



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA – DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR –
PPBM**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Raillietiella mottae (Raillietiellidae: Pentastomida) em lagartos do Nordeste brasileiro: aspectos morfológicos do desenvolvimento e plasticidade fenotípica revelada por dados moleculares

JANAINA MARQUES DO NASCIMENTO

CRATO-CE, 2019

JANAINA MARQUES DO NASCIMENTO

Raillietiella mottae (Raillietiellidae: Pentastomida) em lagartos do Nordeste brasileiro: aspectos morfológicos do desenvolvimento e plasticidade fenotípica revelada por dados moleculares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Dr. Waltécio de Oliveira Almeida

Coorientador: Dr. Samuel Vieira Brito

CRATO – CE, 2019

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Regional do Cariri – URCA
Bibliotecária: Ana Paula Saraiva CRB 3/1000

Marques do Nascimento, Janaina.
M357r *Raillietiella mottae* (Raillietiellidae: Pentastomida) em lagartos do Nordeste brasileiro: aspectos morfológicos do desenvolvimento e plasticidade fenotípica revelada por dados moleculares/ Janaina Marques do Nascimento. – Crato-CE, 2019
53p.; il.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós - Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA.
Orientador: Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida
Coorientador: Prof. Dr. Samuel Vieira Brito

1. Parasitismo, 2. Morfologia, 3. Embriões, 4. Região Neotropical;
I. Título.

CDD: 591.524

JANAINA MARQUES DO NASCIMENTO

Raillietiella mottae (Raillietiellidae: Pentastomida) em lagartos do Nordeste brasileiro: aspectos morfológicos do desenvolvimento e plasticidade fenotípica revelada por dados moleculares

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito para obtenção do título de mestre.

APRESENTANDA EM 30/07/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida (Orientador)

Universidade Regional do Cariri-URCA

Prof. Dr. Fábio Hideki Yamada (Membro interno)

Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Leonardo Silvestre Gomes Rocha (Membro externo)

Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra Cunha (Suplente)

Universidade Regional do Cariri – URCA

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente:

Ao meu orientador, Waltécio de Oliveira Almeida, pela incansável ajuda, constante estímulo e confiança depositada;

Ao meu marido, Samuel Brito, pelas muitas contribuições neste trabalho, pelo apoio, incentivo, carinho e compreensão.

Aos professores Fábio Yamada, Leonardo Silvestre e Francisco Cunha, por compor a banca examinadora e pelas valiosas sugestões que os mesmos trarão para este trabalho;

A toda equipe do LZ-URCA, em especial a João Antonio, Nayane, Erica, Emerson, Adonias, Rivanilda, Leonardo, Monique e Amanda pelo apoio durante o desenvolvimento do experimento. A ajuda de vocês foi fundamental.

Aos meus familiares, especialmente a minha mãe, Josefa Marques, pelo apoio e amor incondicional;

Ao meu irmão, amigo e professor, Rafael Marques, pelos ensinamentos, pelo carinho e cuidado, e por se fazer presente, apesar dos muitos quilômetros de distância.

Aos meus amigos da URCA, Ricardo, Julimery, Samara, Adonias, Erica, Rivanilda, João, Amanda, Emerson, e Léo pelos bons momentos que passamos juntos;

A minha amiga Nayane, pela amizade, parceria e apoio;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, pelos valiosos ensinamentos;

A secretária do PPBM, Dona Sil, pela paciência, compreensão e boa vontade, nas horas que eu tiver de resolver burocracias na coordenação;

A Universidade Regional do Cariri;

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa concedida, que foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

Capítulo 1: Descrição de ovo e larva de <i>Raillietiella mottae</i> : (Pentastomida: Raillietiellidae) em populações de <i>Phyllopezus periosus</i> e <i>Phyllopezus pollicaris</i> , (Squamata: Phyllodactylidae).....	08
Resumo.....	09
Introdução.....	11
Objetivos.....	13
Material & métodos.....	13
Resultados.....	18
Discussão.....	21
Conclusões.....	26
Capítulo 2: <i>Raillietiella mottae</i> (Raillietiellidae: Pentastomida) parasita generalista de lagartos insetívoros: plasticidade fenotípica revelada por dados moleculares.....	28
Resumo.....	29
Introdução.....	31
Objetivos.....	33
Material & métodos.....	34
Resultados.....	37
Discussão.....	41
Conclusões.....	44
Referências bibliográficas.....	45

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Descrição de ovo e larva de *Raillietiella mottae*: (Pentastomida: Raillietiellidae) em populações de *Phyllopezus periosus* e *Phyllopezus pollicaris*, (Squamata: Phyllodactylidae)

Figura 01: *Raillietiella mottae* adulto. Procedimento métrico seguido para quantificar as dimensões AB e BC dos ganchos.....17

Figura 02 (A e B): Ovos de *Raillietiella mottae*. (A) Ovo com larva (Vista ventral). (B) Ovos embrionados.....19

Figura 03 (A, B, C e D): Ovo e larva de *Raillietiella mottae*. (A) Ovo com larva (vista dorsal). (B) Ovo com larva (vista ventral). (C) Larva (vista ventral). (D) Extremidade anterior da larva.....20

Figura 04 (A e B): Regressão entre o comprimento da fêmea e o comprimento do ovário (A) e entre o comprimento do ovário e o número total de ovos (B) para o pentastomídeo *Raillietiella mottae*, incluindo ovos embrionados e não embrionados.....21

CAPÍTULO 2: *Raillietiella mottae* (Raillietiellidae: Pentastomida) parasita generalista de lagartos insetívoros: plasticidade fenotípica revelada por dados moleculares

Figura 01: Tipos de ganchos encontrados em *Raillietiella mottae* parasitando lagartos na Estação Ecológica de Aiuaba - ESEC Aiuaba. Ganchos com ponta afiada (A) e ponta romba (B).....38

Figura 02: Modelo Linear Generalizado, demonstrando a diferença na área total dos ganchos entre os railietielídeos com ganchos de ponta aguda e de ponta romba.....39

Figura 03: Regressão linear simples entre o tamanho corpóreo de *Raillietiella mottae* e as dimensões dos ganchos, sendo (A, B e C) o comprimento corpóreo e as dimensões AB, BC e área total dos ganchos anteriores e (D, E e F) o comprimento corpóreo e as dimensão AB, BC e área total dos ganchos posteriores.....40

Figura 04: Regressão linear entre a dimensão dos ganchos e o tamanho do hospedeiro, sendo (A) a dimensão AB e o comprimento total do hospedeiro e (B) a área total dos ganchos e o comprimento total do hospedeiro.....41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Descrição de ovo e larva de *Raillietiella mottae*: (Pentastomida: Raillietiellidae) em populações de *Phyllopezus periosus* e *Phyllopezus pollicaris*, (Squamata: Phyllodactylidae)

Tabela 01: Comprimento (Comp.) e largura (Larg.) dos ovos das espécies de *Raillietiella* sp.....19

CAPÍTULO 2: *Raillietiella mottae* (Raillietiellidae: Pentastomida) parasita generalista de lagartos insetívoros: plasticidade fenotípica revelada por dados moleculares

Tabela 01: Prevalência, Prev. (%), Intensidade média de infecção, Int., e Amplitude, para os lagartos do clado Gekkota da Estação Ecológica de Aiuaba – CE.....38

Tabela 02: Regressão linear entre o tamanho dos ganchos e o tamanho do corpo dos espécimes de *Raillietiella mottae*.....40

Tabela 03: Regressão linear simples entre tamanhos dos ganchos dos pentastomídeos e o tamanho dos hospedeiros.....41

CAPÍTULO 1

Descrição de ovo e larva de Raillietiella mottae: (Pentastomida: Raillietiellidae) em populações de Phyllopezus periosus e Phyllopezus pollicaris, (Squamata: Phyllodactylidae)

Resumo

Pentastomídeos são parasitas obrigatórios do sistema respiratório de vertebrados. No geral esses parasitas possuem um corpo vermiforme, um abdômen com anelacão conspicua. O cefalotórax que é arredondado e apresenta na sua parte ventral, uma pequena boca flanqueada por dois pares de ganchos. No presente trabalho as características estruturais do ovo e da larva do pentastomídeo *Raillietiella mottae* são descritas e comparadas com as de outros pentastomídeos. Os ovos e larvas foram obtidos dos lagartos *Phyllopezus periosus* e *Phyllopezus pollicaris*, sendo que estes foram coletados na área de proteção ambiental Cachoeira de Missão Velha, Ceará-Nordeste do Brasil (7° 13' S; 39° 08' O). Após a captura, os espécimes foram transportados ao Laboratório de Zoologia (LZ-URCA), onde foram acomodados em terrários. Semanalmente os lagartos foram checados quanto à infecção por endoparasitas através do exame de flotação das fezes. A morfometria dos ovos de *R. mottae* foi comparada com outras espécies de railietielídeos. Os ovos são típico do gênero *Raillietiella* e diferem de outros gêneros por não possuírem a membrana flexível externa. A larva possui dois pares de membros com um par de ganchos terminais cada, os membros são sustentados por estruturas musculares cônicas, a segmentação é visível, com membros não segmentados, curvados ventralmente. Cauda terminal posteriormente bifurcada. O conhecimento da morfologia dos ovos e larvas iniciais podem ser úteis na identificação de hospedeiros infectados, já que os ovos podem ser encontrados nas fezes. Além disso, tais informações podem ser úteis para fins taxonômicos.

Palavras-Chave: Parasitismo; Morfologia; Embriões; Região Neotropical

Abstract

Pentastomids are obligate parasites of the vertebrate respiratory system. In general these parasites have a vermiform body, an abdomen with conspicuous ringing. In the present work the structural characteristics of the egg and larva of the pentastomid *Raillietiella mottae* are described and compared with those of other Pentastomides. The eggs and larvae were obtained from *Phyllopezus periosus* and *Phyllopezus pollicaris*, and were collected in the environmental protection area of Missão Velha Waterfall, Ceará-Northeast of Brazil (7°13 'S; 39°08' O). After the capture, the specimens were transported to the Laboratory of Zoology (LZ-URCA), where they were accommodated in terrariums. The lizards were checked weekly for endoparasite infection by examination of fecal flotation. The morphometry of *R. mottae* eggs was compared to other species of raillietiellids. The eggs are typical of the genus *Raillietiella* and differ from other genera because they lack the outer flexible membrane. The larva has two pairs of limbs with a pair of terminal hooks each, the limbs are supported by conical muscular structures, the segmentation is visible, with unsegmented limbs, ventrally curved. Terminal tail later forked. Knowledge of the morphology of eggs and early larvae may be useful in identifying infected hosts, since eggs can be found in feces. In addition, such information may be useful for taxonomic purposes.

Keywords: Parasitism; Morphology; Embryos; Neotropical Region

Introdução

Pentastomídeos são parasitas obrigatórios do sistema respiratório de vertebrados (Self, 2009). Os pentastomídeos adultos se alimentam principalmente do sangue e podem causar patologias severas, algumas vezes resultando na morte do hospedeiro (Paré, 2008). De acordo com Christoffersen & De Assis (2013), o táxon pentastomida compreende cerca de 150 espécies. No geral esses parasitas possuem um corpo vermiforme, um abdômen com anelacão conspícua. O cefalotórax que é arredondado e apresenta na sua parte ventral, uma pequena boca flanqueada por dois pares de ganchos (Riley, 1986).

O gênero *Raillietiella* (Cephalobaenida: Raillietiellidae) compreende cerca de 45 espécies (Christoffersen & De Assis, 2015), é o táxon mais diverso entre os Pentastomida sendo constituído por pequenos organismos (<25mm) que maturam principalmente nos pulmões dos répteis (Riley, 1986). O ciclo de vida é desconhecido para a maioria das espécies, mas sabe-se que railietielídeos possuem um ciclo de vida indireto, utilizando insetos ou outros invertebrados para chegarem ao seu hospedeiro definitivo (Ali & Riley, 1983; Riley, 1986).

Dentre as espécies de *Raillietiella*, apenas *Raillietiella furcocerca*, *Raillietiella gehyrae*, *Raillietiella frenatus*, e *Raillietiella gigliolii*, tiveram seus ovos e embriões descritos. Esslinger (1968) descreveu os estágios iniciais de vida de *R. furcocerca* coletados em serpentes *Clelia clelia* na Colômbia; Pence & Canaris (1973) descreveram a morfologia dos ovos e estágios larvais de *R. gehyrae* encontrados nos pulmões de *Mabuya homalocephala* no Quênia; Ali e Riley (1983) descreveram os ovos e todos os estágios larvais de *R. gehyrae* e *R. frenatus* em geckos; Winch e Riley (1985) observaram as fases iniciais do desenvolvimento de *R. gigliolii* em *Coelosis biloba*.

No Brasil, foram realizados alguns estudos sobre taxas de infecções por pentastomídeos em répteis (Vrcibradic et al., 2002; Dias et al., 2005; Almeida et al., 2008a; 2008b; Anjos et al., 2008). No entanto, nenhum deles se preocupou em analisar a morfologia de ovos e larvas das espécies estudadas.

Publicações recentes com *Raillietiella mottae* incluem estudos de sua taxonomia e ocorrência (Almeida et al. 2008a; Silva et al., 2019), e avaliações das taxas de infecção, prevalência e intensidade média de infecção em lagartos no nordeste do Brasil (Anjos et al. 2008; Almeida et al. 2008b; 2009; Sousa et al. 2010; Brito et al. 2014; Lima et al. 2018).

O conhecimento da morfologia dos ovos e larvas iniciais podem ser úteis na identificação de hospedeiros infectados, já que os ovos podem ser encontrados nas fezes (Ali & Riley, 1983; Paré, 2008). Além disso, tais informações podem ser úteis para fins taxonômicos. O objetivo de identificar gêneros e espécies através da morfologia de ovos é proposta desde os primeiros trabalhos com Pentastomida (ex; Stiles, 1891). No entanto, esse tipo de análise só é possível com a catalogação de dados sobre a biologia das espécies e suas possíveis variações em diferentes hospedeiros.

No presente estudo, apresentamos a descrição do ovo e da larva de estágio I de uma espécie de railietielídeo (*Raillietiella mottae*) para a região Neotropical, visando auxiliar parasitologistas de animais silvestres, veterinários e médicos na identificação de pentastomíases, além disso fornecer um caractere adicional a ser utilizado pelos taxonomistas na identificação de espécies.

Objetivos

Objetivo geral

- Caracterizar morfológicamente os estágios de iniciais de vida de *Raillietiella mottae*.

Objetivos específicos

- Avaliar se o tamanho do parasito influencia o número total e o volume dos ovos;
- Avaliar se o volume dos ovos de *R. mottae* variam nas espécies hospedeiras *Phyllopezus periosus* e *Phyllopezus pollicaris*.

Materiais & Métodos

Área de estudo

A área de Proteção Ambiental Cachoeira de Missão Velha, localizada no estado do Ceará Nordeste do Brasil (7°13'S, 39°08'O), é um dos nove Geosítio que compõem o Geoparque Araripe, juntos eles formam uma área de 3520,52 Km². A área é caracterizada por solos rasos e vários afloramentos rochosos, assim como pela passagem do rio Salgado que em alguns pontos forma uma queda d'água de 12 metros de altura. A vegetação é composta por um mosaico de Floresta Ripária (que acompanha o curso do rio), cactos e arbustos baixos, plantas típicas do domínio de Caatinga (área adjacente ao rio), (Mendonça et al. 2013).

Coleta dos hospedeiros e preparação dos terrários

Foram coletados de forma manual de 33 lagartos (27 *P. periosus* e 6 *P. pollicaris*). Os espécimes foram transportados para o Laboratório de Zoologia da

Universidade Regional do Cariri (LZ-URCA) e mantidos em terrários individuais. O estudo das amostras foi aprovado pelo Comitê de Uso e Experimentação Animal - CEUA / URCA, sob o número 00011 / 2016.2.

Os terrários foram montados no Laboratório de Zoologia da Universidade Regional do Cariri (LZ-URCA), em um espaço de 6 metros quadrados. Cada terrário consistia em uma caixa de vidro retangular de 50cm de comprimento por 50cm de altura e 30cm de largura, coberta por uma tela barra mosquito apoiada em pedaços laterais e frontais de madeira. No interior, as paredes perto da borda superior de cada terrário (cerca de 8 cm) foram cobertas com uma camada de vaselina sólida para evitar que os lagartos escapassem. No exterior, aplicou-se uma camada de vaselina (cerca de 5 cm) para impedir a passagem de formigas e outros insetos. O substrato e uma das paredes laterais de cada terrário foram cobertos com uma placa E.V.A (Etileno Vinil Acetato) para reter o calor. Foram instaladas lâmpadas halógenas (70W) externamente e a 10cm da superfície lateral (coberta interiormente com E.V.A) dos terrários, estes foram dispostos de forma paralela a fonte de calor (lâmpadas), de forma que cada lâmpada aquecia simultaneamente quatro terrários, as lâmpadas eram ligadas às 6:00 horas e desligadas às 16:00 horas. A temperatura e umidade da sala foram checadas diariamente a 50cm da fonte de calor e no centro do laboratório.

Água e alimento foram ofertados aos lagartos *ad libitum*, onde baratas *Nauphoeta cinerea*, fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade Regional do Cariri (URCA), foram utilizadas como fonte de alimento. As baratas foram ofertadas respeitando a taxa de predação individual dos lagartos, todos os dias os terrários eram checados e o número de baratas contabilizadas de forma que sempre houvesse alimento disponível e esse não excedesse o número de três animais por lagarto, esse método foi adotado como precaução para reduzir a possibilidade de que as

baratas se alimentassem das fezes dos lagartos, já que a coleta dos ovos foi realizada por meio das fezes. Os reservatórios de água dos lagartos eram lavados a cada quatro dias com álcool 70%. Os terrários também eram higienizados a cada quatro dias, durante esse processo, os lagartos eram armazenados individualmente em sacos plásticos.

Coleta de fezes e análises

As fezes dos lagartos foram coletadas diariamente com o auxílio de uma pinça metálica (esta sempre limpa com álcool 70% entre o uso em diferentes terrários) armazenadas em tubos de ensaio e mantidas em temperatura ambiente (25 C°). Semanalmente os lagartos foram checados quanto à infecção por endoparasitas através do exame de flotação das fezes. A solução de *Shaether* 1923 foi preparada usando-se 500g de açúcar cristal e 320mL de água destilada, essa mistura foi levada ao fogo e homogeneizada até o clareamento (dois ou três minutos após o início da fervura). As fezes eram pesadas, em seguida maceradas em cálices com 2 mL dessa solução, onde em seguida era acrescentada até o valor de 10 mL, cada amostra era então homogeneizada por pelo menos cinco minutos, após isso, eram passadas por uma peneira, em seguida depositada em tubos de ensaio, sendo centrifugada durante dois minutos a 2.000 rotações por minuto em uma centrífuga automática. Os tubos de ensaio eram então acomodados na posição vertical em racks de sustentação padrão e uma pequena quantidade de solução de Sheather era adicionada até encher o tubo completamente, uma lamínula de vidro era então colocada em contato com a superfície do líquido, após vinte minutos a lamínula era retirada e posta sobre uma lâmina de vidro e examinada em um microscópio óptico. Foi realizada uma série de cinco amostras para cada tubo analisado, os ovos encontrados foram contabilizados e medidos (comprimento e largura). Para ruptura dos ovos e análise dos embriões foi adicionado uma pequena quantidade de Cloro a 2% na lâmina antes desta receber a lamínula, após a liberação da

larva I, os membros, ganchos e aparato bucal foram mensurados com o uso da objetiva de 100X e óleo de imersão.

Para realizar a contagem dos ovos nos ovários das fêmeas, foi plotado uma área quadriculada na tela do analisador de imagens, cada grade foi composta de 24 quadrados menores (500 μ m X 500 μ m), os ovos foram contabilizados e separados quanto à maturação em duas categorias, ovos embrionados, quando foram observados os membros, ganchos, fulcro e cadre bucal do embrião e ovos não embrionados quando essas estruturas não foram visualizadas, a contagem foi realizada ao longo de todo o ovário da fêmea. Foram medidos 15 ovos embrionados quanto ao comprimento e largura (C/L) e calculados quanto ao seu volume.

Ao final do experimento, lagartos cujas fezes não continham ovos de pentastomídeos foram eutanasiados com uma injeção letal de lidocaína (2%) e imediatamente dissecados. Sistema respiratório e cavidades foram analisados para verificar a presença de pentastomídeos com uso de uma lupa estereomicroscópica. Quando encontrados, os espécimes foram preservados em álcool a 70% e, posteriormente, montados em lâminas em meio Hoyer e analisados usando um microscópio equipado com um analisador de imagem (Zen 2 Blue Edition Zeiss). Os pentastomídeos foram medidos, sexados e avaliados quanto à maturidade reprodutiva, posteriormente os espécimes foram depositados na Coleção Parasitológica da Universidade Regional do Cariri (URCA-P: 1187-1240). As medidas tomadas foram: comprimento, largura, dimensões dos ganchos anteriores e posteriores AB e BC e área total. Para obter as medidas dos ganchos, AB e BC (Figura 01), adotamos o protocolo utilizado por Ali et al. (1981), onde as medições AB para os ganchos anteriores e posteriores correspondem entre a distância da ponta do gancho até a parte anterior

interno do fulcro, já para a mensuração das dimensões BC foi mensurada a distância entre a parte exterior do fulcro até a parte externa do ponto de apoio posterior.



Figura 01: *Raillietiella mottae* adulto. Procedimento métrico seguido para quantificar as dimensões AB e BC dos ganchos.

Análises estatísticas

Os dados foram testados quanto à normalidade através do teste Shapiro-Wilk. Usamos a análise de regressão linear para testar a influência do tamanho da fêmea em relação ao comprimento do ovário, e se o comprimento do ovário influenciou o número total de ovos. O volume dos ovos foi calculado usando a fórmula de um elipsoide ($V = \pi \times C \times L^2 / 6$). O volume de ovos com embriões, medido nos ovários (15 ovos por fêmea) foi correlacionado com o comprimento do ovário (Correlação de Spearman, após um teste Z: Zar, 1999). Todas as análises foram realizadas usando o programa estatístico R (R Core Team, 2011).

Resultados

Morfologia do ovo e embrião

Foram mensurados 270 ovos e 88 embriões coletados através do exame de flotação das fezes. Os ovos (Figura 02: A e B) apresentam formato oval, típico de outros railietielídeos, com comprimento médio de $97.68 \pm 7.32\mu\text{m}$ e largura $75.05 \pm 5.31\mu\text{m}$. A morfometria dos ovos de *R. mottae* foi comparado com outras espécies de railietielídeos (Tabela 01). A cápsula do ovo (Figura 03: A e B) é formada por duas membranas sobrepostas, a membrana externa com espessura de $1.92 \pm 0.51\mu\text{m}$, pouco elástica e facilmente rompida por pressão na lamínula. Por outro lado, a membrana interna é bastante elástica e muito resistente à pressão, possui $1.39\mu\text{m} \pm 0.38\mu\text{m}$ de espessura. Ao entrar em contato com a solução de Sheather, normalmente se formava uma camada mais densa ao redor do ovo, esta sempre com largura ($4.68 \pm 2.93\mu\text{m}$) variável e facilmente rompida. Todos os ovos eliminados nas fezes apresentavam embrião totalmente formado.

A larva (Figura 03: C) mede $149.14 \pm 8.84\mu\text{m}$ de comprimento por $78.97 \pm 5.12\mu\text{m}$ de largura (nível do órgão dorsal), possui dois pares de membros com um par de ganchos terminais cada. Os membros anteriores possuem $17.47 \pm 1.81\mu\text{m}$ de comprimento, os ganchos apresentam tamanhos desiguais $10.17 \pm 1.3\mu\text{m}$ e $7.64 \pm 0.9.33\mu\text{m}$, os membros posteriores apresentam $16.78 \pm 2.52\mu\text{m}$ de comprimento, ganchos de $10.73 \pm 1.76\mu\text{m}$ e $7.88 \pm 1.08\mu\text{m}$, os ganchos são levemente curvados e fortemente quitinizados, os membros são sustentados por estruturas musculares cônicas. Cauda terminal posteriormente bifurcada medindo $52.80 \pm 7.24\mu\text{m}$ e espinho $14.12 \pm 2.34\mu\text{m}$. Espinhos dorsolaterais ($4.72 \pm 1.03\mu\text{m}$) próximo ao par de membros anteriores. Cadre bucal $19.19 \pm 2.60\mu\text{m}$ de comprimento por $12.55 \pm 2.18\mu\text{m}$ de largura, sem distinção entre regiões. Aparatos de penetração (Figura 03: D) localizados dorso-

anteriormente, o par central com $16.27 \pm 1.90\mu\text{m}$ de comprimento, guarnecidos por dois pares de espinhos cuticulares ($5.74 \pm 1.34\mu\text{m}$). Órgão dorsal localizado na região anterior, com $7.2 \pm 1.11\mu\text{m}$ de diâmetro, rodeado por um número variável de células gigantes. Larva com segmentação visível, com membros não segmentados, curvados ventralmente.

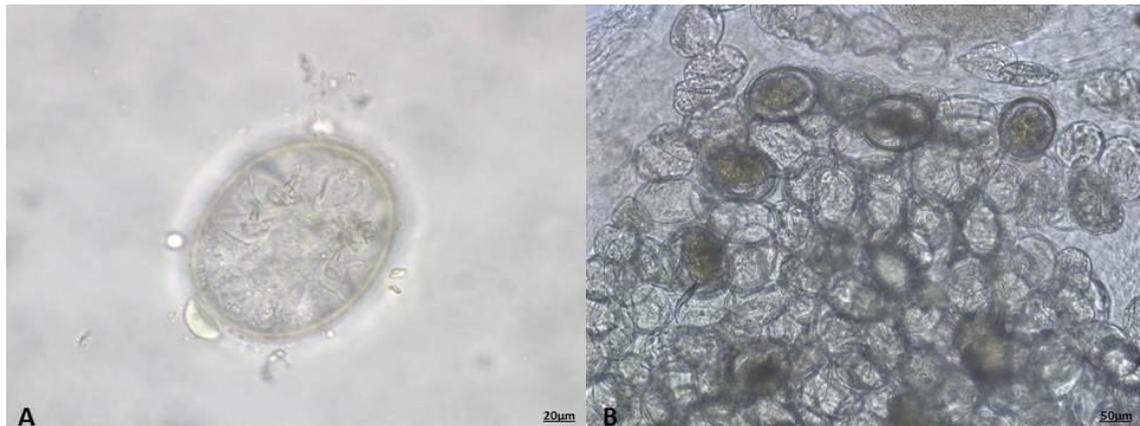


Figura 02 (A e B): Ovos de *Raillietiella mottae*. (A) Ovo com larva (Vista ventral). (B) Ovos embrionados.

Tabela 01. Comprimento (Comp.) e largura (Larg.) disponíveis dos ovos das espécies de *Raillietiella* sp. as medidas são dadas em micrômetros (μ).

Espécie	Comp. (μ)	Larg. (μ)	Hospedeiro	Autor, (ano)
<i>Raillietiella kochi</i>	100	80	<i>Varanus ocellatus</i>	Heymons, (1926)
<i>Raillietiella affinis</i>	80	60	<i>Gecko verticillatus</i>	Heymons, (1935)
<i>Raillietiella chamaeleonis</i>	112	71	<i>Chamaeleo oustaleti / C. verrucosus</i>	Gretillat & Brygoo, (1959)
<i>Raillietiella congolensis</i>	75	50	<i>Thelotornis c.oatesis</i>	Fain, (1961)
<i>Raillietiella schoutedeni</i>	80	60	<i>Monopeltis schoutedeni</i>	Fain, (1961)
<i>Raillietiella boulengeri</i>	85	70	Serpentes do Congo	Fain, (1964)
<i>Raillietiella furcocerca</i>	115	88	<i>Clelia clelia</i>	Esslinger, (1968)
<i>Raillietiella gehyrae</i>	103	60	<i>Mabuya homalocephala</i>	Pence & Canaris (1973)
<i>Raillietiella gigliolii</i>	127	92	<i>Amphisbaena alba</i>	Winch & Riley (1985)
<i>Raillietiella trachea</i>	167	109.5	<i>Gyps bengalensis</i>	Riley et al. (2003)
<i>Raillietiella morenoi</i>	84.2	53	<i>Gallotia atlântica</i>	Abreu-costa et al. (2005)
<i>Raillietiella mottae</i>	97.68	75.05	<i>Phyllopezus periosus/ P. pollicaris</i>	Presente estudo

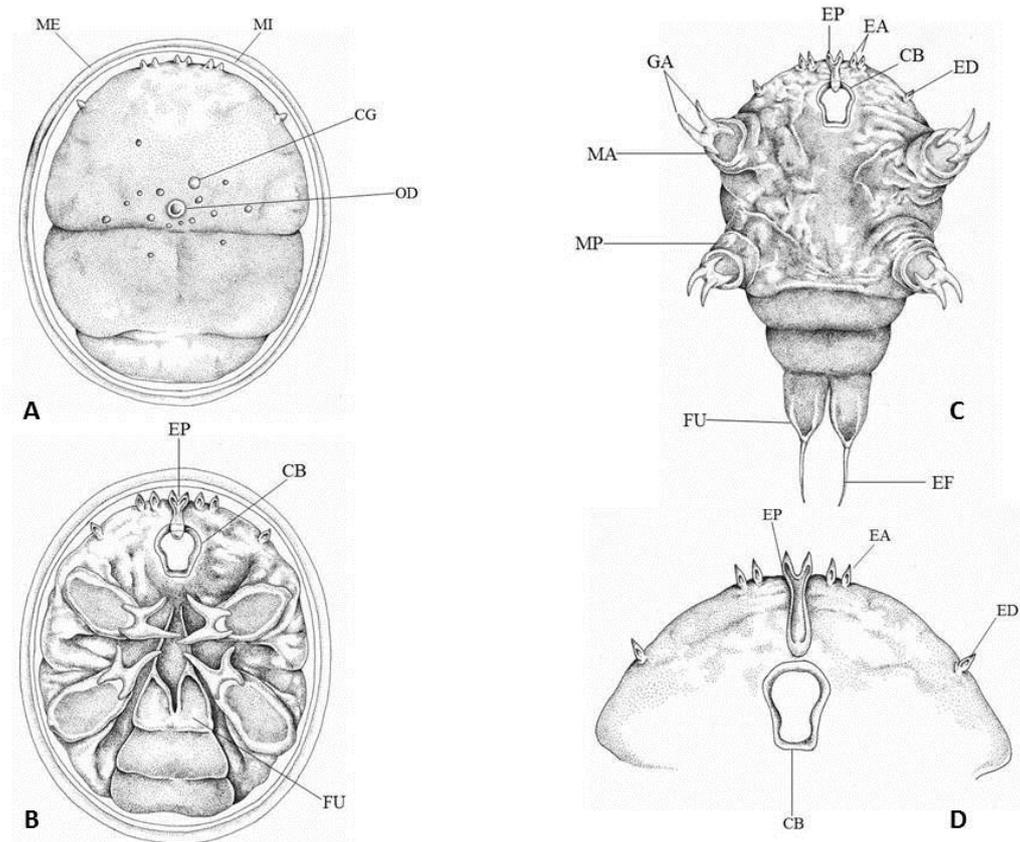


Figura 03 (A, B, C e D): Ovo e larva de *Raillietiella mottae*. (A) Ovo com larva (vista dorsal). (B) Ovo com larva (vista ventral). (C) Larva (vista ventral). (D) Extremidade anterior da larva.

Abreviações: **AE**, espinhos acessórios; **CB**, Cadre Bucal; **CG**, conjunto de células gigantes; **ED**, espinhos acessórios distais; **EF**, espinho terminal da furca; **EP**, espinho de penetração central; **FU**, furca; **GA**, ganchos; **MA**, membro anterior; **ME**, membrana externa; **MI**, membrana interna da casca; **MP**; membro posterior e **OD**, órgão dorsal.

Produção de ovos

Foram realizadas 23 análises de fezes entre janeiro e junho de 2017 e identificados cinco hospedeiros geckos para Pentastomida. Dos 27 espécimes de *P. periosus*, quatro estavam infectados (prevalência 14,8%), e apenas um dos seis espécimes de *P. pollicaris* estava infectado (prevalência 16,6%). Os dados, tamanho da fêmea, ovário e número de ovos, apresentaram distribuições normais ($W = 0,91799$, $p-$

valor = 0,1039; $W = 0,93853$, p-valor = 0,248; $W = 0,96318$, p-valor = 0,609, respectivamente).

Foram contabilizados 687 ovos em 35.75 gramas de fezes, o volume dos ovos não variou entre as espécies de hospedeiros ($Z = 0.216$, p – valor > 0.070). A análise de regressão foi estatisticamente significativa entre o tamanho do parasito/tamanho do ovário (Figura 04: A) ($F = 75.05$, $R^2 = 0.815$, p-valor <0.0001) e entre o tamanho do ovário e número total de ovos (Figura 04: B) ($F = 13.54$, $R^2 = 0.443$, p-valor = 0.0018), fêmeas maiores apresentam maior ovário e maior número de ovos, porém não houve relação entre o tamanho do ovário e volume dos ovos ($rs = 0.124$, p-valor = 0.612).

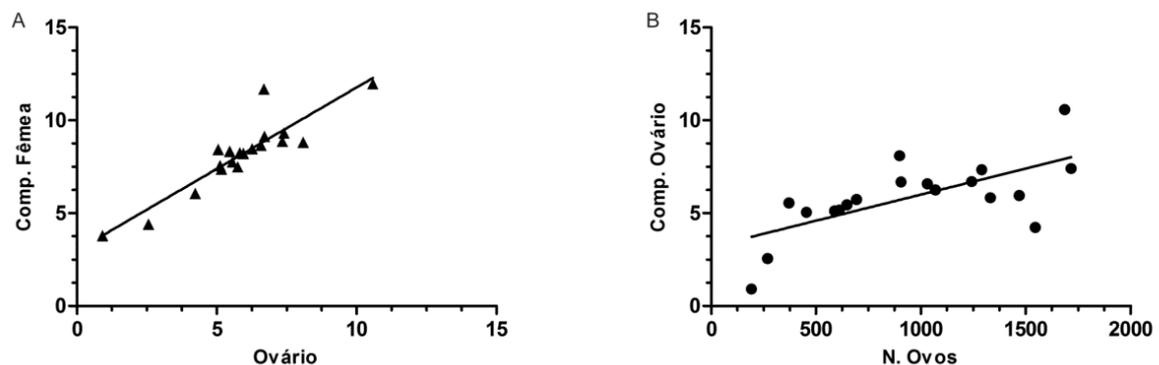


Figura 04 (A e B): Regressão entre o comprimento da fêmea e o comprimento do ovário (A) e entre o comprimento do ovário e o número total de ovos (B) para o pentastomídeo *Raillietiella mottae*, incluindo ovos embrionados e não embrionados. As medidas de comprimento são dadas em milímetros (mm).

Discussão

Morfologia do ovo e embrião

Apesar do gênero *Raillietiella* conter aproximadamente 45 espécies (Christoffersen & De Assis, 2015), informações sobre a produção de ovos e descrição de larvas são escassas. Sabe-se que os ovos de cefalobaenídeos distinguem-se por apresentarem duas membranas, enquanto procefalídeos possuem três, duas membranas

sobrepostas e uma mais externa, a qual forma uma espécie de bolsa no entorno do ovo (Heymons, 1926; Keegan, 1943; Esslinger, 1962, 1968). Em contato com a solução de Sheather forma-se um adensamento de partículas em volta dos ovos de *R. mottae*, este adensamento não faz parte da composição do ovo, sendo facilmente removido por deslocamento da lamínula. O comprimento e largura dos ovos são conhecidos para algumas espécies. No entanto, esses trabalhos não são padronizados, alguns apresentam médias enquanto outros apenas dados brutos, dificultando a comparação entre as espécies.

Esslinger (1968) constatou que certas características, tais como o aparato de penetração e a estrutura da cauda podem ser utilizados como critérios taxonômicos na distinção das espécies do gênero *Raillietiella*. Além disso, espécies das ordens Cephalobaenida e Porocephalida, podem ser separadas com base na morfologia dos ovos embrionados e larvas infectantes, cefalobaenídeos apresentam cadre bucal estreito e alongado e anel bucal completamente fechado, enquanto porocefalídeos apresentam cadre trapezoidal e anel bucal em formato de U (Heymons, 1926; Fain, 1961, 1964; Nicoli & Nicoli, 1966; Esslinger, 1968). O cadre e anel bucal de *R. mottae* apresenta formato e comprimento característico de outros cefalobaenídeos, porém difere de *R. furcocerca* e *R. gehyrae* por apresentar cadre indiviso em região anterior e posterior.

A morfologia geral da larva de é muito próxima da de outros railietielídeos, pois descrições prévias de outras larvas, tais como *R. furcocerca*, *R. gehyrae* e *R. gigliolii*, aplicam-se em geral a larva descrita aqui. As semelhanças mais evidentes que estas larvas possuem em comum são: (I) segmentação corporal. (II) Aparato de penetração localizado dorsoanteriormente. (III) estrutura caudal bifurcada. (IV) Dois pares de membros anterior e posterior, não segmentados. Estes apêndices localizam-se em posição ventrolaterais, com ganchos posteriormente curvados, tais estruturas são de

tamanho desigual para railietielídeos. *R. furcocerca* e *R. gehyrae* apresenta garras fusionadas diretamente no músculo dos membros, enquanto que *R. mottae* apresenta as garras unidas ao músculo através de uma estrutura de base alargada.

O aparato de penetração central é semelhante ao de todos os railietielídeos descritos, apenas pequenas diferenças no comprimento são apontadas, *R. furcocerca* (23µm), *R. gehyrae* (22µm), *R. giglioli* (25µm) e *R. mottae* ($16.27 \pm 1.90\mu\text{m}$), sendo este mais alargado na base e na ponta, com acentuado estreitamento central. Os espinhos cuticulares próximos ao aparato central são ordenados um par em cada lado e um par mais distal situado lateralmente, essa característica é comum a outros railietielídeos, apesar de ser considerado como um terceiro par de espinhos por alguns autores (Fain, 1961; Nicoli, 1963) ou papilas (Heymons, 1926), devido à localização lateral, ao invés de central, essa estrutura pode ser considerada como um par separado do conjunto central, para as espécies *R. furcocerca*, *R. gehyrae* e *R. mottae*.

O órgão dorsal apresenta aspecto uniforme equivalente ao descrito para *R. furcocerca* (ver Esslinger, 1968). No entanto, as células gigantes divergem em quantidade entre as espécies, *R. furcocerca* possui dois pares, enquanto que *Porocephalus crotali* possui apenas um par desse tipo de célula (Esslinger, 1962), já *R. mottae* apresenta um conjunto de número variável (11-18) dessas células. De acordo com Noc (1923), o órgão dorsal secreta uma substância gelatinosa que protege a larva, além da secreção de muco essa estrutura pode estar associada à nutrição do embrião (Riley, 1983).

O comprimento da cauda da larva I pode ser usado para caracterizar gêneros e possivelmente espécies (Esslinger, 1968). Apesar de ser possível a identificação de cefalobaenídeos, railietielídeos e porocefalídeos baseado na observação morfológica dos ovos e larvas, poucas espécies estão descritas e comparações são restritas. No presente

estudo *R. mottae* apresenta 7.24µm de furca, diferindo de *R. furcocerca* com 29µm (Esslinger, 1968).

Produção de ovos

Os ovos são liberados por vários anos através das fezes de seus hospedeiros em *Raillietiella* sp., sendo que estes são ingeridos por insetos coprófagos (hospedeiro intermediário) e futuramente podem ser predados pelo hospedeiro definitivo (vertebrado) (Lavoipierre & Rajamanickam, 1973; Ali & Riley, 1983; Which & Riley, 1985; Bosch, 1986). O padrão de produção e liberação dos ovos difere entre os cefalobaenídeos, *Raillietiella orientalis* pode apresentar cerca de 200000 ovos no ovário, sendo o railietielídeo com o maior número de ovos por fêmea conhecido (Riley, 1983), já as fêmeas de *R. mottae* apresentam entre 371 e 1716 ovos no ovário, uma baixa fecundidade quando comparada a espécies congêneres. Essa diferença pode estar relacionada a fatores ainda desconhecidos quanto ao ciclo de vida e uso de hospedeiros intermediários por *R. mottae*.

Endoparasitos podem maximizar um ou outro traço de acordo com sua estratégia de infecção e hospedeiro definitivo (Daniels et al. 2013). Por exemplo, o copépode *Diaptomus clavipes* investe em ovos maiores e ninhadas menores, nessa espécie, essa característica pode representar uma resposta adaptativa, ovos maiores podem gerar indivíduos maiores sendo estes mais aptos para sobreviver e reproduzir (Cooney & Gehrs, 1980). Dado o tamanho do corpo, fêmeas maiores de *R. mottae* tendem a ter ovários maiores e estes produzem mais ovos, mas com volumes de fêmeas pequenas, ou seja, os ovos não diferem no volume apresentado, mostrando que *R. mottae* investe na quantidade e não no volume dos ovos.

Raillietiella mottae possui produção contínua de ovos, provavelmente essa característica pode estar presente em todas as espécies do gênero (Ali & Riley, 1983; Riley, 1983), os ovos não diferem em volume entre os hospedeiros analisados, embora o uso de diferentes espécies de hospedeiros possa provocar variações no tamanho e produção de ovos para algumas espécies de endoparasitos (Daniels et al. 2013) no entanto, isso não parece ser aplicável para pentastomídeos infectando hospedeiros geckos. Fêmeas de *R. gehyrae* e *R. frenatus* atingem a maturidade e iniciam o período de liberação de ovos quando apresentam entre 4000 e 5500 ovos no ovário com cerca de 25 e 36% desses ovos totalmente embrionados. Em nosso estudo, todas as fêmeas com menos de 20% dos ovos não embrionados não liberam ovos, não sendo possível a identificação da infecção pelo exame de fezes.

A forma de liberação de ovos em *R. mottae*, *R. gehyrae* e *R. frenatus*, diverge de *Reighardia sternaes* nessa espécie, os ovos são retidos no útero até que todos encontrem-se infecciosos (Banaja et al. 1976). Ali & Riley (1983), observaram em *R. gehyrae* que o conteúdo do útero, 4150-8980 ovos em vários estágios de maturidade, são constantemente misturados por ondas de peristaltismo. Uma vez que apenas os ovos infecciosos são liberados, supõe-se que a vagina é dotada de algum tipo de dispositivo de peneiramento que seja capaz de selecionar a passagem de ovos de dimensões apropriadas e ainda impedir a passagem de ovos menores e não desenvolvidos (Ali & Riley, 1983). Ainda não foi possível a localização dessa estrutura, sendo necessária a execução de mais trabalhos para detalhar esse filtro seletivo.

Desenvolvimento larval

O desenvolvimento larval em railietielídeos ocorre progressivamente, comparável ao desenvolvimento em insetos hemimetabólicos onde os estágios

sucessivos das larvas diferem, divergindo também gradualmente (Bosch, 1986). Esslinger (1962), demonstrou que o estágio larval dentro do ovo de *P. crotali* eclode no trato alimentar do hospedeiro intermediário, essa larva migra dentro da cavidade do corpo, invade os tecidos superficiais das vísceras, em seguida a larva muda para se tornar a primeira de uma série de seis estágios, sendo o último infeccioso para o hospedeiro definitivo. Ali & Riley (1983), relataram que em *Blaberus discoidalis*, os ovos de *R. frenatus* e *R. gehyrae* eclodem algumas horas após a ingestão, em seguida as larvas primárias eclodem e migram para a hemocele e depois aparecem rastejando livremente na gordura do corpo, alguns dias após a infecção são observadas larvas de 3º estágio, sendo essas infecciosas para geckos. As larvas infecciosas ingeridas encistam no intestino do hospedeiro definitivo penetram na parede intestinal, rastejam sobre as vísceras e logo após, são encontradas no pulmão. Winch & Riley (1985), observaram fortes semelhanças no desenvolvimento de *R. giglioli* em *Coelosis biloba*, comparando com o desenvolvimento de *R. gehyrae* e *R. frenatus* em geckos. Considerando as semelhanças no desenvolvimento larval entre as espécies congêneres, parece razoável supor que como em *R. gehyrae* e *R. frenatus*, o terceiro estágio larval de *R. mottae* é infeccioso ao hospedeiro final. Ainda não foi possível acompanhar o desenvolvimento de todos os estágios larvais. Contudo, supomos que o desenvolvimento de *R. mottae* no hospedeiro definitivo será semelhante ao desenvolvimento de *R. gehyrae* e *R. frenatus* nas espécies de geckos, onde 5 e 6 mudas seguem para machos e fêmeas, respectivamente.

Conclusões

1. O ovo e a larva I de *R. mottae* assemelha-se a outras espécies de railietielídeos, no entanto apresenta ligeiras diferenças morfológicas;

2. O tamanho do parasito influencia o número total de ovos, mas não interfere no volume dos ovos;

3. O volume dos ovos de *R. mottae* não varia nas espécies hospedeiras *P. periosus* e *P. pollicaris*.

CAPÍTULO 2:

***Raillietiella mottae (Raillietiellidae: Pentastomida) parasita generalista de lagartos
insetívoros: plasticidade fenotípica revelada por dados moleculares***

Resumo

O delineamento de espécies em organismos parasitas pode representar grandes desafios logísticos, especialmente se as características usadas para definição e reconhecimento de espécies forem afetadas pela fisiologia do hospedeiro. A utilização de DNA com finalidades taxonômicas constitui uma importante ferramenta em estudos com táxons de parasitas. Analisamos pentastomídeos de diferentes espécies de lagartos (*Gymnodactylus geckoides*, *Hemidactylus agrius*, *Hemidactylus brasiliensis*, *Phyllopezus pollicaris* e *Tropidurus hispidus*). Os hospedeiros foram coletados na Estação Ecológica de Aiuaba - ESEC Aiuaba (6° 36' S; 40° 08' W), Ceará, Nordeste, Brasil. Foram sequenciados quatro pentastomídeos de diferentes espécies de lagartos, sendo dois com ganchos de ponta romba e dois com ganchos de ponta aguda. O DNA foi extraído do cefalotórax dos indivíduos. Para o grupo externo, utilizamos um espécime de *Raillietiella orientalis*. No presente estudo, foi demonstrado que há plasticidade fenotípica em *Raillietiella mottae*, sendo está relacionada com o tamanho corporal dos parasitas, onde os espécimes maiores possuem ganchos posteriores com ponta rombuda e os espécimes menores, pontas afiadas. Nossos dados avaliam as distâncias moleculares entre os railietielídeos encontrados em diferentes espécies de lagartos da Caatinga brasileira, e com a utilização de análises moleculares esclarecem se estes pertencem a uma única espécie ou se representam um complexo, corroborando com implicações metodológicas para futuros estudos sobre a taxonomia de Pentastomida.

Palavras-chave: Delineamento de espécies, DNA mitocondrial, Caatinga.

Abstract

The design of species in parasitic organisms can be of great logistic importance, especially those used for the definition and recognition of species caused by host physiology. The use of DNA for taxonomic purposes is an important tool in studies with parasite taxa. We analyzed pentastomids of different species of lizards (*Gymnodactylus geckoides*, *Hemidactylus agrius*, *Hemidactylus brasilianus*, *Phyllopezus pollicaris* e *Tropidurus hispidus*). The hosts were collected at the Estação Ecológica de Aiuaba - ESEC Aiuaba (6 ° 36 'S, 40 ° 08' W), Ceará, Northeast, Brazil. Four pentastomids of different species of lizards were sequenced, two with hooks with blunt tip and two with sharp hooks. DNA was extracted from the individuals cephalothorax. For the external group, we used a specimen of *Raillietiella orientalis*. In the present study, phenotypic plasticity was demonstrated in *Raillietiella mottae*, being related to the body size of the parasites, where the larger specimens have hind hooks with a blunt tip and smaller specimens with sharp tips. Our data evaluate the molecular distances between the raillietiellids found in different species of Brazilian Caatinga lizards and with the use of molecular analyzes clarify whether they belong to a single species or represent a complex, corroborating with methodological implications for future studies on the taxonomy of Pentastomid.

Key words: Species delineation, mitochondrial DNA, Caatinga.

Introdução

O delineamento de espécies em organismos parasitas pode representar grandes desafios logísticos, especialmente se as características usadas para definição e reconhecimento de espécies forem afetadas pela fisiologia do hospedeiro (Kelehear et al. 2011). A utilização de DNA com finalidades taxonômicas constitui uma importante ferramenta em estudos com táxons de parasitas, como enfatizado por Thorpe & Solé-Cava (1994). Estes autores destacaram a extraordinária mudança na identificação de parasitas através dos métodos moleculares, já que o processo de reconhecimento pelas características morfológicas é problemático. Um dos fatores que influenciam esta dificuldade é o tamanho desses organismos, geralmente microscópicos. Outra questão é a complexidade do ciclo de vida (envolvendo pelo menos um hospedeiro intermediário), dificultando a manipulação experimental (Kelehear et al. 2014), além da plasticidade fenotípica apresentada por esses grupos.

A classe Pentastomida compreende dois grandes agrupamentos: Cephalobaenida e Porocephalida. Os Cephalobaenida abrangem duas famílias: Reighardiidae com um só gênero e espécie parasita de aves, *Reighardia sterna*, e Cephalobaenidae, que conta com três gêneros: *Cephalobaena*, *Raillietiella* e *Mahafaliella* (Rego, 1983). O gênero *Raillietiella* (Cephalobaenida: Raillietiellidae) compreende cerca de 45 espécies (Christoffersen & De Assis, 2015), é o táxon mais diverso entre os pentastomídeos sendo constituído por pequenos organismos (<25mm) que maturam principalmente nos pulmões dos répteis (Riley, 1986). São organismos dioicos e na fase adulta se alimentam de sangue, obtido dos vasos capilares dos pulmões de seus hospedeiros, podendo causar-lhes patologias, inclusive podendo levá-los a morte (Paré, 2008).

Raillietiella mottae foi primariamente descrita infectando os pulmões de *Tropidurus hispidus* em área de Caatinga no estado do Ceará (Almeida et al. 2008a),

sendo a segunda espécie de pentastomídeo parasita de lagartos descrita no Brasil. Posteriormente foi registrado infectando *Hemidactylus mabouia* em habitações humanas no Ceará (Anjos et al. 2008); *T. hispidus*, *Tropidurus semitaeniatus*, *Phyllopezus periosus* e *Phyllopezus pollicaris* em afloramentos rochosos no estado de Paraíba (Almeida et al. 2008b); *P. pollicaris* em áreas de lajeiros no estado do Piauí (Sousa et al. 2010); *T. hispidus*, *T. semitaeniatus* e *P. pollicaris* em diferentes localidades da Caatinga brasileira (Brito et al. 2014); *P. pollicaris*, *Gymnodactylus geckoides*, *Hemidactylus agrius*, *Lygodactylus klugei* e *Hemidactylus brasilianus* também na Caatinga brasileira (Lima et al. 2018). *Raillietiella mottae* possui um corpo cilíndrico, posteriormente cônico, assemelhando-se superficialmente a *Raillietiella cartagenensis*, apresentado ganchos afiados e eixos curvados nas espículas copulatórias (Almeida et al. 2008a).

Tradicionalmente, as descrições de novas espécies de pentastomídeos tem sido baseadas em características morfológicas, enfatizando-se o tamanho corpóreo, a morfologia dos ganchos, do aparato bucal e das espículas copulatórias masculinas, e o número de anéis corporal dos mesmos (Riley, 1986). Uma revisão das principais características do gênero *Raillietiella* (Ali et al. 1981), e dos principais agrupamentos taxonômicos (Heymons, 1935; Self, 1969) dividiu todas as espécies reconhecidas em sete grupos definidos principalmente pelos hospedeiros em que ocorrem e a morfologia de seus ganchos posteriores. No entanto, características morfológicas dos indivíduos adultos nem sempre parecem ser suficientes para uma classificação taxonômica exata.

Por exemplo, em um estudo realizado por Kelehear et al., (2011), baseado em dados morfológicos tradicionais os autores indicaram duas espécies de pentastomídeos infectando os pulmões de *Rhinella marina*: *Raillietiella indica* e *Raillietiella frenatus*, e uma espécie infectando os pulmões de *Hemidactylus frenatus*: *R. frenatus*. Após a

realização de uma análise molecular os autores constataram que não houve diferença genética entre os espécimes de *Raillietiella* coletados de sapos e lagartos, afirmando que os espécimes em sapos identificados como *R. indica* com base na morfologia do gancho e tamanho corporal, representam estágios iniciais de *R. frenatus*. Colocando o sistema de classificação proposto por Ali et al. (1981) em dúvida.

Dessa forma, estabelecer critérios taxonômicos para organismos parasitas baseando-se em critérios morfométricos é uma estratégia arriscada, podendo gerar dúvidas ou vieses taxonômicos, conduzindo a identificações ambíguas. Nossos dados avaliam as distâncias moleculares entre os railietielídeos encontrados em lagartos no Nordeste brasileiro, e com a utilização de análises moleculares esclarecem se estes pertencem a uma única espécie ou se representam um complexo, corroborando com implicações metodológicas para futuros estudos sobre a taxonomia de Pentastomida.

Objetivos

Objetivo geral

- Avaliar as distâncias moleculares entre os railietielídeos encontrados em lagartos da Estação Ecológica de Aiuaba - ESEC, se estes pertencem a uma única espécie ou se representam um complexo.

Objetivos específicos

- Avaliar se o tamanho corpóreo do hospedeiro influencia na morfometria de *Raillietiella mottae*.
- Avaliar se o tamanho e o formato dos ganchos variam conforme o tamanho corpóreo de *R. mottae*.

Material & Métodos

Coleta dos hospedeiros

Os hospedeiros foram coletados na Estação Ecológica de Aiuaba - ESEC Aiuaba (6° 36' S; 40° 08' O), Ceará, Nordeste, Brasil. A localidade está inserida no domínio Catinga, o qual possui vegetação composta de plantas hipoxerófilas, arbustos, árvores espinhosas e formações abertas, que compreende cerca de 10% do território brasileiro (Andrade-Lima 1981).

Foram coletados um total de 574 hospedeiros, distribuídas em 10 espécies, 8 gêneros e 6 famílias, são eles: Gekkonidae (63 *Hemidactylus agrius*, 24 *Hemidactylus brasilianus*, e 65 *Lygodactylus klugei*); Gymnophthalmidae (11 *Vanzossaura rubricauda*); Mabuyidae (6 *Brasiliscincus heathi*); Phyllodactylidae (71 *Gymnodactylus geckoides* e 132 *P. pollicaris*); Teiidae (58 *C. ocellifer*) e Tropiduridae (81 *T. hispidus*, e 63 *Tropidurus jaguaribanus*).

Os lagartos foram coletados manualmente, por meio de buscas ativas, os espécimes foram transportados ao Laboratório de Zoologia da URCA-LZ, onde foram eutanasiados com uma dose letal de lidocaína, na sequência foram pesados com uma balança de precisão e medidos quanto ao Comprimento Rostro-Cloacal (CRC) e Comprimento Caudal (CC) com um paquímetro digital (0.01). Posteriormente foram dissecados e o trato respiratório foi retirado para análise sob estereomicroscópio, em busca de pentastomídeos, que quando presentes foram armazenados em frascos com álcool absoluto.

Morfometria dos pentastomídeos

Os pentastomídeos encontrados foram montados em lâminas temporárias em meio Hoyer, posteriormente foram mensurados quanto ao comprimento, largura,

dimensões dos ganchos anteriores e posteriores AB e BC e área total. Para obter as medições dos ganchos utilizamos o protocolo adotado por Ali et al. (1981). Todas as medições foram realizadas através do software Zen (versão: x86, 3.7.2270).

Análises moleculares

Foram sequenciados quatro pentastomídeos de diferentes espécies de lagartos, sendo dois com ganchos de ponta romba e dois com ganchos de ponta aguda. O DNA foi extraído do cefalotórax dos indivíduos preservado em etanol, essa região foi escolhida para evitar a contaminação do hospedeiro, e seguindo os protocolos sugeridos por Bruford et al. (1992). Esse protocolo foi realizado nas seguintes etapas: Inicialmente foi cortado um pequeno pedaço de tecido de cada amostra original. O tecido foi colocado em um eppendorf e foi adicionado 410µL de buffer de extração, 80µL de SDS 10% e 1µL de proteinase K. Em seguida as amostras foram levadas para incubação em banho-maria, a uma temperatura de 65°C por 2hs. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5min. em 1300rpm, na sequência o sobrenadante foi transferido para um novo eppendorf, no qual foi adicionado 180µL de NaCL (5M). Depois as amostras foram submetidas a um vortex por 30 segundos. As amostras foram novamente centrifugadas por 5min. em 1300rpm, na sequência o sobrenadante foi imediatamente transferido para um novo eppendorf, onde foi adicionado 420µL de Isopropanol gelado. Mais uma vez as amostras foram centrifugadas por 5min. em 1300rpm, dessa vez houve o descarte do sobrenadante. Neste momento obtivemos o pellet de DNA, o pellet foi lavado mediante adição de 250µL de Etanol 80%. Cuidadosamente o álcool foi removido e o pellet foi conduzido por 20min ao termoblack em 37°C para secagem. As amostras de DNA foram reidratadas adicionando 50µL de H₂O.

Um fragmento de gene foi amplificado por PCR: o citocromo oxidase I (COI - LCO1490 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'/ HCO2198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'). A região foi escolhida devido às características de evolução rápida do DNA mitocondrial, aumentando as chances de encontrar diferenças entre as sequências individuais.

Os protocolos de amplificação seguiram Kelehear et al. (2011), iniciou-se a desnaturação com temperatura de 95°C por 3min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 60 segundos, a temperatura de anelamento foi de 55°C por 60 segundos, 72°C por 105 segundos, e a extensão final de 72°C por 105 segundos. Os produtos de PCR foram visualizados num gel de agarose a 0,8% e foram purificados e sequenciados pela Macrogen, Coréia do Sul. Para o grupo externo, utilizamos um espécime de *Raillietiella orientalis* (número de acesso: KF885746; Kelehear et al. 2014).

As sequências foram verificadas manualmente e depois alinhadas usando o algoritmo ClustalW dentro do Geneious R9 (Thomspon et al. 1994; Kearse et al. 2012), com parâmetros padrão. Depois disso, o programa GBlocks (Talavera & Castresana 2007) foi usado para remover regiões ambíguas do alinhamento, diminuindo o comprimento de 632 para 485bp sob uma rigorosa seleção de blocos (número mínimo de sequências para uma posição conservada: 3; número mínimo de sequências para uma posição de flanqueamento: 3; número máximo de posições contíguas não conservadas: 8; comprimento mínimo de um bloco: 10; posições de folga permitida: nenhuma).

Calculamos as distâncias genéticas pareadas entre todos os espécimes usando o modelo de 2 parâmetros de Kimura com 500 réplicas de bootstrap no MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013).

Análises estatísticas

Para avaliar a relação entre o tamanho dos pentastomídeos e as espécies de hospedeiros coletadas, foi utilizado um modelo linear/não linear (GLM), esta análise foi realizada com a utilização do resíduo entre o CRC dos lagartos e o comprimento dos parasitas. Para anular o efeito da dimensão do hospedeiro em relação ao dos parasitas, o resíduo foi obtido por meio de uma regressão linear entre ambos, onde o comprimento do parasita foi considerado como a variável dependente.

Uma regressão linear simples foi conduzida para verificar se a morfometria dos ganchos varia conforme o tamanho corpóreo dos pentastomídeos. Este mesmo teste foi utilizado para verificar se o tamanho dos ganchos dos pentastomídeos varia conforme a dimensão do hospedeiro, excluindo o efeito do comprimento do parasita. Para isto, foi utilizado o resíduo entre o tamanho corporal do parasita e as variáveis AB, BC e área do gancho. Todas as análises foram realizadas no software X.

Resultados

Somente os lagartos das famílias Gekkonidae, Phyllodactylidae, e Tropicuridae estavam parasitados por pentastomídeos, tendo sido encontrados 71 espécimes distribuídos a 42 hospedeiros (Tabela 01). Dentre os pentastomídeos, 61 indivíduos apresentavam ganchos com ponta afiada (Figura 1A), enquanto 10 apresentavam ganchos com ponta romba (Figura 1B).

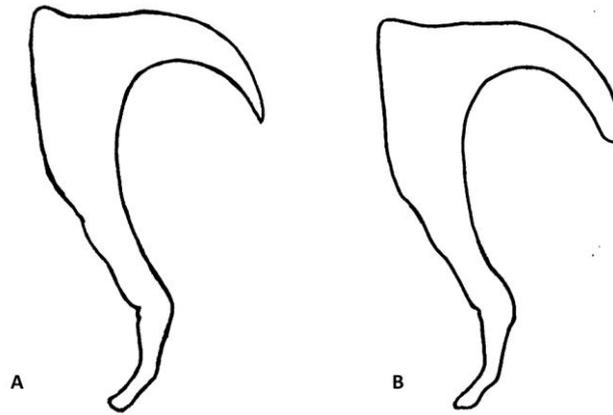


Figura 01: Tipos de ganchos encontrados em *R. mottae* parasitando lagartos na Estação Ecológica de Aiuaba - ESEC Aiuaba. Ganchos com ponta afiada (A) e ponta romba (B).

Tabela 01: Prevalência, Prev. (%), Intensidade média de infecção, Int., e Amplitude, para os lagartos do clado Gekkota da Estação Ecológica de Aiuaba – CE.

Espécie		Prev.(%)	Int. (Range)
<i>Gymnodactylus geckoides</i>	X	1,40%	5 (5)
<i>Hemidactylus agrius</i>	X	28,57%	1,66 (1-5)
<i>Hemidactylus brasilianus</i>	X	4,16%	1 (1)
<i>Phyllopezus pollicaris</i>	X	15,90%	1,9 (1-5)
<i>Tropidurus hispidus</i>	X	2.08%	1(1)

Dois haplótipos foram detectados a partir de sequências de DNA de *R. mottae*. Mas a variação genética foi muito baixa entre o então (K2P distância: 0,0083; locais idênticos: 99,2-100%). Adicionando um espécime de um grupo externo de *R. orientalis* à análise, um haplótipo distinto foi identificado, aumentando bastante a variação genética (distância K2P 0,2607-0,2691; locais idênticos: 77,5-78,1%).

Comparando o tamanho dos espécimes de *R. mottae* coletados nas diferentes espécies de lagartos na ESEC Aiuaba, o resultado do GLM demonstrou não haver diferenças no tamanho dos parasitas dos diferentes lagartos, quando excluído o efeito do

tamanho do hospedeiro (Wald= 5.49; GL= 2; P= 0.06). O GLM também demonstrou que a forma varia conforme a área do gancho, sendo assim ganchos com maiores áreas apresentam ponta romba, enquanto ganchos com área menor apresentam ponta afiada (Wald= 12674; GL= 1; P≤ 0.001) (Figura 02).

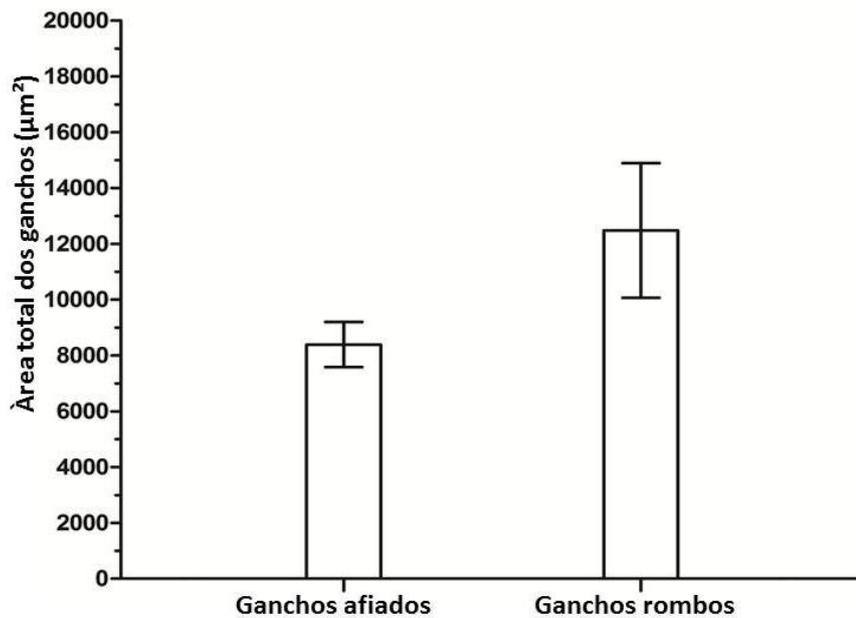


Figura 02: Modelo Linear Generalizado, demonstrando a diferença na área total dos ganchos entre os railietielídeos com ganchos de ponta afiada e de ponta romba.

As regressões lineares demonstraram que os tamanhos dos ganchos variam com o tamanho corporal de *R. mottae*, nas dimensões AB, BC e área total, tanto nos ganchos anteriores quanto nos posteriores (Tabela 02) (Figura 03). Quando os tamanhos dos ganchos foram comparados com os tamanhos corpóreos dos hospedeiros, as regressões não corroboraram com a relação entre o tamanho do hospedeiro e as dimensões AB, BC e área total do gancho anterior, ocorrendo o contrário para as dimensões AB e área total dos ganchos posteriores (Tabela 03) (Figura 04). Porém, parasitas de hospedeiros maiores apresentaram dimensões AB e área total maiores quando comparados com os parasitas de hospedeiros menores. As regressões também confirmam que o tamanho das

espículas copulatórias dos machos não varia de acordo com o tamanho corpóreo total dos railletídeos machos ($F [1, 11] = 0.25$; $R^2 = 0.02$; $P = 0.62$).

Tabela 02: Regressão linear entre o tamanho dos ganchos e o tamanho do corpo dos espécimes de *Raillietiella mottae*.

	F	R ²	P
Gancho anterior			
AB	9.78	0.13	0.002
BC	14.19	0.18	0.0003
Área do gancho	7.03	0.09	0.01
Gancho posterior			
AB	32.31	0.34	0.001
BC	42.69	0.42	0.001
Área do gancho	26.76	0.31	0.001

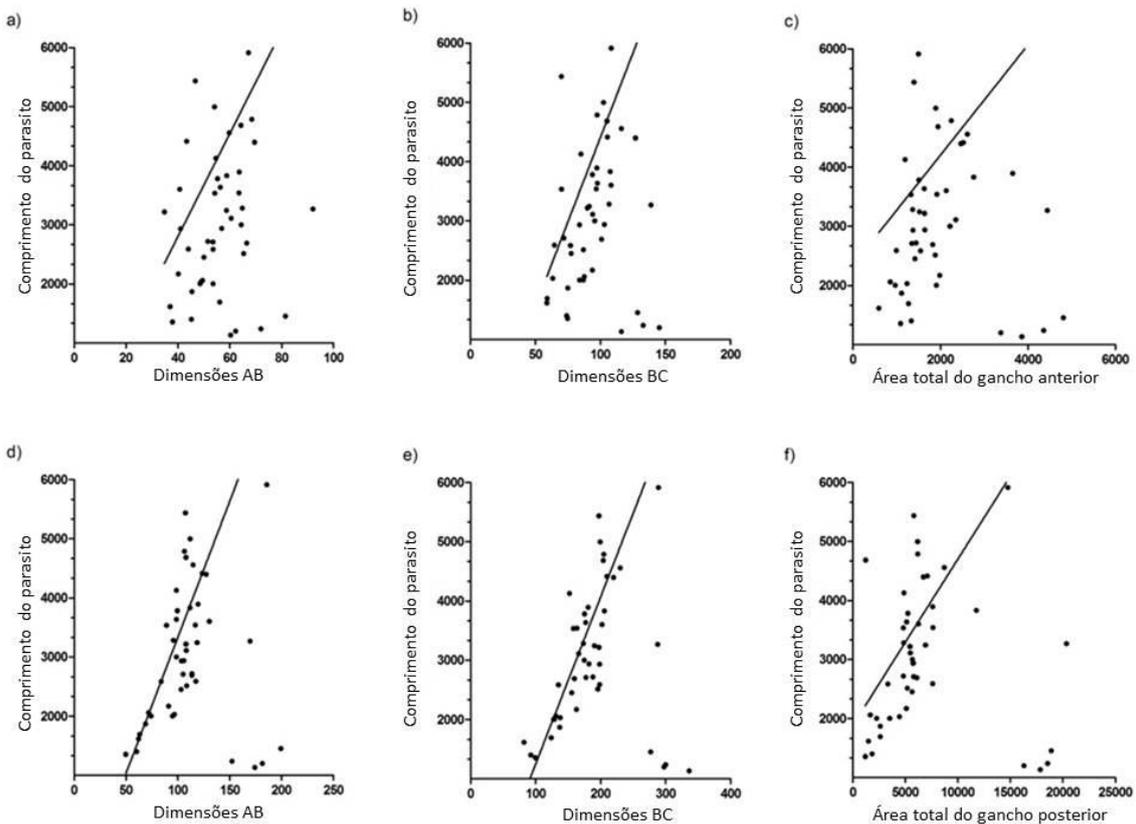


Figura 03: Regressão linear simples entre o tamanho corpóreo de *Raillietiella mottae* e as dimensões dos ganchos, sendo (A, B e C) o comprimento corpóreo e as dimensões AB, BC e área total dos ganchos anteriores e (D, E e F) o comprimento corpóreo e as dimensão AB, BC e área total dos ganchos posteriores.

Tabela 03: Regressão linear simples entre tamanhos dos ganchos dos pentastomídeos e o tamanho dos hospedeiros.

	F	R ²	P
Gancho anterior			
AB	1.003	0.0005	0.32
BC	0.84	0.014	0.36
Área	1.6	0.01	0.21
Gancho posterior			
AB	5.29	0.07	0.02
BC	2.36	0.02	0.12
Área	5.06	0.06	0.02

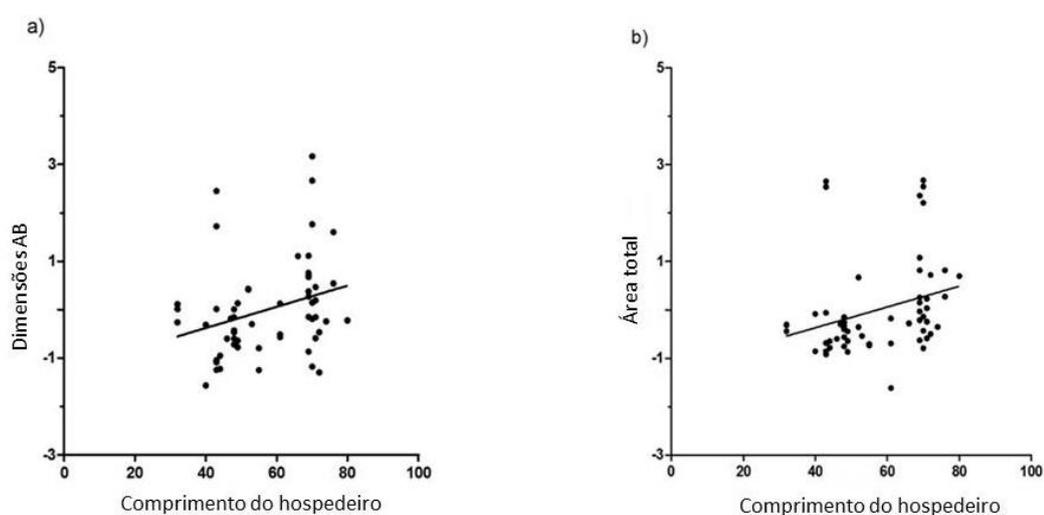


Figura 04: Regressão linear entre a dimensão dos ganchos e o tamanho do hospedeiro, sendo (A) a dimensão AB e o comprimento total do hospedeiro e (B) a área total dos ganchos e o comprimento total do hospedeiro.

Discussão

Raillietiella mottae é reportada primariamente como parasita de lagartos insetívoros na região semiárida do Brasil (Almeida et al. 2008a; 2008b; 2009; Brito et al. 2014a), no presente trabalho foi demonstrado que esta espécie está associada a lacertídeos de três famílias, com as maiores taxas de prevalência nos lagartos *H. agrius* e *P. pollicaris*. Há de se destacar que existem registros de ocorrência de *R. mottae*

nestes hospedeiros na Caatinga (Almeida et al. 2008c; Brito et al. 2014b). Entretanto, o motivo da preferência parasitária nos geckos ainda é incerto.

Utilizando a “deep history hypothesis” como plano de fundo, testada por Pianka & Vitt (2003); Vitt & Pianka (2005), podemos hipotetizar que a diversidade dos pentastomídeos ocorre de forma paralela à dos seus hospedeiros, notando os agrupamentos filogenéticos dos grupos aqui estudados: *H. agrius* e *P. pollicaris* (Gekkota), e *T. hispidus* (Iguania). O padrão geral de infecções por pentastomídeos em lagartos na Caatinga envolve altas taxas de prevalência em lagartos do clado Gekkota e o contrário para os outros clados (ver Almeida et al. 2008c; Sousa et al. 2010; Brito et al. 2014a; Sousa et al. 2014). Apesar de algumas espécies de geckos possuírem dieta e uso de microhabitats similares com os tropidurídeos na Caatinga (Vitt, 1995, Andrade et al. 2013), estes fatores parecem não ser determinantes para que haja equidade de infecção por *R. mottae*.

As características do gancho variam de acordo com o estágio do desenvolvimento (Sakla, 2019), sendo que essas estruturas tem seus tamanhos aumentados após cada muda (Riley, 1986). Em *R. mottae* o tamanho e o formato dos ganchos variam proporcionalmente com o tamanho corpóreo do mesmo. As medidas AB, BC e área dos ganchos anteriores e posteriores dos espécimes de *R. mottae* tiveram um aumento diretamente proporcional ao seu tamanho, importante salientar que a morfometria dos ganchos foi outrora utilizada como um caractere taxonômico para a delimitação de espécies do gênero *Raillietiella* (Ver Self, 1969). Essa característica foi contestada primeiramente por Kelehear et al. (2011), e os dados apresentados neste manuscrito corroboram com a decisão sugerida pelos autores. Os ganchos maiores em parasitas podem ser explicados pela exigência de estruturas mais fortes para que os mesmos consigam manter a sustentação no indivíduo infectado (Simková et al. 2001).

A identificação de espécies baseada em características morfológicas requer conhecimento da extensão da variação de características (Sakla, 2019). Entretanto, as descrições de espécies frequentemente usam poucos espécimes (Riley, 1986). Dessa forma, a faixa de variação morfológica intraespecífica é pouco compreendida (Sakla, 2019). Para evitar artefatos induzidos pela preparação de amostras, Riley (1986) enfatizou o uso de estruturas rígidas, como ganchos e espículas copulatórias. Porém, os dados sobre a morfologia do gancho só devem ser comparados entre os espécimes após a muda final dos mesmos (Ali et al. 1985), e este critério leva em questão saber o que constitui um espécime adulto, e como distinguir se a muda final ocorreu (Kelehear, et al. 2011).

A morfologia das espículas copulatórias é uma característica importante para o reconhecimento de espécies, particularmente entre os railietielídeos, onde as espículas diferem em tamanho, forma e ornamentação da base (Riley, 1986). O tamanho das espículas copulatórias se mostraram invariáveis em relação ao tamanho corporal dos parasitas, assim como o formato curvado e com base arredondada, lembrando uma maçaneta. Dessa forma, reforçamos trabalhos anteriores (Ver, Riley 1986), em que a forma da base das espículas copulatórias é um caractere seguro na identificação de pentastomídeos.

Kelehear et al. (2011) observaram plasticidade fenotípica em *R. frenatus* quando coletados em diferentes clados (anfíbios e lagartos), sendo que essa disparidade foi associada a diferenças na fisiologia do hospedeiro, possivelmente envolvendo disponibilidade de nutrientes e resposta imune do mesmo. Neste trabalho é demonstrado que em *R. mottae* a plasticidade está relacionada com o tamanho corporal dos parasitas, onde os espécimes maiores possuem ganchos com ponta rombuda e os espécimes menores, ponta aguda. No entanto, não houve diferença genética entre os espécimes de

R. mottae analisados. Dessa forma, atribuímos à variação morfológica encontrada ao desenvolvimento do parasito, e presumimos que os pares de ganchos de *R. mottae* muda visivelmente conforme as transições do parasita através de diferentes estágios de desenvolvimento no hospedeiro definitivo. Sendo os espécimes com ganchos de ponta aguda estágios iniciais de *R. mottae*, e os de ponta romba estágios secundários.

Ao anular o efeito do tamanho dos hospedeiros das análises, o comprimento dos indivíduos de *R. mottae* não variou, este dado indica que tanto nos menores indivíduos parasitados quanto nos maiores (onde a população de parasitas é maior), *R. mottae* desenvolve-se normalmente.

Conclusões

1. As análises moleculares confirmam que apenas uma espécie de pentastomida (*R. mottae*) é encontrada parasitando o trato respiratório de cinco espécies de lagartos na ESEC Aiuaba.

2. Os espécimes com ganchos de ponta afiada são estágios iniciais e os de ponta romba são estágios secundários de *R. mottae*.

3. O tamanho e a formato dos ganchos de *R. mottae* variam proporcionalmente com o tamanho corpóreo do mesmo.

4. O tamanho corpóreo do hospedeiro influencia apenas na morfometria dos ganchos posteriores em *R. mottae*.

Referências Bibliográficas

- Abreu-Acosta, N., Rodriguez, P.F., Valladares, B., & Casanova, J.C.** (2005) *Raillietiella morenoi* sp. n. (Pentastomida) from *Gallotia atlântica* (Peters and Doria, 1882) (Lacertidae) in the Canary Islands. *Parasitology Research* **98**, 425-429.
- Ali, J.H., & Riley, J.** (1983) Experimental life-cycle studies of *Raillietiella gehyrae* Bovien 1927 and *Raillietiella frenatus* Ali, Riley and Self 1981: pentastomid parasites of geckos utilizing insects as intermediate hosts. *Parasitology* **86**, 147-160.
- Ali, J.H., Riley, J., & Self, J.T.** (1981) A revision of the taxonomy of the blunt-hooked *Raillietiella*, pentastomid parasites of African, South-East-Asian and Indonesian lizards, with a description of a new species. *Systematic Parasitology* **3**, 103-207.
- Almeida, W.O., Freire, E.M.X., & Lopes, S.G.** (2008a) A new species of pentastomida infecting *Tropidurus hispidus* (Squamata: Tropiduridae) from Caatinga in Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 199-203.
- Almeida, W.O., Santana, G.G., Vieira, W.L.S., & Warderley, I.C.** (2008c) Infection rates of pentastomids on lizards in urban habitats in the Brazilian northeast. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 885-888.
- Almeida, W.O., Santana, G.G., Vieira, W.L.S., Wanderley, I.C., & Ribeiro, S.C.** (2009) Rates of pulmonary infection by pentastomids in lizards species from a *restinga* habitat in northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **69**, 197-200.
- Almeida, W.O., Santana, G.G., Vieira, W.L.S., Wanderley, I.C., Freire, E.M.X., & Vasconcellos, A.** (2008b) Pentastomid, *Raillietiella mottae* Almeida, Freire and Lopes, 2008, infecting lizards in an area of caatinga, northeast, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 631-637.

Andrade, M.J.M., Sales, R.F.D., & Freire, E.M.X. (2013) Ecology and diversity of a lizard community in the semiarid region of Brazil. *Biota Neotropica* **13**,199-209.

Andrade-Lima, D. (1981) The Caatinga Dominion. *Revista Brasileira de Botânica* **4**, 149-153.

Anjos, L.A., Almeida, W.O., Vasconcelos, A., Freire, E.M.X., & Rocha, C.F.D. (2008) Pentastomids infecting an invader lizard, *Hemidactylus mabouia* (Gekkonidae) in Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **68**, 611-615.

Banaja, A.A., James, J.L., & Riley, J. (1976) Some observations on egg production and auto-reinfection of *Reighardia sterna* (Diesing, 1864), a pentastomid parasite of the herring gull. *Parasitology* **72**, 81-91.

Bosh, H. (1986) Experimental life-cycle studies of *Raillietiella* Sambon, 1910 (Pentastomida, Cephalobaenida) the 4th stage larva is infective for the definitive host. *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research* **72**, 673-680.

Brito, S.V., Corso, G., Almeida, A.M., Ferreira, F.S., Almeida, W.O., Anjos, L.A., Mesquita, D.O., & Vasconcellos (2014b) Phylogeny and micro-habitats utilized by lizards determine the composition of their endoparasites in the semiarid Caatinga of Northeast Brazil. *Parasitology research* **113**, 3963-3972.

Brito, S.V., Ferreira, F.S., Ribeiro, S.C., Anjos, L.A., Almeida, W.O., Mesquita, D.O., & Vasconcellos, A. (2014a) Spatial-temporal variation of parasites in *Cnemidophorus ocellifer* (Teiidae) and *Tropidurus hispidus* and *Tropidurus semitaeniatus* (Tropiduridae) from Caatinga áreas in northeastern Brazil. *Parasitology research* **113**, 1163-1169.

Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F., Burke, T., & Hoelzel, A.R. (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprinting. *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach* 225-269.

Christoffersen, M.L. & De Assis, J.E. (2013) A systematic monograph of the Recent Pentastomida, with a compilation of their hosts. *Zoologische Mededelingen* **87**, 1-206.

Christoffersen, M.L., & De Assis, J.E. (2015) Class Eupentastomida Waloszek, Repetski & Maas, 2006. In *Treatise on zoology-Anatomy, taxonomy, biology. The Crustacea*, volume 5, J. C. von Vapuel Klein, M. Charmantier-Daures, & F. R. Schram (eds.). Brill Publishers, Leiden, Netherlands, p. 576.

Cooney, J.D., & Gehrs, C.W. (1980) Effects of varying food concentration on reproduction in *Diaptomus clavipes* Schacht. *American Midland Naturalist* **104**, 63-69.

Daniels, R.R., Beltran, S., Poulin, R. & Lagrue, C. (2013) Do parasites adopt different strategies in different intermediate hosts? Host size, not host species, influences *Coitocaecum parvum* (Trematoda) life history strategy, size and egg production. *Parasitology* **140**, 275-283.

Dias, E.J.R., Vrcibradic, D., & Rocha, C.F.D. (2005) Endoparasites infecting two species of whiptail lizards (*Cnemidophorus abaetensis* and *C. ocellifer*; Teiidae) in a restinga habitat of northeastern Brazil. *Herpetological Journal* **15**, 133-137.

Esslinger, J.H. (1962) Development of *Porocephalus crotali* (Humboldt, 1808) (Pentastomida) in experimental intermediate hosts. *Journal of Parasitology* **48**, 452-456.

Esslinger, J.H. (1968) Morphology of the egg and larva *Raillietiella furcocerca* (Pentastomida) from a colombian snake (*Clelia clelia*). *Journal of Parasitology* **54**, 411-416.

Fain, A. (1961) Les Pentastomides de l'Afrique Centrale. *Annales du Musée Royal de l'Afrique Centrale* **92**, 1-115.

Fain, A. (1964) Observations sur le cycle évolutif du genre *Raillietiella* (Pentastomida). *Bulletin de l'Académie royale de Belgique* **50**, 1036-1060.

Gretillat, S., & Brygoo, E.R. (1959) *Raillietiella chamaeleonis* n. sp. première espèce de Cephalobaenidae (pentastomida) signalée à Madagascar. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **34**, 112-120.

Harrison, L.J.S. (1915) Mallophaga from *Apteryxa* and their significance, with a note on the genus *Rallicola*. *Parasitology* **8**, 88-100.

Heymons, R. (1926) Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Raillietiella* Samb. *Zoologischer Anzeiger* **47**, 45-56.

Heymons, R. (1935) Pentastomida. In: *Bronns Klassen und Ordnungen des Tierreiches*. Leipzig **5**, 1-268.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S.,

Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B.,

Mentjies, P., & Drummond, A. (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data.

Bioinformatics **28**, 1647-1649.

Keegan, H. L. (1943) Observations on the Pentastomid, *Kiricephalus coarctatus* (Diesing) Sambon. *Transactions of the American Microscopical Society* **62**, 194-199.

Kelehear, C., Spratt, D.M., Dubey, S., Brown, G.P., & Shine, R. (2011) Using combined morphological, allometric and molecular approaches to identify species of the genus *Raillietiella* (Pentastomida). *PloS one* **6**:e24936.

Kelehear, C., Spratt, D.M., O'Meally, D., & Shine, R. (2014) Pentastomids of wild snakes in the Australian tropics. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **3**, 20-31.

Lavoipierre, M.M.J., & Rajamanickam, C. (1973) Experimental studies on the life-cycle of a lizard pentastomid. *Journal of Medical Entomology* **10**, 301-302.

Lima, V.F., Brito, S.V., Araujo Filho, J.A., Teles, D.A., Ribeiro, S.C., Teixeira, A.A. M., Pereira, A.M.A., & Almeida, W.O. (2018) *Raillietiella mottae* (Pentastomida: Raillietiellidae) parasitizing four species of Gekkota lizards (Gekkonidae and Phyllodactylidae) in the Brazilian Caatinga. *Helminthologia* **2**, 140-145.

Morand, S., & Krasnov, B.R. (2010) The biogeography of host-parasite interactions. Oxford University Press New York.

Nicoli, R.M. (1963) Phylogénèse et systématique le phylum des Pentastomida. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **38**, 483-516.

Nicoli, R.M., & Nicoli, J. (1966) Biologie des pentastomides. *Annales de Parasitologie Humaine et Comperée* **41**, 77-255.

Noc, F. (1923) Sur l'embryon acariforme et les states larvaires des Linguatulides. *Bulletin De la Société De Pathologie Exotique* **16**, 340-346.

Paré, J.A. (2008) An Overview of Pentastomiasis in Reptiles and Other Vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* **17**, 285-294.

Pence, D.B., & Canaris, A.G. (1973) Observations on the Pentastome *Raillietiella gehyrae* Bovien, 1927 (Cephalobaenida: Cephalobaenidae) from *Mabuya*

homalocephala in Kenya. *Zeitschrift für Parasitenkunde Parasitology Research* **41**, 1-10.

Pianka, E.R. & Vitt, L.J. (2003) *Lizards: windows to the evolution of diversity*. University of California Press.

Poulin, R. (2008) *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

R Core Team. (2011) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rego, A.A. (1983) Pentastomídeos de répteis do Brasil: Revisão dos Cephalobaenidae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **78**, 399-411.

Riley, J. (1983) Recent advances in our understanding of pentastomid reproductive biology. *Parasitology* **86**, 59-83.

Riley, J. (1986) The biology of pentastomids. *Advances in Parasitology* **25**, 45-128.

Riley, J., Oakas, J.L., & Gilbert, M. (2003) *Raillietiella trachea* n. sp., a pentastomid from the trachea of an oriental white-backed vulture *Gyps bengalensis* taken in Pakistan, with speculation about its life-cycle. *Systematic Parasitology* **56**, 155-161.

Sakla, A.J., Detwiler, J.T., Caballero, I.C., Kelehear, C., & Criscione, C. (2019) Recognizing the causes of parasite morphological variation to resolve the status of a cryptogenic pentastome. *Journal of Parasitology* **105**, 432-441.

Self, J.T. (1969) Biological relationships of the Pentastomida; A Bibliography on the Pentastomida. *Experimental Parasitology* **24**, 63-119.

Self, J.T. (2009) Pentastomida: Tongue worms. *In*: Gerald D. Schmidt & Larry S. Robert's Foundations of Parasitology - L. S. Roberts, & J. Janovy (eds.). McGraw-Hill, New York, p. 561-568.

Silva, E.G., Santos, M.E.P., Brito, S.V., Almeida, W.O., & Ribeiro, S.C. (2019) *Raillietiella mottae* (Pentastomida: Raillietiellidae) infecting *Ameiva ameiva* (Squamata: Teiidae) in Araripe Plateau, Northeast Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **79**, 100-103.

Sousa, J.G.G., Brito, S.V., Ávila, R.W., Teles, D.A., Araujo-Filho, J.A., Teixeira, A.A.M., Anjos, L.A., & Almeida, W.O. (2014) Helminths and Pentastomida of two synanthropic gecko lizards, *Hemidactylus mabouia* and *Phyllopezus pollicaris*, in a urban area in Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* **74**, 943-948.

Sousa, J.G.G., Ribeiro, S.C., Roberto, I.J., Teles, D.A. & Almeida, W.O. (2010) Ocorrência de pentastomídeos (Metameria: Ecdysozoa) no lagarto *Phyllopezus pollicaris* (Spix, 1825). *Cadernos de Cultura e Ciência* **4**, 64-71.

Stiles, C. W. (1891) Bau und Entwicklungsgeschichte von *Pentastomum proboscideum* Rud. Und *Pentastomum subcylindricum* Dies. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie* **52**, 85-157.

Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology* **56**, 564-577.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, mst197.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., & Gibson T.J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.

Thorpe, J.P., & Solé-Cava, A.M. (1994) The use of allozyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta* **23**, 3-18.

Vitt, L.J. & Pianka, E.R. (2005) Deep history impacts present-day ecology and biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 7877-7881.

Vitt, L.J. (1995) The ecology of tropical lizards in the Caatinga of Northeast Brazil. *Occasional papers of the Oklahoma Museum of Natural History*, 1-29.

Vrcibradic, D., Rocha, C.F.D., Bursey, C.D., & Vicente, J.J. (2002) Helminth communities of two sympatric skinks (*Mabuya agilis* and *Mabuya macrorhyncha*) from two 'restinga' habitats in southeastern Brazil. *Journal of Helminthology* **76**, 355-361.

Winch, J.M., & Riley, J. (1985) Experimental studies on the life-cycle of *Raillietiella gigliolii* (Pentastomida: Cephalobaenida) in the South American worm-lizard *Amphisbaena alba*: a unique interaction involving two insects. *Parasitology* **91**, 471-481.