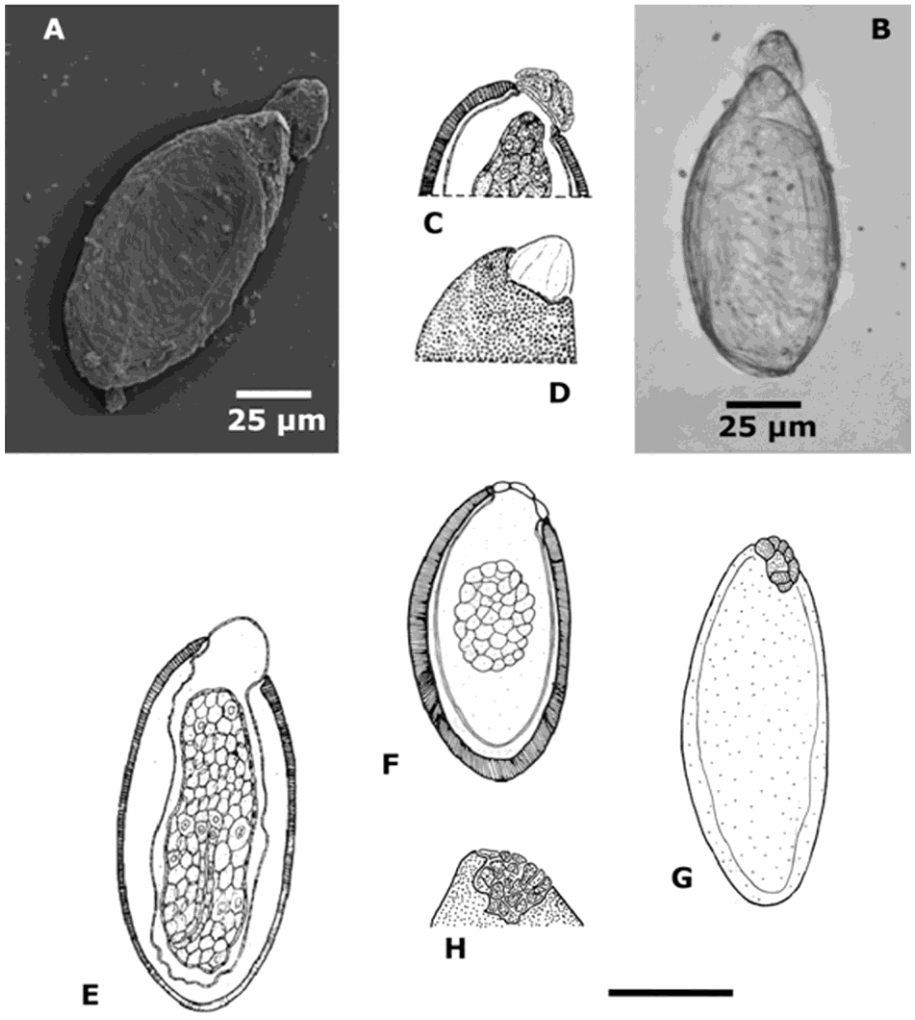

Figure 3 *Paleoxyuris cockburni* n. gen., n. sp. A, egg from a coprolite (SEM microscopy); B *idem*, (light microscopy); *Syphaciella madagascariensis* Vassiliadès, 1970 egg: C and D detail of the operculum; E, optical cut. *Heteroxynema (Cavioxyura) viscaciae* Hugot and Sutton, [10] egg: F, optical cut; G, lateral view; H, detail of the operculum. Scale: E, F, G, 100 µm; C, D, H, 50 µm. [C, D and E, after Hugot [11]; F, G and H, after Hugot and Sutton [10]].

feed on endosymbiotic bacteria and protists living in the digestive tract of their hosts and these parasites only occur in animals that digest relatively large quantities of cellulose. One question then arises: Did the Oxyurida have a single common origin or is the group polyphyletic, having originated more than once from ancestral nematode species. Several lines of evidence provide support of the Oxyurida as a natural or monophyletic group.

Recent studies using molecular data to define the phylogenetic relationships of the main groups of the phylum Nemata all agree in the placement of species of Oxyurida in a monophyletic group or clade [15-17] (Figure 4). All Oxyurida thus far investigated have a haplodiploid mode of reproduction: Unfertilized eggs give rise to haploid males and fertilized eggs always produce diploid females [18]. There is currently no evidence showing a reversal of this mode of reproduction in any taxa of the Nemata or other groups of organisms that manifest a haplodiploid mode of reproduction; this list includes, but is not restricted to, the Hymenoptera (ants, wasps, honey bees), Homoptera, and some mites (Acari: Mesostigmata). Data available from the phylogenetic databases of the Nemata, and the groups mentioned above, show clearly that once a species has made the transition from a diploid to a haplodiploid mode of reproduction, reversal back to a diploid system of sexual recombination is unlikely. We therefore interpret haplodiploidy in the Nemata as an ancient life-history character that probably originated simultaneously with the speciation event that gave rise to the Oxyurida [13].

Host specificity and coevolution

Host specificity gauges the degree to which a parasite species is restricted to a particular host species without

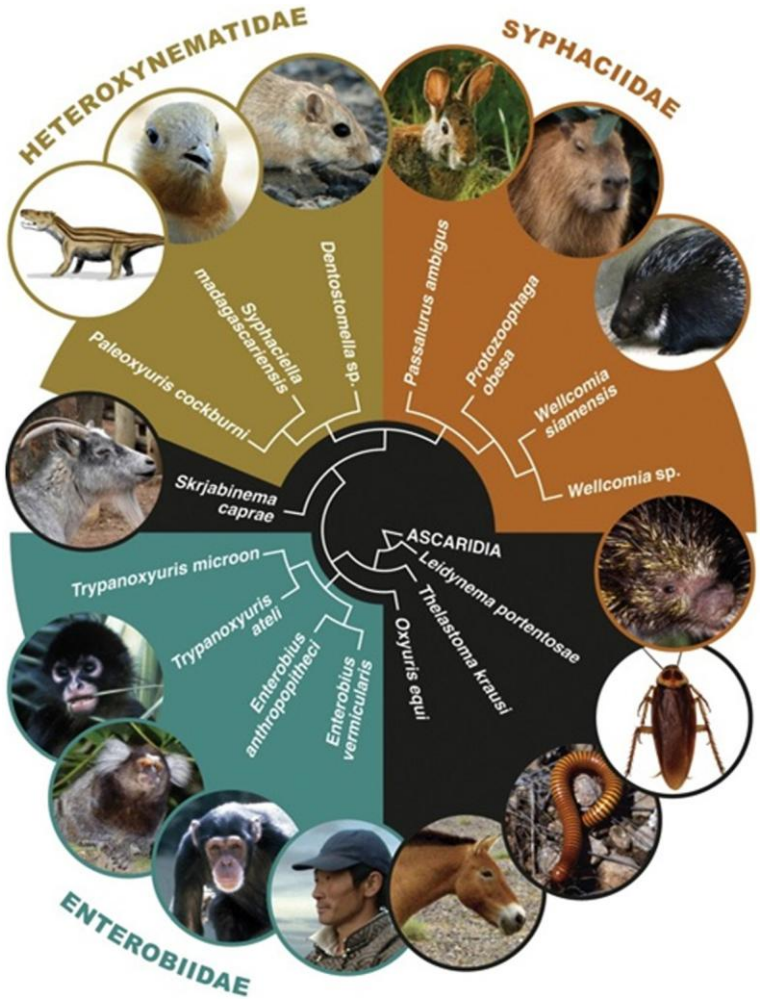

Figure 4 Origin and classification of pinworm parasites: from arthropods to mammalian reptiles and humans. The Oxyurida are parasites of both vertebrate and invertebrate with around 800 to 1000 species being described up to the present time. Few molecular analyses have been performed on the group as a whole, but whenever several species of pinworms were compared with other nematodes, they appear as a monophyletic sister-group of the Ascarida [14-16]. This tree summarizes the results of these different studies. It is remarkable that whatever the family, Heteroxynematidae or Syphaciidae, all the pinworm parasites of both rodents and lagomorphs always show a common origin. Based on the morphological characters of the egg, *Paleoxyuris cockbruni* n. gen., n. sp., a parasite of cynodonts in the family Traversodontidae, is classified in the Heteroxynematidae.

reference to phylogeny [18]. Pedersen *et al.* [19] showed that parasites using close contact transmission are primarily specific to single host species. Pinworms certainly belong to this category. In addition to having a direct life-cycle without involving an intermediate host, observations demonstrate that different behaviors of the hosts of pinworms facilitate direct-transmission of the parasite eggs thus enabling successive self-infections [20,21]. Common behaviors of host animals that may increase the probability of repetitive self-infections are: coprophagy (feeding on excrements) and caecotrophy (re-ingestion of fecal pellets naturally produced by digestion from the cecum).

Parasites with direct life-cycles occurring in hosts that manifest behaviors that increase the probability of self-infection appear to be able to maintain this association for long periods of time. At the same time these characteristics of both the host and parasite appear to decrease the probability that the parasite would switch to a new species of host. One evolutionary consequence of host specificity is a long-standing association between hosts and parasites through geological time. Darwin [22] first discussed this idea and afterwards, many authors have subsequently suggested that the phylogenetic relationships of highly host-specific parasites could provide valuable information on the evolutionary history of their hosts [6,23-28]. This defines the fields of Historical Ecology and Cophylogeny: The study of two or more associated groups of organisms sharing a common history of speciation, making possible phylogenetic conclusions. Accordingly, numerous studies have produced evidence

for extreme host specificity and patterns of cophylogeny among mammals and their oxyurid parasites [27,28].

Identification of the host

The Cynodontia, are therapsid vertebrates that first appeared in the Late Permian (approximately 260 Mya). The group includes modern mammals as well as their extinct ancestors and close relatives. Non-mammalian cynodonts spread throughout southern Gondwana and are represented by fossils from South America, Africa, India, and Antarctica. The non-mammalian cynodont fossils collected from the site from where the coprolite was identified belong to the species *Massetognathus ochagaviae* Barberena, [29]; *Chiniquodon theotonicus* Huene, [30]; *Traversodon stahleckeri* Huene, [30]; *Luangwa sudamericana* Abdala and Sá-Teixeira, [31];

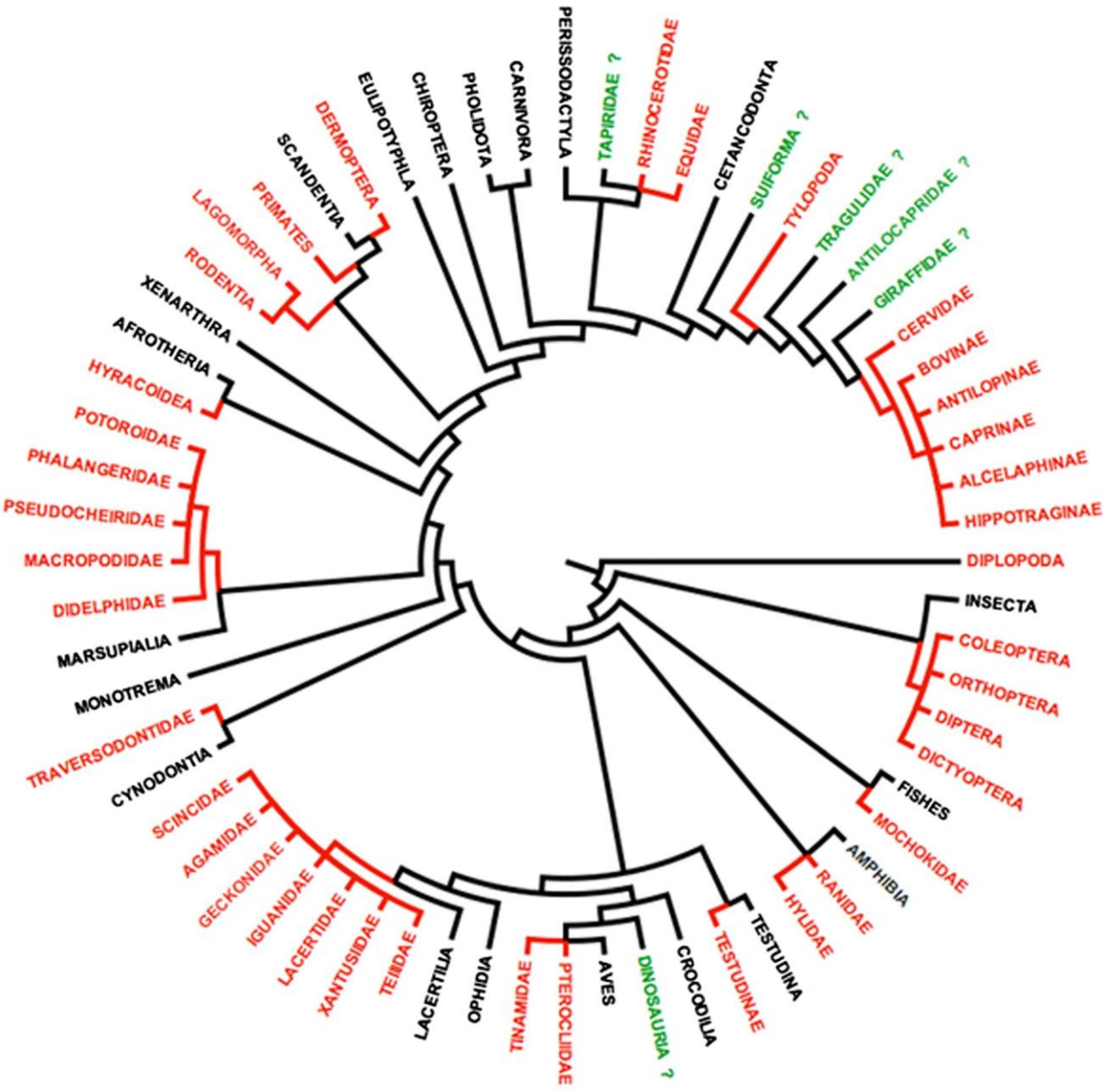

Figure 5 Phylogenetic relationships of the animal groups parasitized by species of the order Oxyurida. Most animal groups that consume large quantities of plant material (cellulose) are parasitized by pinworms (in red). Generally, these parasites are found in all the representatives of a family group over the complete geographic distribution of the family. Different pinworm species identified in one host group are morphologically very similar, indicating host-parasite cospeciation. However, some groups have not been shown to harbor oxyurids (in green and indicated by a question mark) even though the feeding habits and digestive tract seem appropriate. The question also can be asked regarding the presence of pinworms in herbivorous dinosaurs.

and *Protheriodon estudianti* Bonaparte *et al.* [32]. *Massetognathus* and *Traversodon* were most abundant in the cenozone of the site [7,8].

Species of *Chiniquodon* and *Protheriodon* were carnivorous cynodonts, which lived during the early Late Triassic in South America. *Traversodon*, *Luangwa*, and *Massetognathus* all are members of family Traversodontidae, which includes fairly advanced, plant-eating, non-mammalian therapsids [8]. For instance, *Massetognathus* had the distinctive long snout of its cynodont relatives, with nipping incisors and fang-like canines, but its cheek teeth were flat- topped and covered with low ridges, which made them good for grinding stems, roots and other plant materials. Thus, the fauna associated with the coprolite is dominated by herbivorous or semi-herbivorous animals.

Species of animals (including humans and other primates) infected by pinworms always consume large quantities of cellulose, with no known exceptions, regardless of their phylogenetic affinities: vertebrate or arthropod. This feeding behavior may be considered necessary for the Oxyurida to be able to infect and survive in a host. Thus, the cynodonts that were herbivorous and were found at the collection site appear to be the most plausible sources of the coprolite from which we found the pinworm: *i.e.* one of the species identified in the Traversodontidae (Figure 4).

Species assigned to the Traversodontidae appear to have had a primarily Gondwanan distribution, with many species known from Africa and South America [8]. Battail [33] has hypothesized that they originated in what is now South America with subsequent diversification east into Africa and north into what is now Europe and eastern North America. We therefore consider representatives of the family Traversodontidae identified at the site of discovery of the coprolite, as the hosts of the new pinworm species described in this work. We also consider that the Traversodontidae are the primitive hosts of the Heteroxynematidae with a Gondwanan origin for both families (Figure 4).

Did the dinosaurs have pinworms?

The discovery of an egg of a nematode of the order Oxyurida in the Cynodontia shows that this host-pinworm parasitic association existed as far back as the transition point of the reptile-mammal phylogenetic divergence, approximately 240 million years ago. This finding shows that parasitism as an ecological trait originated at least as early as this group of cynodont infecting nematodes and that this group of nematodes has successfully been infecting herbivorous mammals (and birds to a lesser extent) to the present time. Most animal groups that contain herbivorous representatives are parasitized by pinworms (Figures 4 and 5). This begs the question of the existence of pinworms in extinct animal lineages having similar feeding behaviors: as all herbivorous vertebrate groups, including birds, are infected with pinworms, the probability for the extinct herbivorous dinosaurs to be unaffected may be considered to be low; especially considering the extreme variety and wide geographical distribution of the herbivorous lineages within the Dinosauria.

Conclusion

The morphological characteristics of the egg of the pinworm parasite discussed herein (and an ascarid egg from the same coprolite [9]) were well-preserved for millions of years, enabling identification using routine methods of microscopy. This shows that, with appropriate techniques, additional fossil records of nematodes may be discovered. In the recent past, Dorris *et al.* [14] assumed that the absence of fossils made it impossible to date the stages of evolution in nematodes. We have discovered evidence of parasitism in extinct animals, providing precedent for additional studies in fossils dating back millions of years. It also shows that the pinworm lineage extends at least as far back as 240 million years, from at least as old as the mammal-like reptiles through evolutionary diversification to modern vertebrates including humans and other primates. Finally, the discovery of these parasites in a group of hosts that are the stem group that gave rise to the mammals expands the scope and range of potential comparative studies, which for the moment are limited to morphology but may soon expand into molecular investigations. Our study also highlights the need for additional combined molecular/morphological and field-based collections and studies that will improve the resolution of the phylogenetic relationships of the major families classified within the order Oxyurida.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JPH wrote much of the article and contributed figures, SLG provided conceptual editing, figures, and writing, VB provided text and data for figures, PA contributed with examining all the 500 slides and identifying the parasites, DL contributed to text and by contacts with paleontologists, AD-R is the paleontologist in charge of the research and provided all information about the samples and the paleontological site, JD was in charge of SEM microscopy and developed the alternative technique to isolate the parasite egg by freezing it. The project was directed by LF and AA. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

Financial support for field and laboratory work in Brazil was provided by: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro). Thanks to Angie Fox for preparing some figures and to Jason Head for advice on the manuscript. Work in the Harold W. Manter Laboratory of Parasitology at the University of Nebraska–Lincoln was supported through grants from the United States National Science Foundation (NSF) including: DBI-1127386 and DEB-0717214 to SLG.

Author details
[1]Museum National d'Histoire Naturelle, ISYEB, UMR 7205 CNRS, 55, rue Buffon, 75231 Paris, Cedex 05, France. [2]Harold W Manter Laboratory of Parasitology, University of Nebraska State Museum and School of Biological Sciences, University of Nebraska–Lincoln, W529 Nebraska Hall, Lincoln, NB 685880514, USA. [3]Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rua Leopoldo Bulhões 1480, 21041-210 Rio de Janeiro, Brazil. [4]Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Rua Prof. Ernani Pires de Melo, 101, 24210-130 Niterói, Rio de Janeiro, Brazil. [5]Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Geociências, Laboratório de Estratigrafia e Paleobiologia, Campus Camobi, 97105-900 Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Received: 4 June 2014 Accepted: 9 October 2014
Published online: 13 November 2014

References

1. Araújo A, Ferreira LF: Paleoparasitology and the antiquity of human host-parasite relationships. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2000, 95(Suppl. I):89–93.
2. Gardner SL, Cambpell M: Parasites as probes for biodiversity. *J Parasitol* 1992, 78:596–600.
3. Larew LG: Two cynipid wasp acorn galls preserved in the La Brea Tar Pits (early Holocene). *Proc Ent Soc Wash* 1987, 89:831–833.
4. Jouy-Avantin F, Combes C, Lumley H, Miskovsky JC, Moné H: Helminth eggs in animal coprolites from a middle Pleistocene site in Europe. *J Parasitol* 1999, 85:376–379.
5. Da-Rosa AAS: Paleontological tourism at Santa Maria city, Southern Brazil: potential versus reality. *Arq Mus Nac Rio de Janeiro* 2008, 66:291–304.
6. Soares MB, Schultz CL, Horn BLD: New information on *Riograndia guaibensis* Bonaparte, Ferigolo and Ribeiro, 2001 (Eucynodontia, Tritheledontidae) from the Late Triassic of southern Brazil: anatomical and biostratigraphic implications. *An Acad Bras Cienc* 2011, 83:329–354.
7. Da Silva PA, Borba VH, Dutra JMF, Leles D, Da-Rosa AAS, Ferreira LF, Araujo A: A new ascarid species in cynodont coprolite dated of 240 million years. *An Acad Bras Cienc* 2014, 86:265–269.
8. Kemp TS: *The Origin & Evolution of Mammals.* Oxford: Oxford University Press; 2005.
9. Chitwood BG, Chitwood MB (Eds): *Introduction to Nematology.* Baltimore, Maryland: University Park Press; 1950.
10. Hugot JP, Sutton CA: Contribution à la connaissance de la faune parasitaire d'Argentine, XV. Étude morphologique de *Heteroxynema (Cavioxyura) viscaciae* n. sp., (Nematoda, Oxyuridae), parasite de *Lagidium viscacia boxi*. *Syst Parasit* 1989, 13:111–120.
11. Hugot JP: Étude morphologique de *Syphaciella madagascariensis* (Nematoda, Heteroxynematidae) parasite de *Pterocles personatus* (Aves, Ptroclididae). *Syst Parasit* 1989, 14:43–52.
12. Chaudhary A, Pal S, Singh MHS: Genomic DNA sequence of *Leidynema appendiculata* from Meerut, U.P., India. *Asian J An Sci* 2011, 5:243–255.
13. Anderson RC: *Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission.* Wallingford and New York: CAB International; 2000.
14. Dorris M, De Ley P, Blaxter ML: Molecular analysis of nematode diversity and the evolution of parasitism. *Parasitol Today* 1999, 15:188–193.
15. Nadler SA, Carreno RA, Mejía-Madrid H, Ullberg J, Pagan C, Houston R, Hugot JP: Molecular phylogeny of clade III nematodes reveals multiple origins of tissue parasitism. *Parasitology* 2007, 130:1–23.
16. Ulrike RZ, Bialek R, Weiß M: Molecular phylogenetic analysis of *Enterobius vermicularis* and development of an 18S Ribosomal DNA-targeted diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2011, 49:1602–1604.
17. Adamson ML: Evolutionary patterns in life histories of Oxyurida. *Int J Parasitol* 1994, 24:1167–1177.
18. Poulin R: *Evolutionary Ecology of Parasites.* UK: Princeton University Press; 2007.
19. Pedersen AB, Altizer S, Poss M, Cunningham AA, Nunn CL: Patterns of host specificity and transmission among parasites of wild primates. *Int J Parasitol* 2005, 35:647–657.
20. Sorci G, Morand S, Hugot JP: Host-parasite coevolution: comparative evidence for covariation of life history traits in primates and oxyurid parasites. *Proc R Soc Lond B* 1997, 264:285–289.
21. Hugot JP, Feliu C, Ribas A: *Laoxyuris laonasti* n. gen., n. sp. (Nematoda: Syphaciinae) parasite of *Laonastes aenigmamus* (Rodentia: Diatomyidae): morphology, biology, taxonomy, phylogeny. *Infect Genet Evol* 2013, 13:213–221.
22. Darwin C: *Letter to Henry Denny (November 7th, 1844). Charles Darwin's Letters (1825–1859): A Selection.* Oxford: Cambridge University Press; 1998.
23. Cameron TW: The species of *Enterobius* Leach, in Primates. *J Helminthol* 1929, 7:161–182.
24. Sandosham AA: On *Enterobius vermicularis* (Linnaeus, 1758) and some related species from primates and rodents. *J Helminthol* 1950, 24:171–204.
25. Brooks DR, Glen DR: Pinworms and primates: a case study in coevolution. *Proc Helminthol Soc Wash* 1982, 49:76–85.
26. Hugot JP: Phylogeny of neotropical monkeys: the interplay of morphological, molecular, and parasitological data. *Mol Phyl Evol* 1998, 9:408–413.
27. Hugot JP: Primates and their pinworm parasites: Cameron hypothesis revisited. *Syst Biol* 1999, 48:523–546.
28. Hoberg EP, Pilitt PA, Galbreath KE: Why museums matter: a tale of pinworms (Oxyuroidea: Heteroxynematidae) among pikas (*Ochotona princeps* and *O. collaris*) in the American west. *J Parasitol* 2009, 95:490–501.
29. Barberena MC: Uma nova espécie de *Massetognathus* (*Massetognathus ochagaviae*, sp.nov.) da Formação Santa Maria, Triássico do Rio Grande do Sul. *Pesquisas* 1981, 14:181–195.
30. von Huene FF: Lieferung 2. Cynodontia. In *Die fossilen Reptilien des Südamerikanischen Gondwanalandes. Ergebnisse der Sauriergrabungen in Südbrasilien 1928/29.* Edited byFF von Huene. Beck'sche Verlagsbuchhandlung; 1938:83–160.
31. Abdala FN, Sa-Teixeira AM: A traversodontid cynodont of African affinity in the South American Triassic. *Palaeontologia africana* 2004, 40:11–22.
32. Bonaparte JF, Soares MB, Schultz CL: A new non-mammalian cynodont from the Middle Triassic of southern Brazil and its implications for the ancestry of mammals. In *The Triassic-Jurassic Terrestrial Transition.* Edited by Harris HD, Lucas SG, Spielmann JA, Lockley MG, Milner ARC, Kirkland JL. New Mexico Museum of Natural History & Science Bulletin 37; 2006:599–607.
33. Battail B: La phylogénie des Cynodontes gomphodontes. *Acta Palaeontol Pol, Warszawa* 1983, 28:19–30. *Second Symposium on Mesozoic Terrestial Ecosystems, Jadwisin 1981.*

doi:10.1186/s13071-014-0486-6
Cite this article as: Hugot *et al.*: Discovery of a 240 million year old nematode parasite egg in a cynodont coprolite sheds light on the early origin of pinworms in vertebrates. *Parasites & Vectors* 2014 7:486.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- **Convenient online submission**
- **Thorough peer review**
- **No space constraints or color figure charges**
- **Immediate publication on acceptance**
- **Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar**
- **Research which is freely available for redistribution**

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central