



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Comportamiento de evaluación del hospedador en el piojo de
la cabeza *Pediculus humanus capitis***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Isabel Ortega Insaurralde

Director de Tesis: María Inés Picollo

Director Asistente: Ariel Ceferino Toloza

Consejero de Estudios: Pablo Schilman

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones de plagas e insecticidas, UNIDEF-CONICET

Buenos Aires, 2019

Fecha de Defensa: 12-3-19

Comportamiento de evaluación del hospedador en el piojo de la cabeza

Pediculus humanus capitis

Resumen

Se describió el comportamiento y la fisiología sensorial del piojo de la cabeza involucrados en la evaluación de su hospedador. Se estudió el efecto de factores ambientales (temperatura, humedad y luz) sobre el comportamiento de piojos adultos. La actividad locomotora fue mayor en arenas con baja intensidad de luz y estabilizadas a 30 °C. Se estudió el efecto de componentes químicos del cuero cabelludo humano en el comportamiento del piojo. Dichos componentes provocaron el arrestamiento de los piojos pero el tiempo de postlavado ni distintos voluntarios modificó la respuesta comportamental. Se identificaron sensilias con potencial función quimio-, termo-, higo- y mecanorreceptora en las antenas. Se identificó y caracterizó, en el sistema nervioso central de los piojos, el neuropilo donde llegan las proyecciones nerviosas de neuronas de las antenas, el lóbulo antenal. Bajo la ablación de segmentos antenales, se encontró que la detección de estímulos químicos, térmicos e hídricos se concentró en el flagelómero 3. Se identificaron estructuras mecanorreceptoras y potenciales quimiorreceptores de contacto en el aparato bucal del piojo de la cabeza candidatos a evaluar al hospedador. Los piojos de la cabeza detectaron estímulos asociados al hospedador mediante una maquinaria sensorial reducida pero efectiva.

Palabras clave: *Pediculus humanus capitis*, actividad locomotora, estímulos asociados al hospedador, sensilias, lóbulo antenal

Behavior evaluation of the host in the head louse *Pediculus humanus capitis*

Abstract

The behavior and sensory physiology of the head louse involved in host recognition are described. The effect of environmental factors (temperature, humidity and light) on the locomotor activity of the louse was studied to determine the optimal environmental conditions to evaluate behavioral variables. A dim light intensity and 30 °C were the optimal locomotion conditions for head lice. Arrestement of lice at substrates added with human scalp samples was found. Neither the volunteers nor the time after collection of the human scalp samples modified the response of the head lice. Sensilla with potential chemo-, thermo-, hygro- and mechanoreceptor function were identified in the antennae. The antennal projections arborized on a central neuropil identified as the antennal lobe. Following ablation experiments of the different antennal segments, the flagellomere 3 was identified as the responsible for chemical, thermal and hygric stimuli detection. Contact chemoreceptors and mechanoreceptive sensilla in the mouthparts of the head louse were described for the first time. Head lice detected host-associated stimuli through a reduced but effective sensory machinery.

Keywords: *Pediculus humanus capitis*, locomotor activity, host-associated stimuli, sensilla, antennal lobe

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo a:

Rami <3

Oli y Duni <3 <3

Malila y Andrés

Mi familia y amigos

Una infinidad de gracias y ☺☺☺☺ a:

Mis directores Mariné y Ari

Romi y Seba

Todos los nenes que donaron sus piojos

Autoridades de escuelas y hogares

El Cipein

Labo de Fisiología de insectos

Mis consejeros Pablo y Alejandro

Este trabajo de tesis fue financiado con el aporte de las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET)

Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Laboratorio ELEA Phoenix

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| Resumen | 3 |
| Abstract | 4 |
| Agradecimientos | 5 |
| | |
| Introducción general | 13 |
| Como una enfermedad que mató millones de personas posicionó al piojo humano como modelo de estudio | 16 |
| Biología del piojo humano | 20 |
| El piojo de la cabeza versus el piojo del cuerpo | 28 |
| Interacción del piojo de la cabeza con su hospedador: ecología, fisiología y la problemática de la pediculosis | 30 |
| Reconocimiento de claves sensoriales relevantes: desde la detección del estímulo al comportamiento | 36 |
| | |
| Objetivos de esta tesis | 45 |
| Objetivo general | 45 |
| Objetivos específicos | 45 |
| | |
| Hipótesis | 46 |

| | |
|---|--------|
| Capítulo 1: Efecto de las condiciones ambientales y compuestos tóxicos sobre la actividad locomotora de <i>Pediculus humanus capitis</i> | 47 |
| 1.1. Introducción | 49 |
| 1.2. Materiales y métodos | 52 |
| 1.2.1. Insectos | 52 |
| 1.2.2. Cuantificación de la actividad locomotora | 52 |
| 1.2.3. Establecimiento de la temperatura para evaluar su efecto en la actividad locomotora | 55 |
| 1.2.4. Establecimiento de la humedad relativa para evaluar su efecto en la actividad locomotora | 55 |
| 1.2.5. Establecimiento de la luz para evaluar su efecto en la actividad locomotora | 55 |
| 1.2.6. Medición de la actividad locomotora bajo la influencia de compuestos tóxicos | 56 |
| 1.2.7. Análisis estadístico | 60 |
| 1.3. Resultados | 61 |
| 1.3.1. Efecto de la temperatura en la actividad locomotora | 61 |
| 1.3.2. Efecto de la humedad relativa en la actividad locomotora | 62 |
| 1.3.3. Efecto de la luz en la actividad locomotora | 63 |
| 1.3.4. Efecto de compuestos tóxicos en la actividad locomotora | 64 |
| 1.4. Discusión | 68 |
| Capítulo 2: Efecto arrestante de componentes del cuero cabelludo en <i>Pediculus humanus capitis</i> | 73 |
| 2.1. Introducción | 75 |
| 2.2. Materiales y métodos | 77 |
| 2.2.1. Insectos | 77 |
| 2.2.2. Colecta de compuestos del cuero cabelludo humano | 77 |

| | |
|--|---------|
| 2.2.3. Dispositivo experimental | 78 |
| 2.2.4. Efecto de variaciones entre individuos del tiempo post-lavado del cabello en la respuesta comportamental a sustancias provenientes del hospedador | 79 |
| 2.2.5. Influencia del sexo de los piojos en la respuesta comportamental a sustancias provenientes del hospedador | 80 |
| 2.2.6. Variables medidas | 80 |
| 2.2.7. Análisis estadístico | 81 |
| 2.3. Resultados | 82 |
| 2.3.1. Respuesta comportamental de piojos hacia compuestos del cuero cabelludo humano | 82 |
| 2.3.2. Respuesta de los piojos según el tiempo post lavado de cabello y los diferentes voluntarios | 83 |
| 2.3.3. Respuesta comportamental a sustancias del hospedador en machos y hembras | 88 |
| 2.4. Discusión | 93 |
| 2.5. Anexo | 98 |
| Capítulo 3: El rol de la antena de <i>Pediculus humanus capitis</i>: una aproximación morfológica | 101 |
| 3.1. Introducción | 103 |
| 3.2. Materiales y métodos | 105 |
| 3.2.1. Insectos | 105 |
| 3.2.2. Microscopía electrónica de barrido | 105 |
| 3.2.3. Tinción anterógrada | 106 |
| 3.2.3.1. Protocolo de neurobiotina | 106 |
| 3.2.3.2. Protocolo de rodamina dextrano | 108 |
| 3.3. Resultados | 109 |
| 3.3.1. Generalidades de la antena | 109 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.2. Cerdas | 110 |
| 3.3.3. Órganos penacho | 111 |
| 3.3.4. Órganos del poro y el poro simple | 112 |
| 3.3.5. Sensilias basicónicas | 113 |
| 3.3.6. Proyecciones neuronales de la antena al cerebro | 117 |
| 3.4. Discusión | 120 |
| Capítulo 4: El rol de la antena de <i>Pediculus humanus capitis</i>: una aproximación comportamental | 125 |
| 4.1. Introducción | 127 |
| 4.2. Materiales y métodos | 128 |
| 4.2.1. Insectos | 128 |
| 4.2.2. Dispositivo experimental | 128 |
| 4.2.3. Ablación antenal | 129 |
| 4.2.4. Preparación de los estímulos químicos provenientes del hospedador | 130 |
| 4.2.5. Preparación de estímulos hídricos | 130 |
| 4.2.6. Preparación de estímulos térmicos | 130 |
| 4.2.7. Análisis estadístico | 131 |
| 4.3. Resultados | 132 |
| 4.3.1. Función de la antena en la respuesta a estímulos provenientes del hospedador | 132 |
| 4.3.2. Función de la antena en la respuesta a un estímulo hídrico | 134 |
| 4.3.3. Función de la antena en la respuesta a un estímulo térmico | 136 |
| 4.4. Discusión | 138 |
| 4.5. Anexo | 143 |

| | |
|---|-----|
| Capítulo 5: Estudio preliminar de otros órganos sensoriales del piojo de la cabeza involucrados en la detección del hospedador | 151 |
| 5.1. Introducción | 153 |
| 5.2. Materiales y métodos | 155 |
| 5.2.1. Insectos | 155 |
| 5.2.2. Ensayo de alimentación sobre brazo con piojos adultos antenectomizados | 155 |
| 5.2.3. Análisis estadístico | 156 |
| 5.2.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB) | 156 |
| 5.3. Resultados y discusión | 157 |
| 5.3.1. Ensayo de alimentación sobre brazo con piojos adultos antenectomizados | 157 |
| 5.3.2. Sensilias del aparato bucal y cabeza de piojos adultos | 160 |
| 5.3.3. Sensilias de las patas de piojos adultos | 165 |
| 5.3.4. Comparación de la maquinaria sensorial del piojo de la cabeza y otros insectos hematófagos | 165 |
| Conclusiones finales | 181 |
| Referencias bibliográficas | 187 |
| Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis | 202 |

INTRODUCCIÓN GENERAL

El ser humano puede ser parasitado por dos géneros de piojos: *Pediculus* y *Phthirus*. *Pediculus* comprende al piojo de la cabeza (nuestro objeto de estudio) y el piojo del cuerpo. Múltiples autores argumentan fuertemente que los piojos de la cabeza y del cuerpo representan, a lo sumo, subespecies, y que las diferencias morfológicas, de comportamiento y ecológicas entre estos dos grupos de piojos constituyen variaciones naturales intraespecíficas. Ambos tipos de piojos presentan diferencias morfológicas a nivel de coloración y tamaño, comportamientos específicos en relación al hospedador, ocupan nichos distintos y el piojo del cuerpo es vector de enfermedades mientras que el de la cabeza no. La evidencia fósil postula que el piojo de la cabeza estuvo presente en los primeros homínidos y que los piojos del cuerpo aparecieron cuando el hombre empezó a usar ropa. En términos de “popularidad” los piojos del cuerpo fueron responsables de la muerte de millones de personas en los numerosos brotes epidémicos del tifus, mientras que el piojo de la cabeza ha sido el responsable de la pediculosis, enfermedad distribuida en todo el mundo (muy molesta e importante pero no mortal). El desarrollo de esta tesis pretende aportar al conocimiento sobre la biología del piojo de la cabeza, insecto que en sus inicios ha sido relegado científicamente debido a la “popularidad vectorial” del piojo del cuerpo. En el contexto de la interacción del piojo con su hospedador, exploramos el comportamiento y la morfología de los órganos sensoriales del piojo de la cabeza y lo comparamos con los estudios realizados hasta ahora en el piojo del cuerpo. Esta tesis también busca aportar al conocimiento sobre la interacción de un parásito hematófago obligado y su

hospedador y compararlo con otros insectos hematófagos cuya relación con sus hospedadores es más “laxa” y facultativa.

Como una enfermedad que mató millones de personas posicionó al piojo humano como modelo de estudio

El piojo del cuerpo humano mató millones de personas durante los siglos XIX y principios del XX, hecho que instauró su importancia como modelo de estudio.

El tifus es una enfermedad infecciosa causada por bacterias del género *Rickettsia* reportada aproximadamente desde el siglo XIII siempre asociada a guerras y hacinamiento de personas. Los brotes epidémicos ocurrieron repetidamente en los siglos XV, XVI, XIX, XX, en especial durante La Primera Guerra Mundial (Figura 1) (Bechah et al 2008).

Charles Nicolle fue el bacteriólogo francés quien reveló que los piojos del cuerpo eran los responsables de la transmisión del tifus (Gross 1996). En sus observaciones encontró que los pacientes enfermos podían contagiar a otros dentro y fuera del hospital, que sus ropas parecían ser las responsables de diseminar la enfermedad y que además los pacientes dejaban de ser contagiosos cuando se bañaban o se cambiaban la ropa.



Figura 1. Propaganda de Europa del Este promoviendo la concientización del tifus. Durante la Segunda Guerra Mundial, el ejército de Estados Unidos fumigaba a las tropas y a los refugiados con DDT, web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2012/.

Entonces, se preguntó si los piojos serían los responsables de la dispersión de la enfermedad. En junio de 1909, Nicolle demostró su teoría al infectar a un chimpancé con tifus, recuperar sus piojos y colocarlos en un chimpancé sano. En 10 días, el segundo chimpancé también estaba infectado. Con lo cuál concluyó que los piojos eran los vectores del tifus.

Investigaciones posteriores mostraron que la principal vía de transmisión no eran las picaduras del piojo sino el excremento: los piojos infectados con tifus se volvían rojos y morían después de un par de semanas, pero mientras tanto excretaban gran cantidad de bacterias. La infección se producía cuando se frotaba una pequeña cantidad de heces en la piel o los ojos.

Más tarde y en otra parte del mundo, Rudolf Weigl, un biólogo polaco, estudiaba el tifus para desarrollar la primera vacuna (Baumslag 2005).

Weigl dio el siguiente paso y desarrolló una técnica para producir una vacuna contra el tifus al criar los piojos infectados y triturarlos en una pasta. El perfeccionamiento de su técnica llevó años hasta 1933, cuando realizó pruebas a gran escala (www.lwow.home.pl/Weigl).

Criar piojos significaba alimentarlos con sangre, y si era humana, mejor. Al principio, probó su método en conejillos de indias, pero cuando comenzó a realizar pruebas a gran escala en humanos, alimentaba a los piojos con sangre humana dejándolos alimentarse de las piernas de voluntarios a través de dispositivos especialmente diseñados que se ajustaban a la piel (Figura 2).

La primera aplicación importante de su vacuna se llevó a cabo entre 1936 y 1943 por misioneros belgas en China. La vacuna era peligrosa de producir y difícil de hacer a gran escala. Con el tiempo, se desarrollaron otras vacunas que eran menos peligrosas y más económicas.

Actualmente, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el tifus mata una persona de cada 5 millones anualmente.

En el contexto de una enfermedad de proyección mundial, el piojo humano se transformó en un objeto de estudio para varios autores en la primera parte del siglo XX que incluyeron a Nuttall (1917, 1919, 1930), Bacot (1917), Peacock (1918), Wigglesworth (1941), Buxton (1946), etc., que focalizaron su estudio en la ecología y fisiología del piojo del cuerpo humano.



Figura 2. Rudolf haciendo experimentos y poniendo a punto la cría de piojos del cuerpo sobre humanos voluntarios (<http://www.lwow.home.pl/Weigl.html>).

Biología del piojo humano

El piojo humano es un insecto hemimetábolo parásito obligado hematófago que se alimenta exclusivamente de humanos (Buxton, 1946) (Figura 3). Los piojos han estado asociados con los humanos desde los tiempos de nuestros ancestros pre homínidos, y se dispersaron por el mundo a través de los primeros migrantes humanos (Reed et al. 2004).

Pertenecen al orden Phthiraptera, suborden Anoplura que incluye a piojos chupadores de mamíferos.

Los piojos adultos presentan un cuerpo más o menos elongado aplanado dorso-ventralmente, con una cabeza distintiva, tórax corto fusionado y el abdomen segmentado.

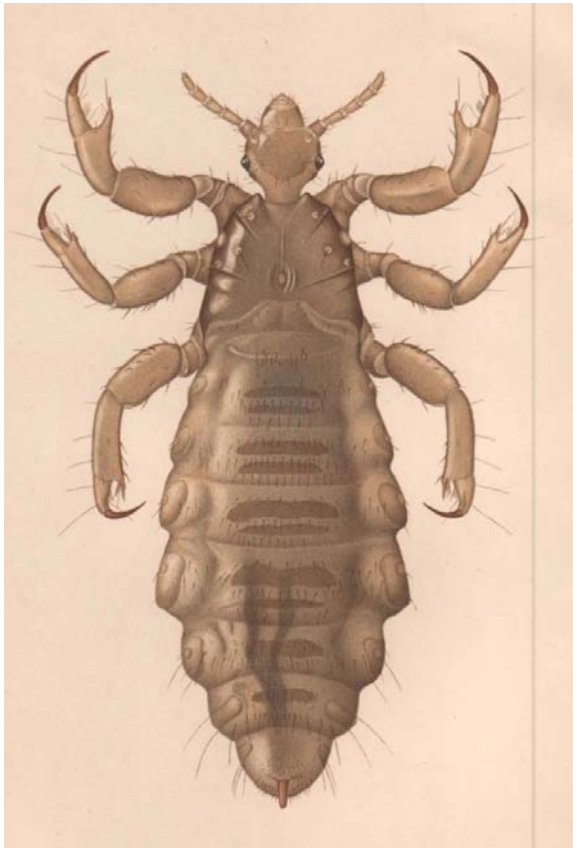


Figura 3. Ilustración de un piojo del cuerpo, Keilin y Nuttall (1930).

El tórax está altamente esclerotizado, las patas son robustas y cortas y poseen segmentos altamente modificados adaptados para moverse entre los pelos del hospedador. El más distintivo de estos es la tibia, que presenta una extensión con forma de pulgar en la punta del lado ventral. Este “pulgar” se opone a una garra móvil que se articula con el ápice de un único segmento tarsal (Figura 4). En el tórax se encuentra un único par de espiráculos. Los espiráculos abdominales son más pequeños y presentan una estructura interna más compleja (Figura 4).

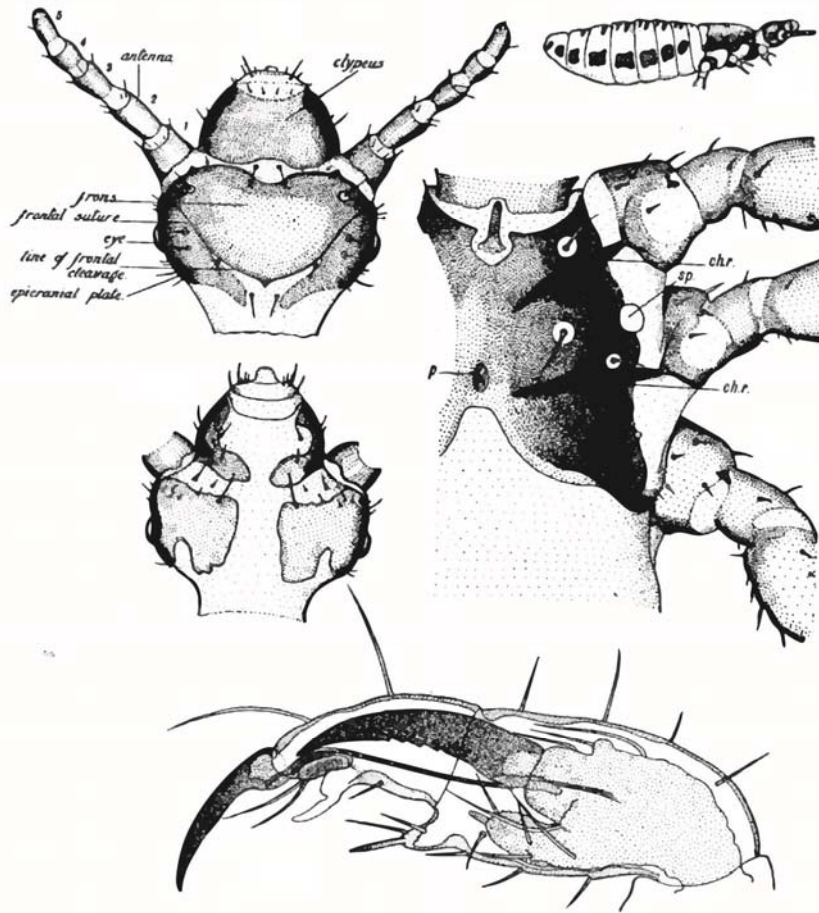


Figura 4. Ilustración perteneciente a Estudios Iconográficos del piojo humano de Keilin y Nuttall (1930) donde se observa en detalle la cabeza y antenas de un piojo del cuerpo humano, la ubicación de los espiráculos de un piojo de la cabeza (piojo en posición lateral) y el detalle de una porción final de la pata de un piojo del cuerpo humano.

La estructura y función de los órganos sensoriales del piojo del cuerpo humano han sido investigadas por Keilin y Nuttall (1930), Wigglesworth (1941), Miller (1969), Slifer y Sekhon (1980) y Steinbrecht (1994) entre otros (Figura 5 y 6). La cabeza presenta un par de antenas con cinco segmentos cada una y un par de ocelos simples como ojos. La **antena** del piojo del cuerpo está formada por un pedicelo (segmento 1), un escapo (segmento 2) y un flagelo formado por tres flagelómeros (segmentos 3, 4 y 5) y está cubierta por un número reducido

de pelos o estructuras sensoriales en comparación con la antena de otros insectos. Las estructuras sensoriales descritas en las antenas de los piojos del cuerpo son los órganos clavija (*del inglés peg organs*), órganos penacho (*del inglés tuft organs*), órganos del poro (*del inglés pore organs*), cerdas y órganos escolopidiales. Los órganos clavija son pelos sensoriales con forma de clavija. Están limitados al extremo distal del quinto segmento de la antena, donde puede haber entre nueve y diez. Algunos pelos presentan una proyección aguda mientras que otros pueden ser romos; poseen una pared fina y se encuentran conectados con un grupo de células sensoriales. Fueron postulados como quimiorreceptores por Slifer y Sekhon (1980) en el piojo del cuerpo. Los órganos penacho son dos y están presentes en el cuarto y otro en el quinto segmento de la antena. Cada uno consiste en un pequeño conglomerado de pelos que se ubica en una depresión no muy profunda; la base está conectada aparentemente por un filamento con un grupo de células sensoriales. Fueron estudiados exhaustivamente por Steinbrecht en 1994 en el piojo del cuerpo, que los postuló en base a estudios morfológicos, como termohigroreceptores. Los órganos del poro se observaron por primera vez por Miller (1969). En el piojo del cuerpo se reportaron dos órganos en el quinto segmento de la antena. Consistían en una serie de hendiduras múltiples que rodean una pequeña abertura central. Basados en su morfología, se postuló que tendrían la función dual de receptores térmicos y olfativos (Steinbrecht, 1994). Las cerdas se encuentran distribuidas en pequeño número en todos los segmentos de la antena. Presentes en la mayoría de los insectos, cada una consiste en un pelo fino articulado conectado con una célula sensorial con función mecanorreceptora.

Por último, los órganos escolopidiales se encuentran dentro del segundo segmento (pedicelo) y poseen potencial función propiorreceptiva que darían al insecto información sobre la posición de la antena.

No se ha encontrado dimorfismo sexual en las estructuras sensoriales presentes en las antenas de machos y hembras (Slifer y Sekhon, 1980).

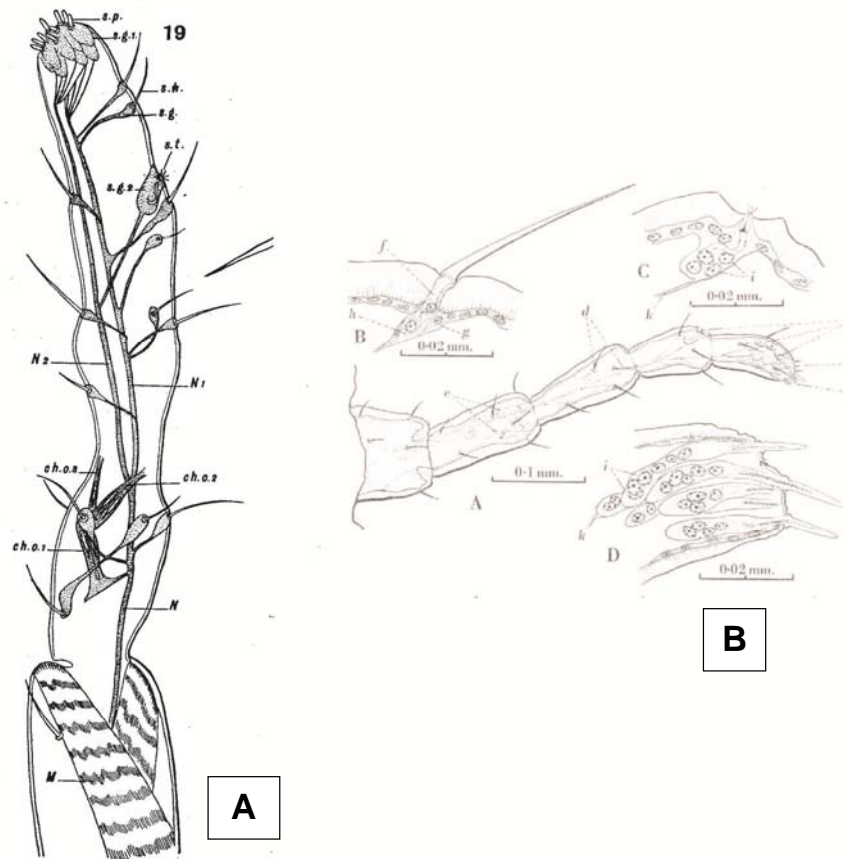


Figura 5. Ilustraciones de la antena de un piojo del cuerpo en Keilin y Nuttall (1930) (A) y en Wigglesworth (1941) (B). (A) Se observa el nervio antenal cruzando la antena de distal a proximal y las células sensoriales subyacentes a los pelos sensoriales. (B) Se observan en detalle la estructura de una cerda (B), un órgano del penacho (C) y de los órganos clavija (D).

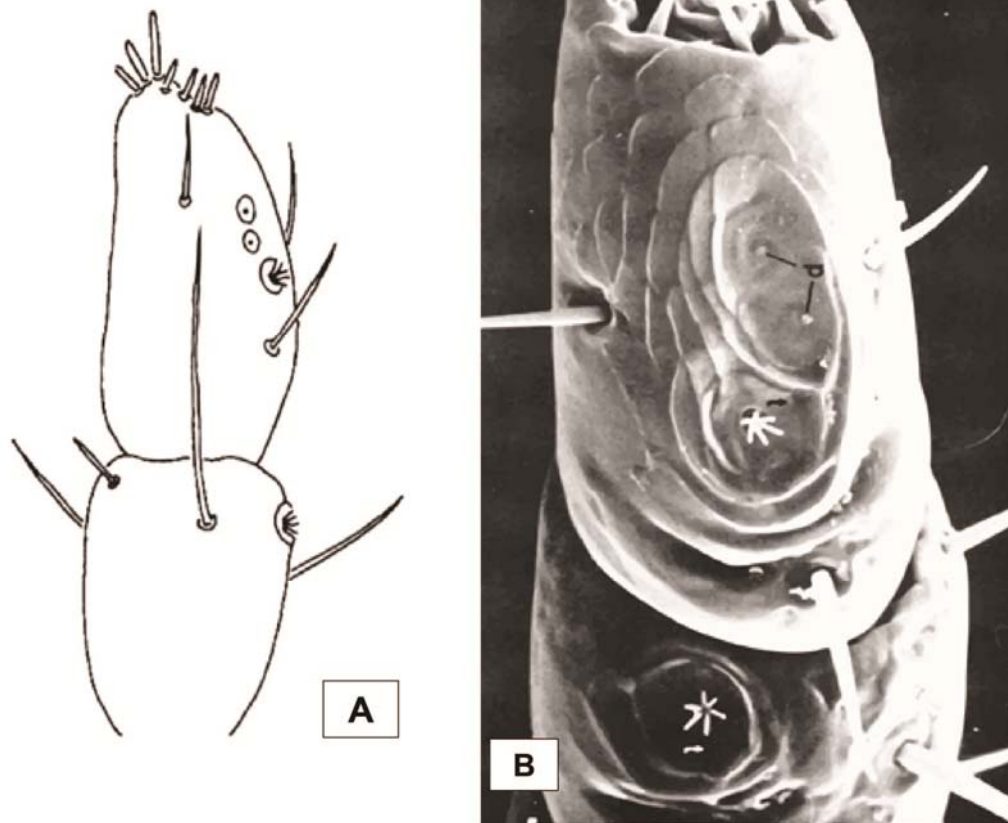


Figura 6. (A) Ilustración de las estructuras sensoriales en los últimos dos segmentos de la antena del piojo del cuerpo, Slifer y Sekhon (1980). (B) Imagen obtenida por microscopía electrónica de barrido de los últimos dos segmentos de la antena de un piojo del cuerpo, Steinbrecht (1994).

Como ocurre con otros insectos chupadores de sangre, el aparato bucal del piojo está modificado en forma de estiletes que se encuentran totalmente retraídos en la cabeza cuando no están en uso pero que se evaginan por acción muscular cuando la boca toca la piel del hospedador en el momento de la alimentación (Peacock, 1918). En la región anterior de la cabeza existe un

pequeño tubo, el haustelo, que está formado por el labio; es blando, eversible y armado con dentículos o pseudo dientes (Figura 7). La parte del canal alimentario que yace dentro de la cabeza está separada en cuatro regiones (Figura 8A). La más anterior es el embudo bucal relativamente rígido. En el piso del embudo bucal se encuentra la apertura del saco de estiletes, que es ciego. Dentro de este saco se encuentran tres estiletes, uno de ellos conectado con el ducto salivar (Figura 8B). Los tres son capaces de ser movidos hacia adelante y atrás a través del prestomum por los músculos protractores.

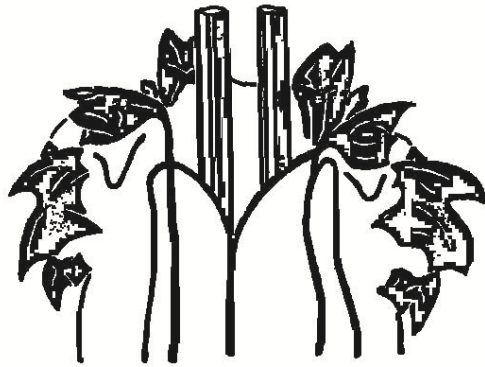


Figura 7. Porción anterior del haustelo del piojo del cuerpo donde se observan los dentículos evertidos, Peacock (1918).

Detrás se encuentra la bomba cibarial, y la bomba faríngea (que consisten en músculos muy poderosos que le permiten al insecto succionar sangre). Detrás de la parte posterior de la faringe se encuentra el esófago que es fino y no muscular.



El piojo de la cabeza versus el piojo del cuerpo

Los piojos encontrados en la cabeza humana usualmente difieren de aquellos encontrados en el cuerpo y las ropas, y fueron nombrados como especies distintas (*capitis* y *corporis*) por De Geer (1767) antes del final del siglo XVIII. Más tarde, Nuttall (1919) los propuso como subespecies y no como especies distintas. Actualmente, se denomina al piojo de la cabeza como *Pediculus humanus capitis* y al del cuerpo como *Pediculus humanus humanus* (ex *P. humanus corporis* y *P. humanus vestimentī*) y ambos son considerados por la mayoría de los autores como ecotipos de la misma especie (Light et al 2008). Ambos ecotipos comparten el mismo genoma, difiriendo solo en un gen que está presente en el piojo del cuerpo y no en el piojo de la cabeza. Adicionalmente, otros estudios genéticos sugieren que, con la excepción de un solo gen, ambos ecotipos parecen diferir en la expresión génica y no en contenido de genes, provocando diferentes fenotipos de acuerdo a las condiciones ambientales (Tovar-Corona et al 2015). Li y colaboradores (2010) proponen que los estudios genéticos hasta la fecha apoyan la teoría que los piojos tienen la potencialidad de pasar de un tipo de ecotipo a otro en situaciones particulares como por ejemplo, infestaciones masivas.

La antena constituye una característica morfológica que permite distinguirlos, siendo más corta y ancha en *capitis*. Los piojos de la cabeza suelen ser más chicos que los del cuerpo a pesar que se han encontrado variaciones. Los piojos de la cabeza se encuentran en general más pigmentados, sin embargo la profundidad del color depende del color del contexto donde el insecto se cría,

inclusive se puede observar frecuentemente que el cuerpo de un solo insecto está pigmentado en diferentes grados. Los piojos de la cabeza se reconocen en general por las hendiduras entre los sucesivos segmentos abdominales que están más marcados que en los piojos del cuerpo; esto es debido a la placa pleural quitinosa que cubre esa parte del segmento. Además, las patas de *P. humanus capitis* son más cortas que las de *P. humanus humanus* (Veracx y Raoult, 2012).

En general, ambas subespecies presentan tasas de desarrollo similares, pero la mortalidad pre-imaginal (es decir de los estadios previos al adulto) es mayor para los piojos de la cabeza. Además, éstos son más susceptibles a morir por los ayunos comparados con los piojos del cuerpo, los cuales están adaptados a estar periódicamente en las ropas abandonadas de sus hospedadores. El piojo de la cabeza mostró, en estudios de laboratorio, una menor producción de huevos y menor porcentaje de eclosión de huevos que los piojos del cuerpo (Veracx y Raoult, 2012).

La capacidad vectorial es la principal diferencia entre estos piojos humanos. Los piojos del cuerpo son responsables de la transmisión de al menos tres bacterias: *Rickettsia prowazekii*, el agente etiológico del tifus epidémico, *Bartonella quintana* que causa la fiebre de la trinchera y *Borrelia recurrentis* que causa la fiebre recurrente. Los piojos de la cabeza no son considerados vectores de enfermedades en humanos (Veracx y Raoult, 2012).

Interacción del piojo de la cabeza con su hospedador: ecología, fisiología y la problemática de la pediculosis

Los piojos necesitan alimentarse en modo relativamente frecuente y por eso deben permanecer sobre el hospedador. Para alimentarse, el piojo se dispone sobre la piel del hospedador y prueba hasta encontrar un capilar sanguíneo luego de haber inyectado saliva en la herida para prevenir que la sangre se coagule mientras succiona la mezcla de fluidos. Como la cutícula del piojo es parcialmente transparente, la sangre que ingresa se puede ver como un hilo pasando a través de la cabeza, mientras ésta se bombea desde la boca a la porción media de los intestinos (Heukelbach 2010). El piojo necesita como mínimo alimentarse de sangre seis veces al día para asegurar su supervivencia sobre el hospedador (Burgess et al 1995). Los piojos que se remueven del hospedador pueden mantenerse activos en un ambiente húmedo y frío alrededor de un día sin alimentarse. Si vuelven al hospedador al cabo de unas horas, son capaces de volver a alimentarse y reestablecerse. Sin embargo, si pasan entre 3 y 18 horas fuera del hospedador, se vuelven incapaces de tomar sangre, probablemente porque la deshidratación sostenida les impide producir suficiente saliva para prevenir que la sangre se coagule. Esto ocurre porque poseen un manejo fisiológico del agua bastante particular. A diferencia de la mayoría de los insectos hematófagos, los piojos producen heces secas y en su lugar, compensan la gran entrada de agua durante la alimentación mediante la transpiración a través de su sistema respiratorio. Sin embargo, parecería que este mecanismo no se puede apagar, lo que provoca que piojos no

alimentados y/o fuera de su hospedador por un largo periodo de tiempo se vuelvan inviables rápidamente (Heukelbach 2010).

El ciclo de vida de un piojo de la cabeza se observa en la Figura 9, mostrando un huevo, tres estadios ninfales y los adultos. Estos últimos copulan rápidamente luego de completar la última muda, aunque las hembras, en general, no hacen la puesta de huevos hasta que pasen 24 horas en el estadio adulto (Takano Lee et al 2003). Los machos intentan copular con la mayoría de los piojos que cumplen con el tamaño apropiado, incluyendo hembras adultas, otros machos e inclusive ninfas del estadio 3 bien desarrolladas. Tras la concreción de la cópula, las hembras solo ponen un huevo por vez porque cada uno es tan grande que ocupa hasta el 20 % del volumen abdominal. Las hembras sujetan sus huevos a los pelos en cercanía al cuero cabelludo utilizando una secreción de glándulas accesorias que se abren al oviducto. El material fijador, que no se trataría de un pegamento “químico” sino que sería un aglomerado de moléculas peptídicas, es extremadamente resistente y mantiene al huevo en su lugar durante el desarrollo total del embrión y mucho tiempo después inclusive (Burkhart y Burkhart 2005).

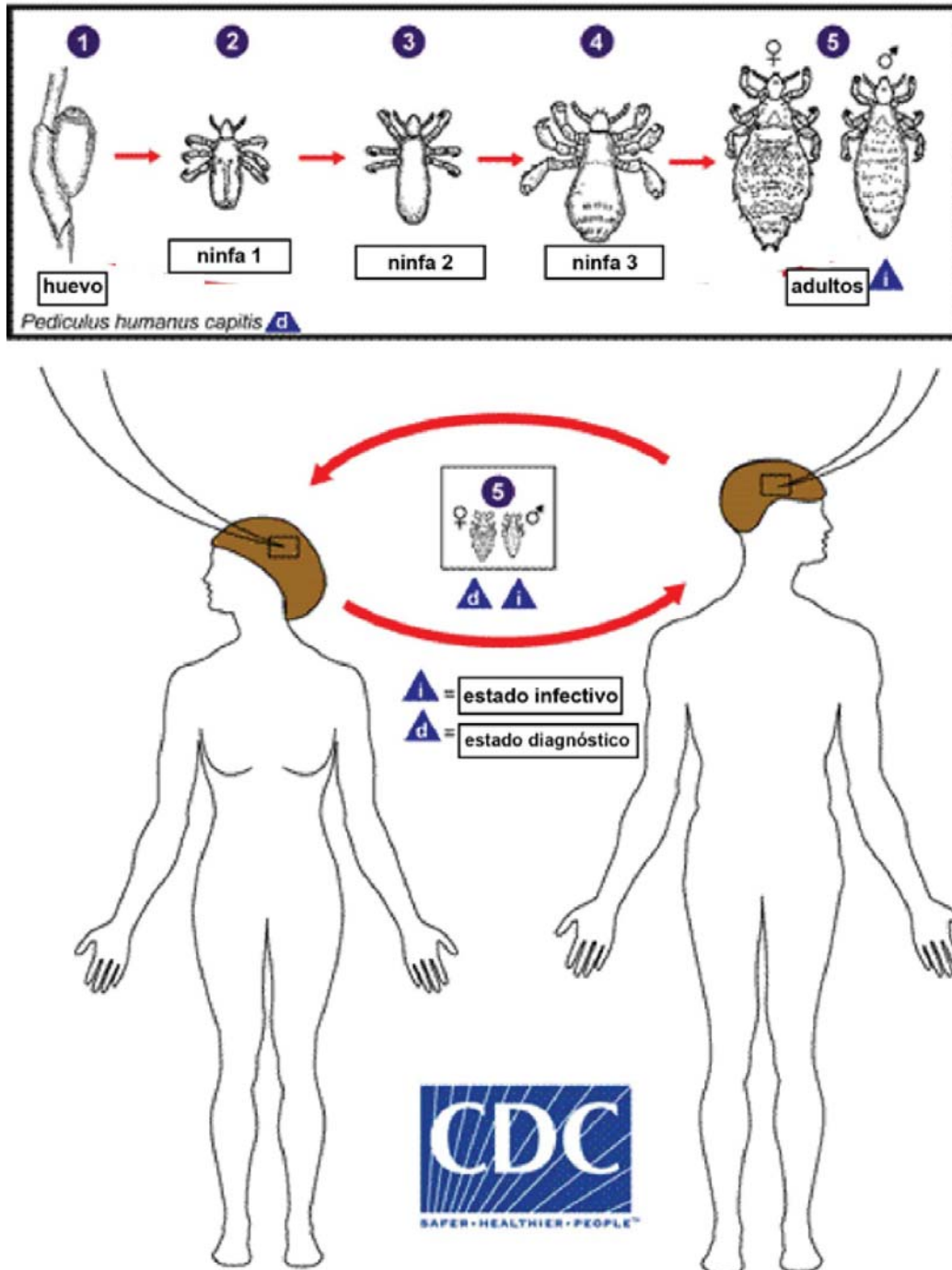


Figura 9. Ciclo de vida de *Pediculus humanus capitis*, www.cdc.gov.

Se reportó que los huevos eclosionan en 5-6 días a 36 ± 2 °C. Las ninfas 1 que nacen de esos huevos se alimentan rápidamente luego de la emergencia. El tiempo que implica el desarrollo de ninfa 1 a 3 es aproximadamente 9 días.

Físicamente, las ninfas son muy similares a los adultos con excepción del tamaño menor, la menor segmentación en el abdomen, los flagelos de las antenas fusionados y ninguna diferenciación sexual externa.

Cuando los piojos no se alimentan, se aparean o ponen huevos, pasan la mayor parte del tiempo en un estado relativamente inactivo. La mayoría de los estadios de vida se sostienen fuertemente de los pelos con las garras de todas sus patas, alineando sus cuerpos con la hebra de pelo con sus cabezas apuntando hacia el cuero cabelludo. Esta posición le permite moverse hacia atrás y hacia adelante a lo largo del pelo con facilidad.

La transferencia entre hospedadores se inicia cuando el pelo es perturbado, lo que estimula a aquellos piojos que se encuentran en estado fisiológico óptimo, a moverse a las capas externas del pelo. Las ninfas 1 y 2 son menos activas que los estadios más desarrollados y en general tienden a mantenerse cerca del cuero cabelludo provocando que sea menos probable su transferencia a un nuevo hospedador. El comportamiento de dispersión es mayor a partir de la ninfa 3, siendo los machos los más móviles en la búsqueda de parejas para aparearse (Heukelbach 2010).

El lapso de vida de un piojo adulto probablemente dependa más de los riesgos presentes en su ambiente que a otros factores más intrínsecos: la mortalidad es alta cuando el hospedador se rasca, peina y lava el pelo de su cabeza. Consecuentemente, los piojos de la cabeza sobreviven principalmente porque sus hospedadores no son conscientes de su presencia. Los piojos de la cabeza se encuentran maravillosamente adaptados a su ambiente tan acotado y particular que les permite explotarlo con alta eficiencia, razón por la cual han

sobrevivido por miles de años a pesar de los esfuerzos del hombre para erradicarlos.

Los piojos de la cabeza son insectos cosmopolitas, y las infestaciones son de distribución mundial. La enfermedad producida por la presencia de piojos de la cabeza sobre el cuero cabelludo humano se denomina *Pediculosis capitis*, pudiendo ser asintomática o causar síntomas como prurito y consecuentes infecciones bacterianas secundarias productos del rascado.

La prevalencia varía considerablemente entre poblaciones, género, grupo etario y según factores comportamentales dentro de una población. La mayor ruta de transmisión es el contacto cabeza con cabeza entre hospedadores y en menor medida la transmisión mediante fómites, es decir mediante el uso de objetos inanimados como peines, toallas, sábanas, vinchas, etc. Personas con infestaciones activas poseen piojos vivos y/o embriones vivos dentro de los huevos sujetos a las hebras de pelo en la zona cercana al cuero cabelludo. Las infestaciones inactivas no presentan piojos vivos ni huevos, o huevos vacíos que siguen sujetos a los pelos del hospedador. La *pediculosis* inactiva es solo evidencia de una infestación pasada y no representa un riesgo para la transmisión.

La remoción mecánica de los piojos y sus huevos con peines finos es uno de los métodos más antiguos conocidos para el control de la infestación. Cuando las infestaciones son masivas, el uso del peine se complementa con formulados insecticidas denominados *pediculicidas*. Los compuestos *pediculicidas* con efecto neurotóxico más usados sobre los insectos son los insecticidas piretroides y los organofosforados. Los piretroides bloquean la

repolarización de los canales de sodio de las neuronas, llevando a la parálisis y posterior muerte de los insectos. Los organofosforados, como por ejemplo el malatión, son inhibidores irreversibles de la colinesterasa, produciendo parálisis respiratoria en el piojo y posterior muerte. En los últimos años, la incidencia de piojos resistentes a piretroides y al malatión (Burgess 2004) llevó a la búsqueda de insecticidas alternativos para controlar las infestaciones, entre ellos los basados en tratamientos “físicos” con aceite de silicona como ingrediente principal en sus formulados (Burgess 2009). El aceite de silicona envuelve toda la superficie del piojo entrando al tracto respiratorio, bloqueando los espiráculos y las tráqueas lo que provoca la asfixia del piojo. Si bien la eficacia pediculicida de la mayoría de los insecticidas del mercado es bastante alta, la reinfestación es un problema crítico en el control de la pediculosis. La reinfestación depende exclusivamente de la falta de repelentes efectivos, es decir de sustancias que impidan la colonización del nuevo hospedador. En la actualidad, la oferta de productos repelentes es escasa y poco eficaz siendo los más populares aquellos basados en aceites esenciales (Heukelbach 2010).

El conocimiento de las claves químicas y físicas producidas por el hospedador que intervienen en la comunicación con los piojos son de vital importancia para el desarrollo potencial de tratamientos alternativos para evitar la reinfestación.

Reconocimiento de claves sensoriales relevantes: desde la detección del estímulo al comportamiento

Independientemente de los organismos involucrados en una determinada interacción, la comunicación entre organismos o entre organismos y su ambiente, tiene lugar tras una cadena de eventos más o menos compleja que va desde la emisión de un estímulo proveniente de un organismo emisor hasta la respuesta comportamental de un organismo receptor (Figura 10).

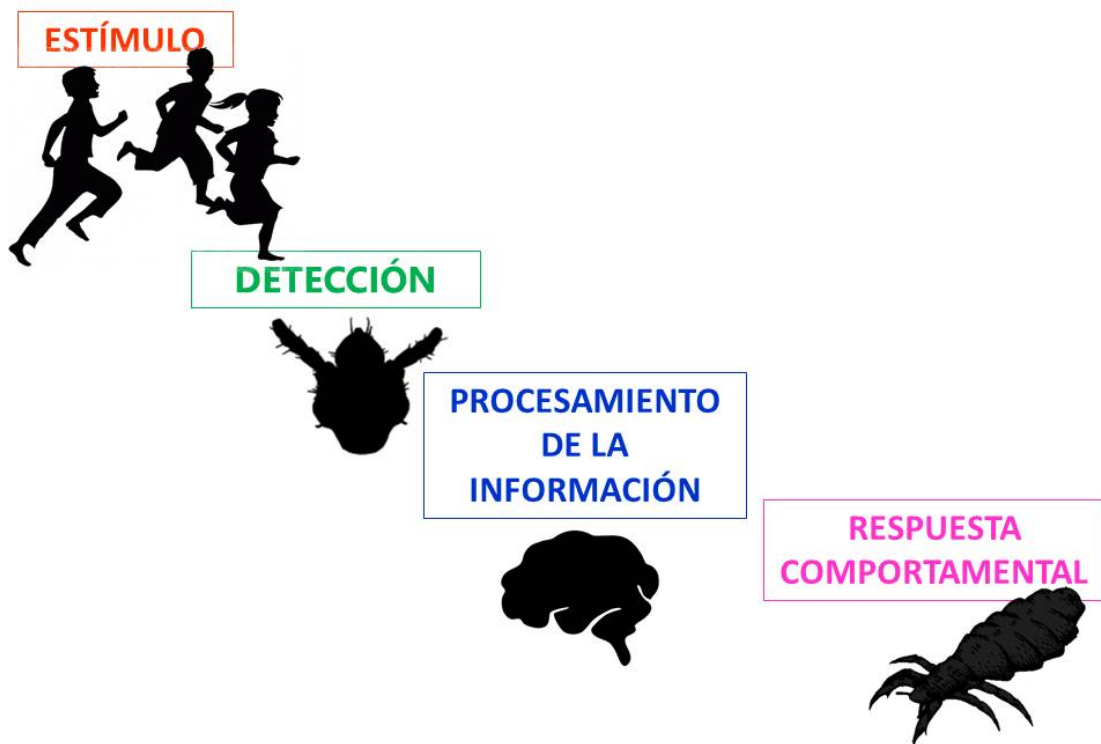


Figura 10. Pasos que intervienen desde la detección del estímulo al comportamiento válido para cualquier organismo.

Los **estímulos** de carácter físico (luz, temperatura, humedad, gravedad, etc.) o químicos (olores, gustos) son detectados por diferentes **órganos sensoriales** como las antenas, aparato bucal o patas de los insectos. Es importante aclarar que los estímulos presentes en los hábitats de los organismos son innumerables y que cada individuo sólo responderá a aquellos estímulos relevantes para su ecología que le permitirá realizar funciones vitales como alimentarse, encontrar refugio, encontrar pareja, reproducirse, oviponer, etc.

Las antenas de los insectos poseen diferentes formas y tamaños a lo largo de diferentes taxones (Schneider 1964). En general, dicho órgano interviene principalmente en la evaluación de estímulos olfativos, térmicos e hídricos y presenta el mayor número de estructuras sensoriales.

El aparato bucal y las patas presentan un menor número de estructuras sensoriales y, en general, están involucrados en la evaluación de estímulos gustativos, dióxido de carbono y calor (Keil 1999).

La detección periférica de los estímulos

La unidad estructural y funcional básica de la recepción sensorial en los insectos es la **sensilia** (Chapman 1988) y se encuentra distribuida en los órganos mencionados anteriormente y en otras partes del cuerpo.

Una sensilia es una estructura cuticular que contiene distintos grupos de células, por un lado, las células de soporte o auxiliares, i.e. tecógena, tormógena y tricógena, y por otro las células sensoriales (neuronas receptoras) i.e. quimiorreceptora, termo-higroreceptora, mecanorreceptora. De acuerdo a su morfología externa, las sensilias han sido llamadas de diferentes maneras (Schneider 1964). Entre ellas podemos encontrar las sensilias basicónicas,

quéticas, celocónicas, tricoideas, campaniformes, etc. En muchos casos se ha podido establecer una relación morfológica y funcional. Por ejemplo, en muchos insectos se relacionan a las sensiliastricoideas con la detección de estímulos olfativos.

Funcionalmente, las sensilias se pueden clasificar en quimiorreceptores, termorreceptores, higrorreceptores y mecanorreceptores.

Quimiorreceptores: Son aquellas sensilias capaces de detectar sustancias químicas. Los quimiorreceptores olfativos detectan sustancias volátiles o en estado gaseoso; los quimiorreceptores de contacto por su parte detectan sustancias no volátiles, en estado sólido o líquido (Zacharuk 1980).

Los quimiorreceptores olfativos o sensilias olfativas poseen una pared cuticular con numerosos poros pequeños que permiten la entrada de los volátiles al interior de la sensilia (Figura 11). Se encuentran principalmente en las antenas, aunque en algunos casos pueden encontrarse en las maxilas y palpos labiales. (Lee y Craig 2009, Bohbot 2014). Estos pelos pueden presentar en su interior entre 2 y 4 células sensoriales.

Los quimiorreceptores de contacto o sensilias gustativas se caracterizan por la presencia de un único poro en el extremo de la sensilia. Estas sensilias pueden estar presentes en todas las partes del cuerpo, aunque en mayor proporción en las piezas bucales o en el interior de la faringe (Figura 12) (Pontes et al 2014).

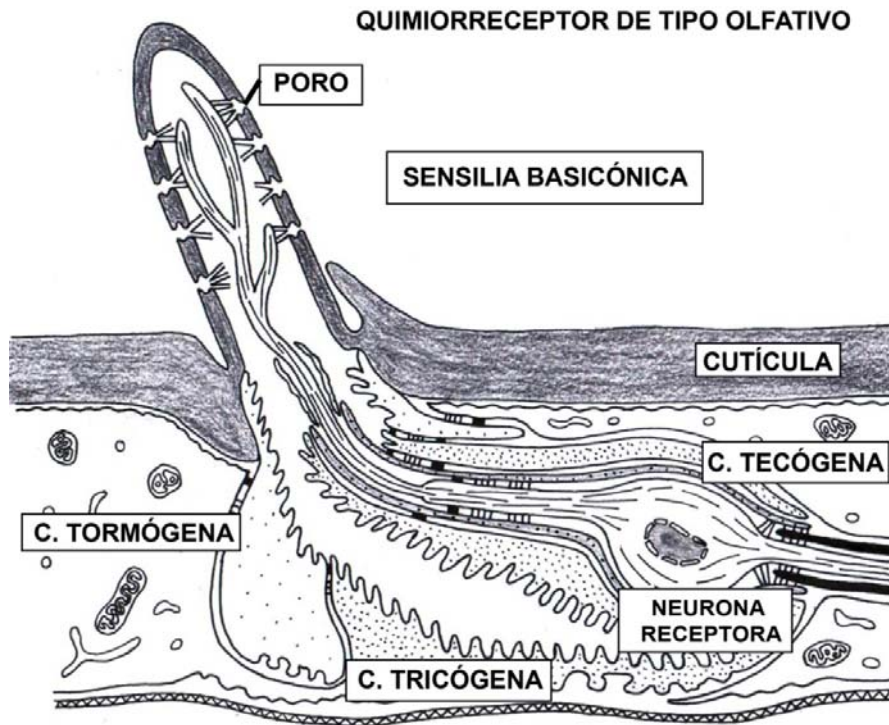


Figura 11. Sensilia quimiorreceptora olfativa (www.cronodon.com).

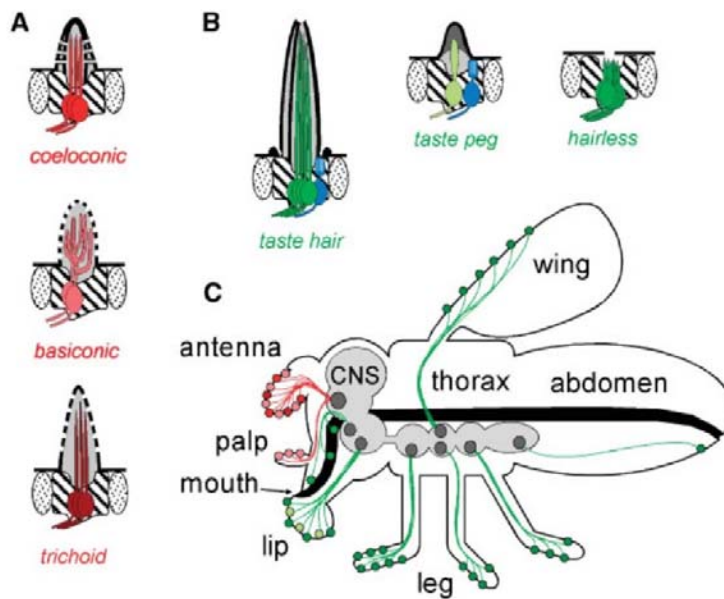


Figura 12. Mapa quimiosensorial del cuerpo de *Drosophila*, Bruyne y Warr (2005). En rojo, sensilias olfativas y en verde las de contacto o gustativas.

Termorreceptores e higrorreceptores: Un termorreceptor es un sensor de temperatura (o flujo de calor). Un higrorreceptor es un sensor de humedad o agua. Es común encontrar sensillas con doble función termo- e higrorreceptoras, denominadas termo-higrorreceptores (Figura 13). Pueden tomar formas diferentes pero suelen ser pelos (sensillas tricoideas) o conos romos contenidos en una depresión cuticular (sensillas celocónicas). Estas sensillas no son porosas, a excepción de un poro de muda terminal, e incluso algunas sensillas termo-higrorreceptoras contienen células sensoriales olfativas, en cuyo caso las paredes pueden ser multiporosas, lo que permite que los volátiles alcancen las neuronas olfativas en su interior (Altner y Loftus 1985).

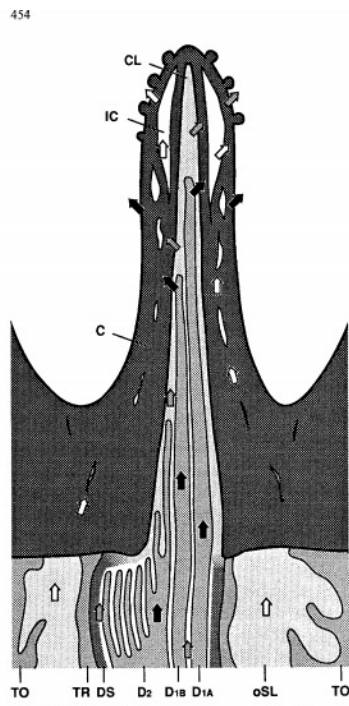


Figura 13. Sensilia termo-higrorreceptora en la antena de *Bombyx mori* (Steinbrecht, 1991). C cutícula; CL lumen central; D1A, D1B dendritas higrorreceptoras; D2 dendrita termorreceptora; DS capa dendrítica; IC canales y cavidad intramurales; oSL espacio linfático externo sensiliar; TO célula tormógena; TR célula tricógena.

Mecanorreceptores: Un mecanorreceptor es un sensor diseñado para detectar energía mecánica como tacto, sonido, vibración, cambio de presión o gravedad. La mayoría de los pelos de un insecto son mecanorreceptores que pueden agruparse en matrices o integrarse estrechamente en órganos sensoriales (Figura 14). Los insectos tienen una cutícula externa muy resistente, lo que plantea problemas para detectar estímulos externos. Las fuerzas mecánicas alcanzan las células sensoriales solo donde la cutícula es deformable. La facilidad con que se pueden deformar las partes cuticulares determina la sensibilidad de la unidad sensorial (Keil 1997).

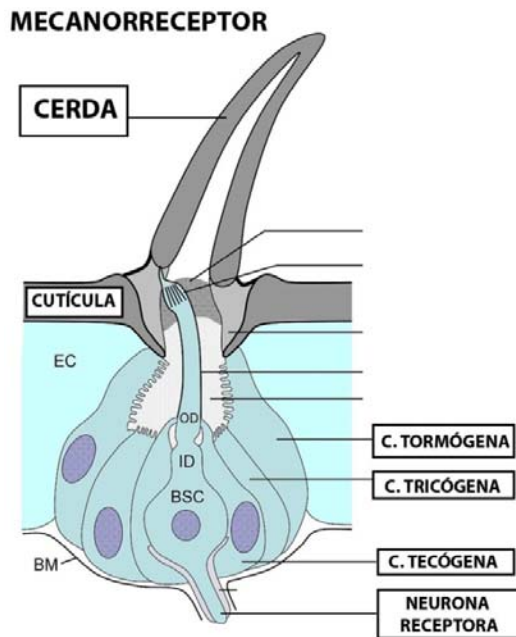


Figura 14. Sensilia mecanorreptora de insecto, www.cronodon.com.

La percepción central de los estímulos

La información sensorial proveniente de la periferia alcanza el cerebro de los insectos donde el procesamiento de la información finalmente tiene lugar. De este procesamiento surgirán diferentes comportamientos que manifestarán los insectos.

El **cerebro** del insecto está dividido en tres pares de lóbulos: el protocerebro, deutocerebro y tritocerebro (Figura 15). Estos lóbulos son ganglios fusionados, grupos de neuronas que procesan información sensorial. Cada área recibe proyecciones de neuronas aferentes de órganos específicos, como por ejemplo, las neuronas de las antenas mandan sus proyecciones a la zona del deutocerebro mientras que las neuronas que se encuentran en las sensillas del aparato bucal mandan sus axones a la zona del tritocerebro (Matthews y Matthews 2009).

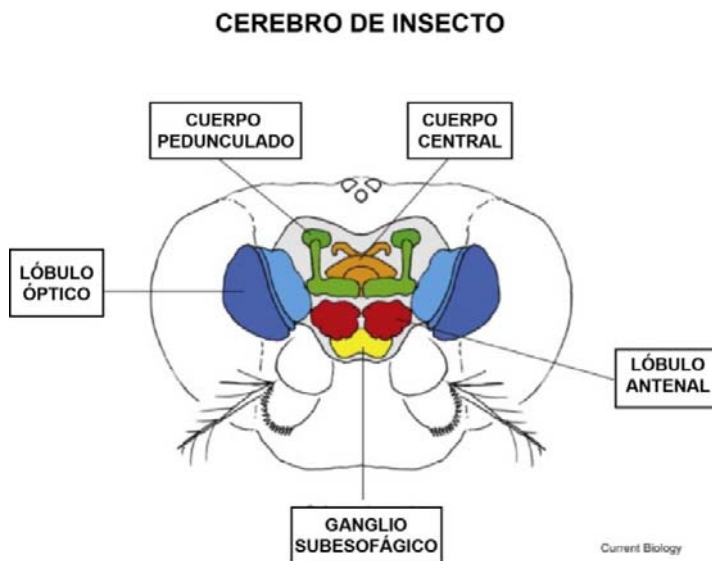


Figura 15. Cerebro de insecto, Current biology.

El deutocerebro recibe proyecciones neuronales de la antena. A través de los impulsos neurales de las antenas, el insecto puede detectar olores, señales gustativas, sensaciones táctiles e incluso información ambiental como la temperatura y la humedad. Por lo tanto el nervio antenal lleva principalmente información quimio- y mecanosensorial hacia los dos centros nerviosos del deutocerebro: el **lóbulo antenal** (LA), que recibe la información quimiosensorial y el centro mecanosensorial y motor de la antena (CMMA), que recibe la información mecanosensorial de la antena y órganos del aparato bucal. Las unidades estructurales del LA son los **glomérulos**, que consisten en pequeños neuropilos (procesos de células nerviosas y sinapsis) donde desembocan los axones de las neuronas receptoras y se conectan con otro tipo de neuronas locales: las interneuronas o neuronas de proyección que se encargan de llevar la información a centros superiores.

El comportamiento desencadenado en respuesta a los estímulos

El procesamiento central de la información periférica dará lugar a una **respuesta comportamental** adecuada al contexto espacio-temporal y fisiológico del insecto.

La mayoría de los comportamientos son influenciados continuamente a través de la retroalimentación tanto de su entorno interno como del externo que los rodea (Matthews y Matthews 2009).

Dependiendo de las características del estímulo y la organización del sistema sensorial, las respuestas comportamentales pueden representar mecanismos distintos denominados **kinesis** y **taxis** (Kennedy 1978). Las kinesis

comprenden aquellos mecanismos en los que la respuesta del individuo depende de la intensidad, pero no de la dirección del estímulo. Se destacan dos tipos de kinesis: la ortokinesis y la klinokinesis. En la primera, la intensidad del estímulo ejerce un efecto modulador sobre la actividad locomotora, es decir, sobre la velocidad de desplazamiento. En la klinokinesis, la frecuencia o tendencia de giro durante el desplazamiento es modulada por la intensidad del estímulo. Una sustancia o compuesto arrestante se define como aquel que ralentiza y congrega insectos como resultado de kinesis no dirigidas ya sea por ortokinesis o klinokinesis (Kennedy 1978).

Las taxias comprenden aquellos mecanismos de orientación en los que la respuesta de los individuos depende de la dirección del estímulo.

La mayoría de los organismos son capaces de emplear más de una estrategia de forma combinada dependiendo del contexto.

Objetivos de esta tesis

Objetivo general

Estudiar el comportamiento y la fisiología sensorial de *Pediculus humanus capitis* en el contexto de la evaluación del hospedador.

Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones externas (*i.e.* temperatura, humedad y luz) óptimas para el piojo con el fin de aplicarlas en los ensayos de comportamiento.
2. Estudiar la respuesta comportamental del piojo a claves químicas presentes en el cuero cabelludo humano.
3. Caracterizar morfológicamente la antena del piojo e identificar los tipos de sensilias presentes.
4. Describir las estructuras del cerebro del piojo involucradas en la integración de información sensorial de la antena.
5. Estudiar el rol de la antena y sus sensilias asociadas en la respuesta comportamental de los piojos hacia estímulos químicos, térmicos e hídricos relacionados con el hospedador.
6. Describir la morfología del aparato bucal y patas e identificar los tipos de sensilias presentes.

7. Comparar morfológica-, fisiológica- y comportamentalmente al piojo de la cabeza con otros insectos hematófagos en la evaluación del hospedador.

Hipótesis

Hipótesis general. Dado que la búsqueda de hospedador es relativamente pasiva en los piojos de la cabeza, estos insectos poseen una maquinaria sensorial adaptada a responder a estímulos provenientes del hospedador.

Hipótesis 1. Las variables ambientales externas (e.g. intensidad lumínica, humedad y temperatura) y las internas (e.g. estado nutricional, sexo) tienen una influencia directa en el comportamiento del piojo, que modificarán sus respuestas.

Hipótesis 2. Los piojos responderán a estímulos de distintas modalidades asociados al hospedador.

Hipótesis 3. En las antenas, aparato bucal y patas de los piojos existen órganos sensoriales especializados para la detección de los estímulos relevantes provenientes del hospedador.

Hipótesis 4. El cerebro del piojo presenta neuropilos poco desarrollados para la integración de la información periférica proveniente del hospedador.

Capítulo 1

EFFECTO DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES Y COMPUESTOS TÓXICOS SOBRE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA DEL PIOJO DE LA CABEZA *PEDICULUS HUMANUS CAPITIS*

1.1. Introducción

Se postula que el principal mecanismo de la transmisión de los piojos de la cabeza es el contacto directo de hospedador con hospedador, que incluye el contacto cabeza con cabeza y el contacto cuerpo con cuerpo (Speare et al., 2002). Canyon y colaboradores (2002) demostraron que los piojos se transfieren de manera más exitosa de un pelo a otro cuando los pelos se mueven lentamente en una alineación específica. En consecuencia, el riesgo de transmisión por huevos de piojos o piojos desplazados por fómites es epidemiológicamente insignificante en comparación con los riesgos de transferencia de piojos de una persona a otra durante el contacto físico (Burgess 2004). En este contexto, el conocimiento del comportamiento de los piojos es una clave importante para entender la dinámica de transmisión.

Los estudios publicados sobre la actividad locomotora de especies pertenecientes a Phthiraptera datan principalmente de la primera mitad del siglo XX. Hase (1915) postuló que ejemplares adultos de *Pediculus humanus humanus* (piojos del cuerpo) (Linnaeus 1758) caminaban más rápido que las ninfas. Nuttall (1917) recopiló datos de diferentes autores que realizaron observaciones detalladas sobre la actividad locomotora de los piojos del cuerpo moviéndose en diferentes superficies y en diferentes ángulos. Además, este autor también desarrolló un aparato simple para evaluar la velocidad de los piojos de la cabeza y del cuerpo para “escalar” a lo largo del cabello humano. Más tarde, Wigglesworth (1941) observó que los piojos del cuerpo mostraban tener una preferencia térmica de 29-30 ° C con respecto a temperaturas más bajas o más altas en arenas de doble elección. Al mismo tiempo, los insectos

se movieron más rápido en el lado caliente que en el lado más frío. En experimentos de doble elección involucrando distintas humedades relativas (HR), los piojos del cuerpo prefirieron permanecer en promedio en el lado más seco ($< 10\%$ HR). Adicionalmente, en la arena de doble elección, los piojos mostraron un comportamiento de fototaxia negativa evitando la fuente de luz utilizada como estímulo (Nuttall 1917, Wigglesworth 1941, Buxton 1946). Wigglesworth (1941) también demostró que un aumento repentino en la iluminación provocaba la detención de los piojos, permaneciendo en un estado de akinesia, y cuando eran perturbados mecánicamente, generalmente se movían a un ritmo más lento que el habitual.

La actividad locomotora se puede ver modificada por diversos compuestos químicos que modulan el comportamiento de los insectos alterando la función normal del sistema nervioso periférico, central y del sistema hormonal (Georghiou 1972, Haynes 1988). Un aumento en la actividad locomotora (es decir, hiperactividad) o la falta de ésta (es decir, postración, parálisis, hipoactivación) pueden ser considerados como síntomas de intoxicación por sustancias neurotóxicas tal como se ha observado para los insecticidas piretroides (Gammon 1978, Miller y Adams 1982, Benoit et al. 1985, Alzogaray et al. 1997, Sfara et al. 2013). A modo de ejemplo, Alzogaray y colaboradores (1997, 2001) evaluaron la actividad locomotora de ninfas de la vinchuca *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) expuestas a diversos piretroides, y propusieron que la hiperactividad observada era uno de los síntomas de intoxicación. Más específicamente, demostraron que la cipermetrina provocaba un efecto de hiperactivación en triatominos (Alzogaray y Zerba, 2001). Sfara y colaboradores (2013) describieron una disminución significativa de la actividad

locomotora de la cucaracha alemana *Blattella germanica* (Dictyoptera: Blattidae) expuesta a N, N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), el ingrediente activo de la mayoría de los repelentes de insectos hematófagos utilizados en todo el mundo (Debboun, 2007), y también postularon que dicha hipoactivación era una consecuencia de sus efectos tóxicos.

En el caso del piojo de la cabeza *P. humanus capitis*, el aumento de la actividad locomotora podría conducir a una mayor tasa de transmisión de cabeza a cabeza y producir infestaciones graves. En consecuencia, el estudio de los factores que afectan la actividad locomotora de los piojos de la cabeza es pertinente para un control más eficiente de la pediculosis. Adicionalmente, frente al desafío de realizar ensayos comportamentales con este modelo poco estudiado, es prioritario determinar las condiciones experimentales necesarias para medir el comportamiento en respuesta a diferentes factores de interés como ser compuestos con actividad repelente, con efecto tóxico o involucrados en la interacción con su hospedador.

En este capítulo, evaluamos el efecto de variables ambientales tales como la temperatura, la humedad y la luz sobre la actividad locomotora de *P. humanus capitis*. Estos resultados nos permitirán establecer las condiciones ambientales óptimas para realizar ensayos comportamentales. Adicionalmente, evaluamos el efecto de los compuestos cipermetrina (hiperactivante) y DEET (hipoactivante) en la actividad locomotora de los piojos, con el objetivo de corroborar que las condiciones ambientales seleccionadas como óptimas son las adecuadas para la correcta evaluación de la actividad de los insectos, y de esta manera conseguir reproducibilidad y confiabilidad en los ensayos.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Insectos

Los piojos se colectaron de las cabezas de niños infestados de siete escuelas primarias en Buenos Aires, Argentina. Para ello se utilizó un peine metálico de dientes finos según un protocolo aprobado por un comité ad-hoc del Centro de Investigación de Plagas e Insecticidas. Luego de la remoción, los piojos se llevaron al laboratorio donde se seleccionaron los adultos para ser utilizados en los experimentos una hora más tarde. Durante esta hora los insectos seleccionados se mantuvieron en bandejas de plástico en una cámara ambiental (Ambi-Hi-low Lab-Line, Iowa, EEUU) regulada a 18 ± 1 ° C, $70-80 \pm 1$ % HR de acuerdo a estudios previos que demostraron que la baja temperatura y la alta humedad minimizaban la mortalidad promedio de los piojos de acuerdo con Picollo et al. (1998). Todos los experimentos se realizaron durante el mismo período del día (entre las horas 13: 00-16: 00).

1.2.2. Cuantificación de la actividad locomotora

La arena utilizada fue una adaptación de la descrita en Sfara et al. (2013). Brevemente, la arena experimental consistió en un papel de filtro circular Whatman n° 1 (GE Healthcare UK Limited, Amersham Place Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido, diámetro: 55 mm) colocado como sustrato dentro de una placa de Petri de vidrio (55 mm de diámetro). Adicionalmente, para evitar que los insectos escapen de la arena se incluyó en ella un aro de vidrio (alto: 4 cm, diámetro: 5 cm). En el papel de filtro se dibujó una grilla, cada cuadrado de la grilla tenía una superficie de $0,25 \text{ cm}^2$ (Figura 1B). Cada adulto de *P. humanus capitis* fue colocado delicadamente en el centro de la arena

(Figura 1B). La actividad locomotora se cuantificó contando el número de cruces de las líneas que delimitaban la grilla que los insectos hicieron durante 3 minutos. La arena se colocó sobre una plancha termostatzada cuya temperatura podía ser modificada según el experimento (Fábrica de aparatos científicos, Buenos Aires, Argentina). La arena experimental fue colocada en el interior de una cámara experimental. La actividad locomotora de los insectos se registró con una cámara infrarroja (KIR-J639CE20, Sony, China) conectada a un monitor (LG, China) y un grabador de video digital (DVR5104HE, Dahua Technology Co. Ltd, Hangzhou, China). La cámara se suspendió 50 cm por encima de la superficie de cada arena (Figura 1A). Se utilizaron 20 hembras que se evaluaron individualmente por cada tratamiento.

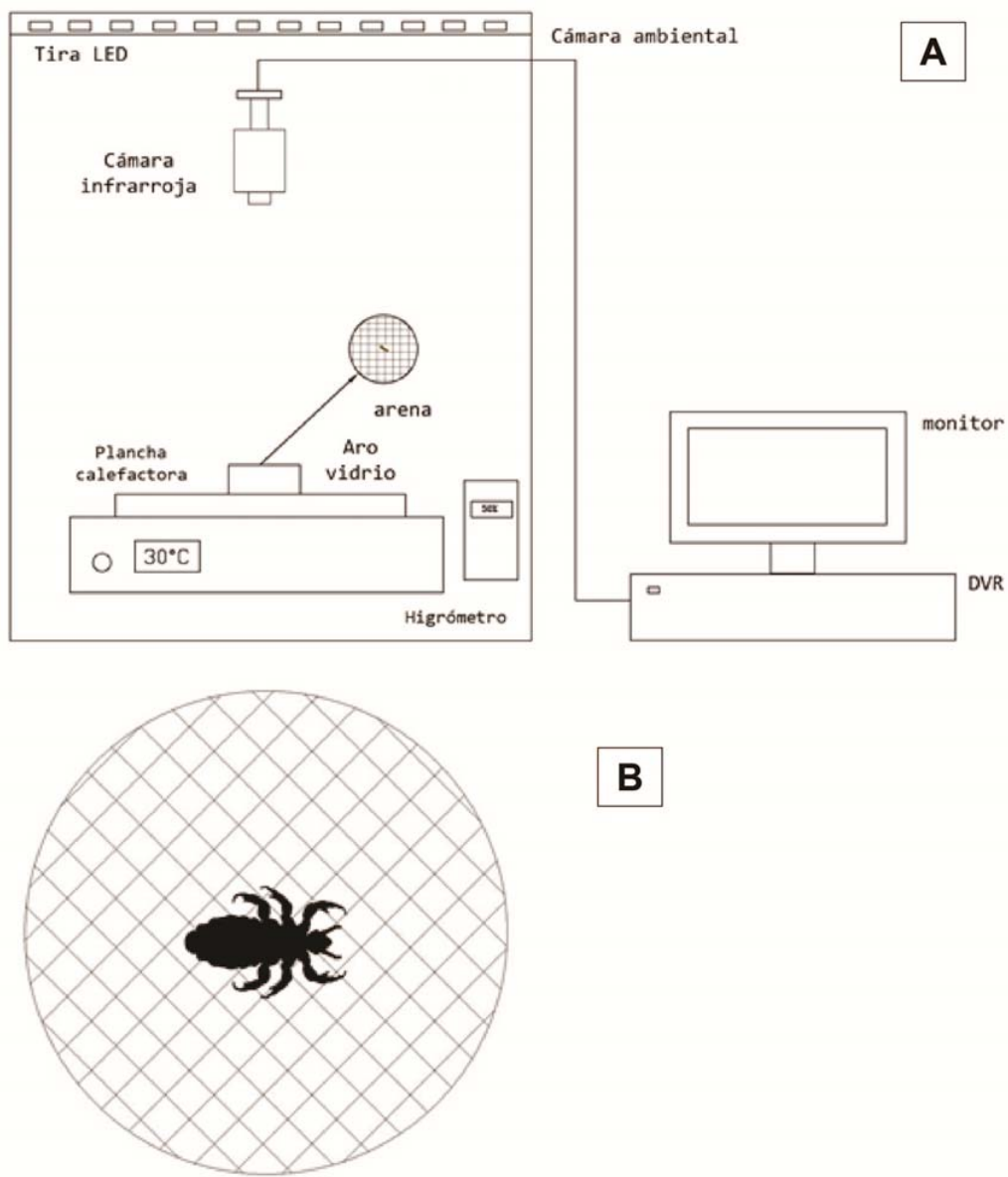


Figura 1. Dispositivo experimental (A) Esquema del dispositivo donde se midió la actividad locomotora de los piojos expuestos a diferentes condiciones ambientales. (B) Esquema de la arena de medición de comportamiento.

1.2.3. Establecimiento de la temperatura para evaluar su efecto en la actividad locomotora

Cada arena se colocó sobre una plancha termostatzada a una de las siguientes temperaturas: $20 \pm 1^{\circ} \text{C}$ o $30 \pm 1^{\circ} \text{C}$ (Figura 2). La humedad relativa (HR) se mantuvo a 50 % con luz difusa ($200 \pm 0,1 \text{ lux}$). Antes de cada ensayo, se midió la temperatura de la arena con un termómetro digital (TFA Dostman, China) luego de un período de estabilización de 5 min.

1.2.4. Establecimiento de la humedad relativa para evaluar su efecto en la actividad locomotora

Se evaluaron tres niveles de humedad relativa: HR baja (20 %), HR mediana (50 %) y HR alta (100 %) (Figura 2). Los valores de HR se registraron mediante un higrómetro (TFA Dostman, China). Durante los ensayos, las arenas se mantuvieron a $30 \pm 1^{\circ} \text{C}$ o $20 \pm 1^{\circ} \text{C}$ (según corresponda) y luz difusa de $200 \pm 0,1 \text{ lux}$.

1.2.5. Establecimiento de la intensidad lumínica para evaluar su efecto en la actividad locomotora

Se evaluaron tres intensidades lumínicas: intensidad baja ($21 \pm 0,1 \text{ lux}$), intensidad media ($553 \pm 0,1 \text{ lux}$) e intensidad alta ($1726 \pm 0,1 \text{ lux}$) (Figura 2). El nivel de iluminación se midió con un luxómetro digital (Lux & fc, ST-1301, China). Durante los ensayos, las arenas se mantuvieron a $30 \pm 0.5^{\circ} \text{C}$ y 50 % de HR.

Medición de actividad

Temperatura 20°C
 30°C

Humedad 20 %
 50 %
 100 %

Luz 21 lux (intensidad baja)
 553 lux (intensidad media)
 1726 lux (intensidad alta)



Figura 2. Resumen de los tratamientos de temperatura, humedad y luz aplicados al evaluar la actividad locomotora de los piojos.

1.2.6. Medición de la actividad locomotora bajo la influencia de compuestos tóxicos

Para determinar si las condiciones experimentales de temperatura, humedad y luz seleccionadas provocaban respuestas de actividad locomotora óptimas y reproducibles, se midió el efecto de dos compuestos tóxicos con actividad conocida sobre la locomoción, bajo dichas condiciones ambientales (Figura 3). Primero, para determinar la dosis subletal adecuada en el comportamiento del piojo, se realizó la curva de mortalidad para el insecticida sintético cipermetrina

y para el repelente N, N-Dietil-meta-toluamida (DEET). La cipermetrina (99.1%) se obtuvo de Chemotecnica SA, Buenos Aires, Argentina, y la DEET (97%) de Aldrich (Milwaukee, WI, EUA). Los compuestos químicos se solubilizaron en acetona y se obtuvieron seis concentraciones distintas de cipermetrina distintas que variaron entre 0,002 y 10 mg / ml, y cinco concentraciones de DEET que variaron entre 1 y 60 mg / ml. Los grupos de piojos seleccionados al azar se topicaron individualmente con 0,1 μ l de la solución en el dorso del abdomen, usando una jeringa Hamilton de 5 μ l. El tópico se realizó bajo lupa para asegurar que cada gota se colocara correctamente en el abdomen. Cada dilución, incluida la acetona para los controles, se replicó al menos tres veces, con 10 insectos por réplica. Después del tópico, los insectos se colocaron en una placa de Petri con papel de filtro humedecido con 0,5 ml de agua (Vassena et al., 2003). Los piojos se mantuvieron a $18^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y $70 - 80 \pm 1\%$ HR. La mortalidad se evaluó a las 18 h de la siguiente manera: los piojos tratados se transfirieron al centro de un nuevo disco de papel de filtro y el criterio de mortalidad fue la incapacidad para caminar desde el centro hasta el borde del disco de papel de filtro en un período de 15 s (Picollo et al., 1998). Los datos de dosis-respuesta se sometieron a análisis Probit para estimar las dosis subletales (microgramos por insecto) requeridas para afectar entre el 10% y el 25% de las muestras tratadas (DL_{10} - DL_{25}) (Figura 3).

Una vez que se calcularon las dosis subletales para ambos compuestos, la dosis final utilizada para cipermetrina y DEET fue de 0,001 μ g y 3 μ g por insecto, respectivamente (Figura 3). Estas dosis subletales se usaron para determinar el efecto de cada compuesto (en este caso la cipermetrina y la DEET) en la actividad locomotora de los piojos bajo las condiciones

ambientales seleccionadas de luz, temperatura y humedad. Después de la aplicación tópica con cipermetrina o con DEET, se llevó cada insecto a la cámara experimental y se registró su actividad locomotora. Los piojos controles se trataron con acetona. La actividad locomotora se cuantificó a los 0, 10, 20 y 30 minutos después de la aplicación tópica para cada insecto (Figura 3). Se estudiaron 15 piojos adultos de forma individual para cipermetrina y para DEET respectivamente. Las evaluaciones se realizaron a $30 \pm 1^\circ \text{C}$, $21 \pm 0,1 \text{ lux}$ y $50 \pm 1 \% \text{ HR}$ (condiciones ambientales seleccionados que se desprenden de los resultados de los tres primeros experimentos).

Los resultados del efecto de tópico con cipermetrina y DEET se expresaron como un índice de actividad locomotora (IAL):

$$\text{IAL} = [(\text{ACTIVIDAD PROMEDIO DEL TRATAMIENTO} - \text{ACTIVIDAD PROMEDIO CONTROL}) / \text{ACTIVIDAD PROMEDIO CONTROL}]$$

Valores positivos de IAL (> 0) indican hiperactivación, valores negativos de IAL (< 0) indican hipoactivación.

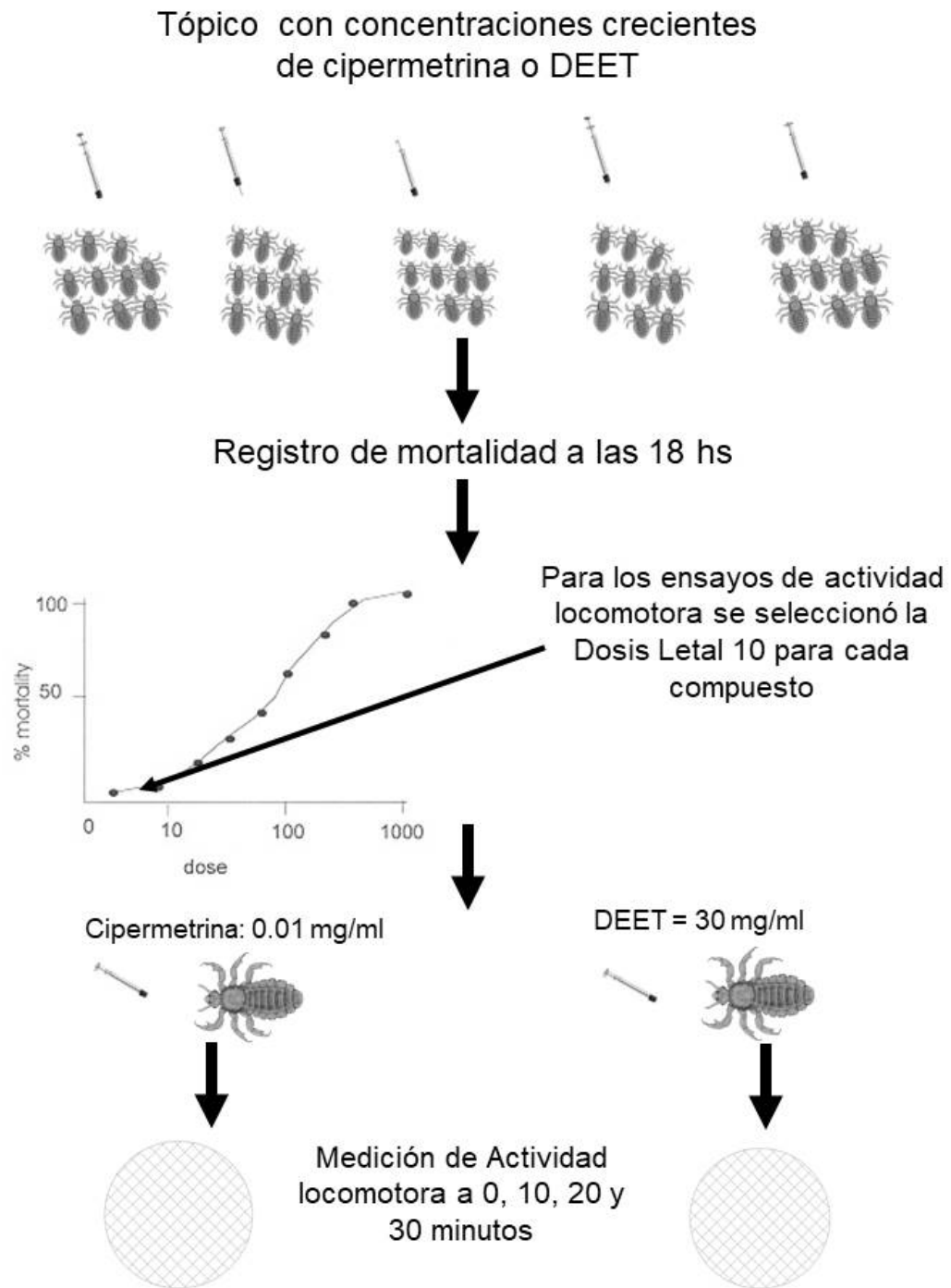


Figura 3. Resumen de la serie experimental para validar el dispositivo experimental de comportamiento.

1.2.7. Análisis estadístico

La actividad locomotora se cuantificó mediante el conteo del número de cruces a cada cuadrado de la arena durante 3 minutos. , Se calculó la media y el error estándar (EE) de la actividad locomotora para cada serie experimental.

El efecto de la temperatura, la humedad y la luz sobre la variable medida se analizó aplicando el test estadístico ANOVA de un factor. Mediante la prueba de Levene, se verificó el cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas en todos los experimentos (Temperatura, $p = 0,6876$; Humedad, $p = 0,1464$ (20°C) $p = 0,3498$ (30°C); Luz, $p = 0,0994$) y la normalidad de los datos se determinó gráficamente (Qq-plot). Cuando fue necesario, la prueba de Tukey se aplicó para analizar comparaciones *a posteriori*.

En la segunda parte, se realizó un ANOVA de dos factores con medidas repetidas para evaluar el efecto de dos factores: los compuestos tóxicos (cipermetrina y DEET) y el tiempo post-tópico (0, 10, 20 y 30 minutos). Los datos cumplieron normalidad (Shapiro-Wilks, cipermetrina, $p = 0,4954$; DEET, $p = 0,9874$), así como la homogeneidad de la matriz de covarianza usando la prueba de Box's (cipermetrina, $p = 0,716$; DEET, $p = 0,580$). El supuesto de esfericidad del modelo (prueba de esfericidad de Mauchly) no se cumplió para cipermetrina ($p = 0,006$) ni para el factor DEET ($p = 0,002$). No obstante, la desviación de la esfericidad se resolvió ajustando los grados de libertad con la corrección Greenhouse-Geisser. El paquete estadístico Infostat v2012 se utilizó para realizar las pruebas de Shapiro-Wilks, de Levene, ANOVA y el gráfico Q-q (<http://www.infostat.com.ar>). Los supuestos de homogeneidad de la matriz de

covarianza y la esfericidad se realizaron en IBM® SPSS® Statistics Versión 9. El umbral de significancia fue de $p < 0,05$ en todos los casos.

Para la estimación de las dosis subletales, los datos se analizaron utilizando el programa Polo PC (software Le Ora 2002). Los datos de mortalidad se corrigieron utilizando la fórmula de Abbott (Abbott 1925) y luego se sometieron a análisis Probit (Litchfield y Wilcoxon 1949) para estimar las dosis subletales.

1.3. Resultados

1.3.1. Efecto de la temperatura en la actividad locomotora

La temperatura de la arena tuvo un efecto significativo en la actividad locomotora de los piojos ($F = 19,13$, $gl = 1$; $p = 0,0002$). Los piojos caminaron más rápido (cruzando más líneas en el tiempo del ensayo) en la arena a 30°C comparada con los piojos donde la arena estaba a 20°C (Figura 4).

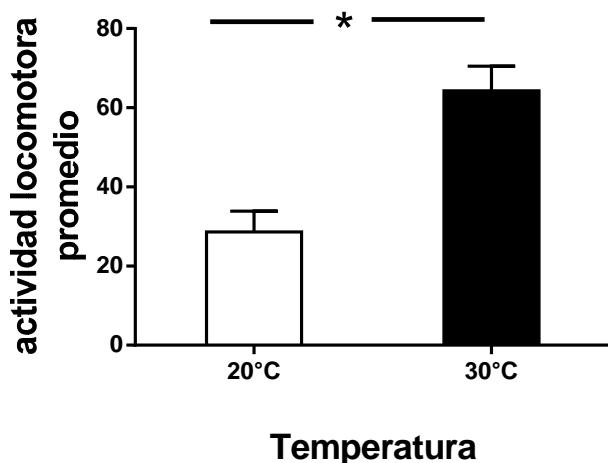


Figura 4. Comparación de la actividad locomotora promedio de piojos adultos evaluados en arenas a 20°C y 30°C respectivamente. El asterisco representa diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$, ANOVA de un factor).

1.3.2. Efecto de la humedad relativa en la actividad locomotora

El efecto del nivel de humedad relativa en la actividad locomotora de piojos adultos no fue significativo tanto a 30 ° C ($F = 1,08$, $gl = 2$, $p = 0,3498$) como a 20 ° C ($F = 2,01$; $gl = 2$; $p = 0,1464$) (Figura 5). La humedad relativa del ambiente no afectó la actividad locomotora de piojos adultos.

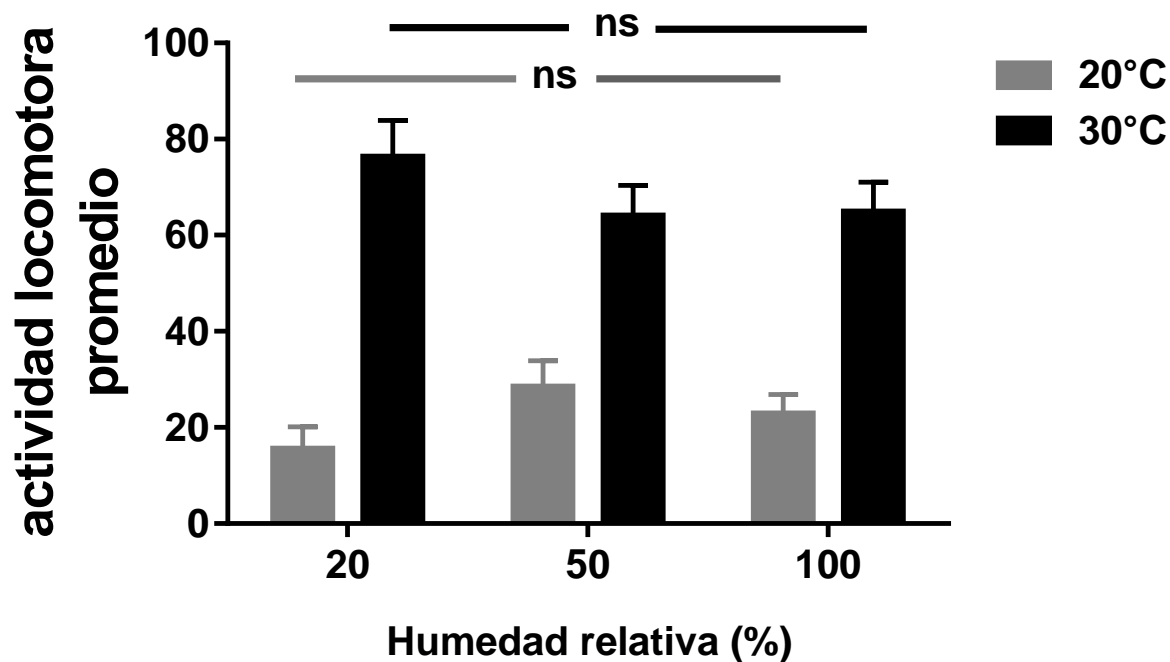


Figura 5. Actividad locomotora promedio de piojos adultos expuestos a diferentes niveles de humedad relativa a dos temperaturas distintas. ns= no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$).

1.3.3. Efecto de la luz en la actividad locomotora

Los resultados obtenidos de la actividad locomotora bajo diferentes grados de intensidad lumínica se muestran en la Figura 6. La intensidad de luz tuvo un efecto significativo en la actividad locomotora de piojos ($F = 18,43$, $gl = 2$, $p < 0,0001$). Además, se observó que cuanto mayor era la intensidad de la luz, más lento era el movimiento de los piojos (comparación *a posteriori* Tukey, $p < 0,05$).

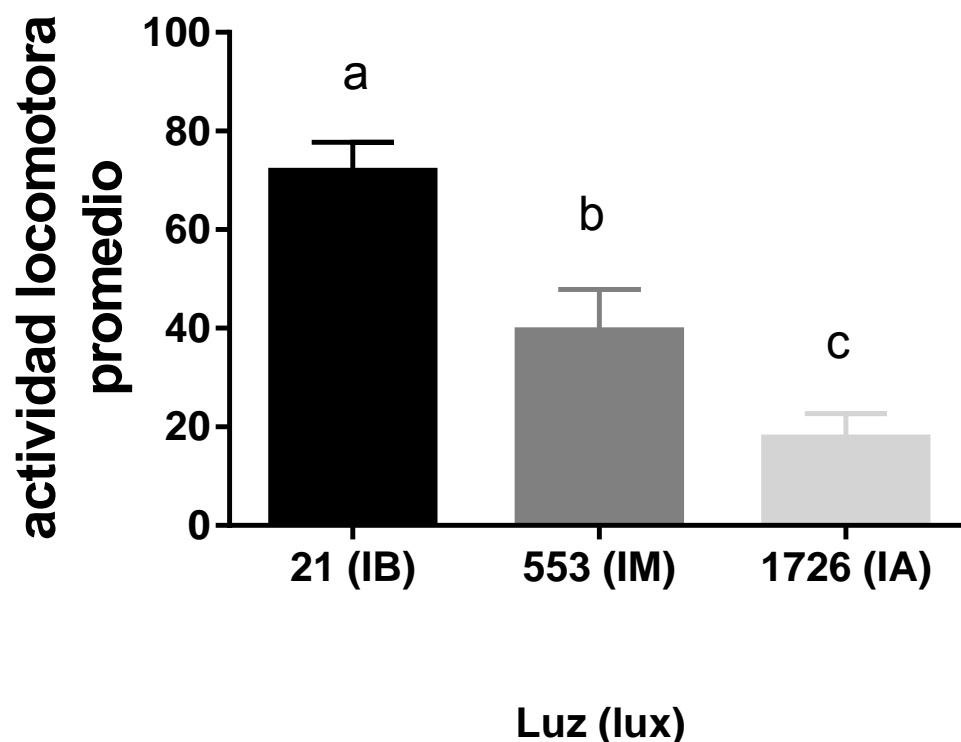


Figura 6. Actividad locomotora promedio de piojos adultos expuestos a diferentes intensidades de luz. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0,05$). IB=Intensidad baja; IM= Intensidad media; IA= Intensidad alta.

1.3.4. Efecto de compuestos tóxicos en la actividad locomotora

El ANOVA de dos factores de medidas repetidas realizado para cipermetrina mostró una interacción no significativa entre el factor tiempo y el factor compuesto que permitió analizar el efecto de ambos factores por separado ($F = 1,55$, $gl = 2,164$, $p = 0,218$). El efecto del factor compuesto fue significativo ($F = 5,83$, $gl = 1$, $p = 0,022$), informando que los insectos topicados con cipermetrina tuvieron una actividad locomotora distinta y superior al control. También hubo un efecto significativo del factor tiempo en las respuestas de los piojos ($F = 10,15$, $gl = 3$, $p < 0,0001$). Tanto en la curva de acetona como en la curva de cipermetrina los piojos estuvieron más activos en los primeros minutos del ensayo bajando su actividad hacia el final del ensayo (Figura 7). Se observó un efecto hiperactivante de la cipermetrina en la actividad locomotora de los piojos similar al efecto previamente reportado de este compuesto en otros artrópodos.

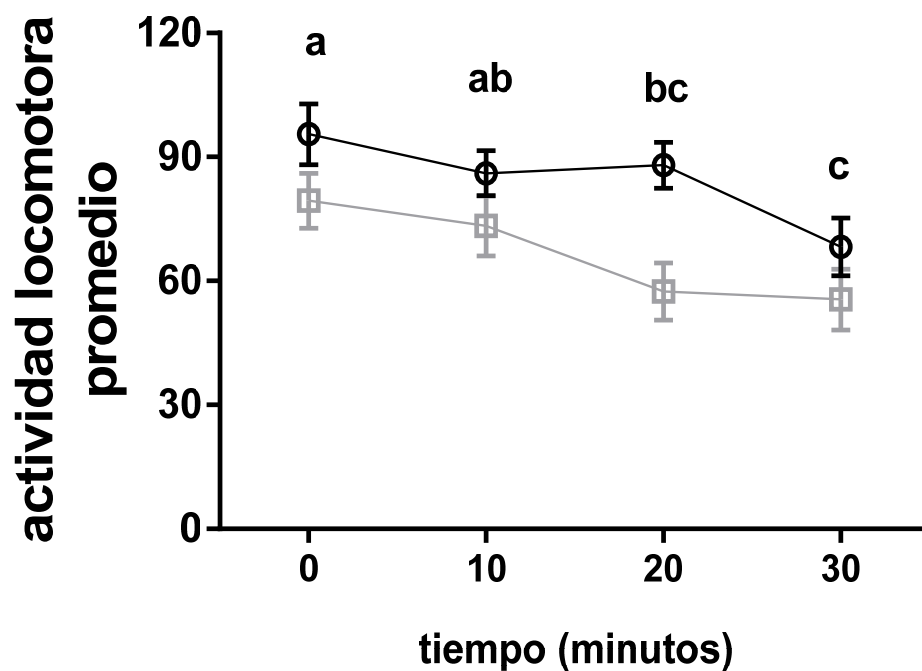


Figura 7. Efecto de la aplicación tópica con cipermetrina en la actividad locomotora promedio de piojos adultos a distintos tiempos post-tópico. La línea negra representa los piojos tratados con cipermetrina, mientras que la gris representa los piojos controles. Letras diferentes indican diferencias significativas en el efecto del tiempo después de la exposición con cipermetrina (Tukey, $p < 0,05$).

El ANOVA de dos factores de medidas repetidas para DEET mostró una interacción significativa del factor DEET y el factor tiempo ($F = 3,39$; $gl = 2,392$; $p = 0,03$). Al haber interacción significativa, no se pudo analizar los factores por separado, por lo tanto, los datos se estudiaron para determinar los efectos simples (la prueba de efectos simples revela el grado en que un factor es diferencialmente efectivo en cada nivel de un segundo factor). Se decidió entonces dejar fijo el efecto tiempo y evaluar a cada tiempo (0, 10, 20 y 30

minutos) las diferencias entre la actividad media de los insectos control (topicados con acetona) y la actividad media de los insectos tratados (topicados con DEET). A los 10, 20 y 30 minutos los insectos expuestos a DEET disminuyeron significativamente su actividad locomotora en comparación con el control (10 min, $p = 1,72 * 10^{-6}$; 20 min, $p = 0,0003$; 30 min, $p = 0,0001$) (Figura 8). Se observó un efecto hipoactivante de la DEET en la actividad locomotora de los piojos similar al efecto previamente reportado de este compuesto en otros insectos.

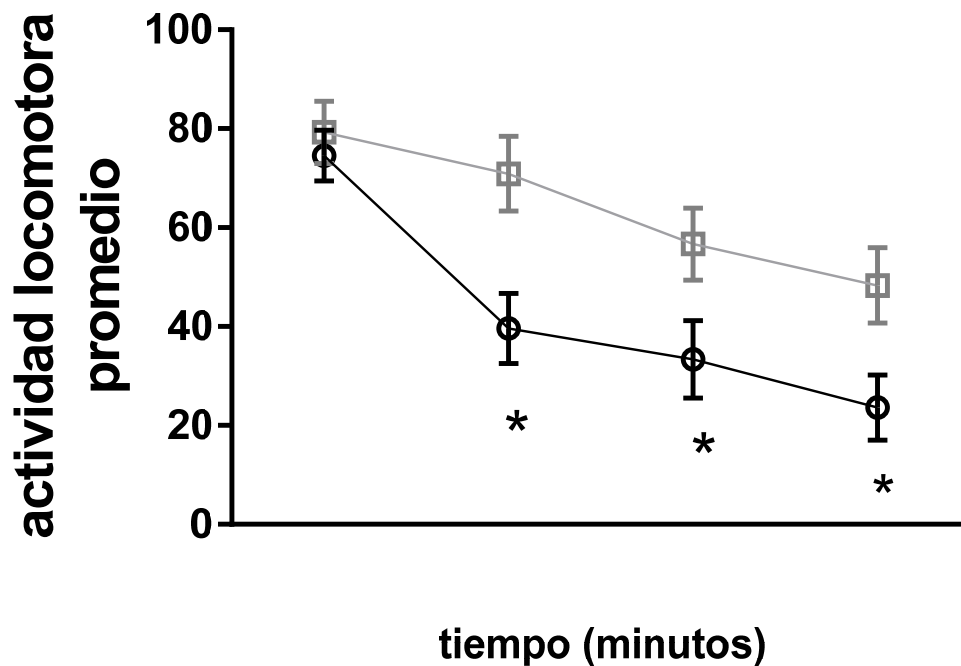


Figura 8. Efecto de la aplicación tópica con DEET en la actividad locomotora de piojos adultos. La línea negra representa los piojos tratados con DEET mientras que la gris representa los piojos controles. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre la actividad los insectos topicados con DEET y la actividad de los insectos control a 10, 20 y 30 minutos ($p < 0,05$).

El Índice de actividad locomotora (IAL) para cipermetrina y DEET se observa en la Figura 9. Los valores de IAL para cipermetrina mostraron hiperactivación inmediatamente después de la aplicación tópica. También se observó un pico de hiperactivación a los 20 minutos. Los valores de IAL para DEET mostraron hipoactivación. El efecto de DEET pareció no ser inmediato: la actividad promedio con DEET comenzó a ser significativamente menor que la actividad control después de 10 minutos de la exposición inicial.

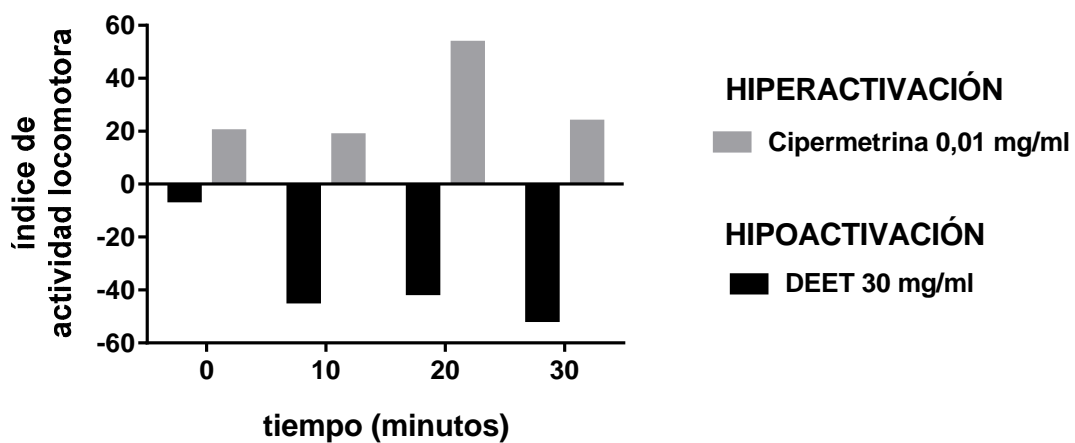


Figura 9. Índice de actividad de locomotora para cipermetrina y DEET.

1.4. Discusión

Uno de los principales obstáculos en el control de la pediculosis es la transmisión de piojos de un hospedador a otro, asunto que tiende a ser poco estudiado en el escenario científico actual, haciendo que la prevención de la reinfestación sea extremadamente difícil. Dicha problemática constituye una cuestión social y económica muy controvertida que hasta la actualidad no se pudo resolver (Heukelbach 2010). La actividad locomotora de los piojos en el contexto de la transmisión constituye una variable determinante para comprender la dinámica de este problema.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las condiciones ambientales en la actividad locomotora de los piojos en un dispositivo experimental especialmente diseñado. La novedad de nuestro estudio radica en el desarrollo de un dispositivo experimental que nos permitió estandarizar el estudio de la respuesta comportamental del piojo de la cabeza. Los piojos respondieron positivamente bajo las condiciones específicas de temperatura (30 ° C) y luz (baja intensidad); siendo estas condiciones similares al ambiente natural de los piojos en una cabeza humana.

La temperatura y la humedad representan variables que han sido ampliamente estudiadas como señales que modifican los parámetros del ciclo biológico de los insectos como la mortalidad y la oviposición (Berger et al., 2008, Gallardo et al., 2009). Además, se ha demostrado en insectos hematófagos que la temperatura representa un estímulo que opera a corta distancia en el contexto

de búsqueda de alimento (Lehane 1991, Flores y Lazzari 1996). De lo obtenido en el presente trabajo se propone, que la mayor actividad de los piojos en la arena a 30 ° C estaría asociada al reconocimiento del calor como una señal del hospedador a corta distancia. Esta clave física actuaría como potencial disparador para provocar comportamientos asociados a la alimentación y la oviposición entre otras.

Con respecto a la influencia de la humedad sobre la actividad locomotora de los piojos, no se encontró efecto en las condiciones de nuestros ensayos. El grado de influencia de la humedad en estudios comportamentales tiende a ser poco claro y se ha informado que es importante como agente sinérgico de otros estímulos (Lehane 1991). Barrozo y colaboradores (2003) demostraron que ninfas de *Triatoma infestans* respondieron orientándose positivamente a fuentes cálidas y húmedas, observando además una mayor actividad locomotora debido al efecto sinérgico de la combinación de esas dos variables. Sin embargo, en nuestro trabajo, cuando se combinaron temperaturas y humedades altas, no se encontró tal efecto sinérgico en la actividad locomotora de los piojos.

Los antecedentes sobre el estudio del efecto de la luz en la respuesta locomotora de piojos humanos son contradictorios. Los primeros estudios demostraron una tendencia de los piojos al comportamiento fotonegativo, moviéndose en dirección contraria a la fuente de luz, descrito como una fototaxia negativa (Nuttal 1917, Wigglesworth 1941, Buxton 1946). Por el contrario, Mougabure Cueto y colaboradores (2011) encontraron que los piojos del cuerpo y la cabeza exhibían una respuesta fotopositiva en una arena de doble elección, ya que prefirieron permanecer en la zona iluminada por sobre

la que estaba en oscuridad total. En el presente estudio, los piojos expuestos a la luz de alta intensidad redujeron su actividad locomotora y después de cierto tiempo se detuvieron definitivamente.

Los resultados observados en nuestras series experimentales sugieren que el comportamiento corresponde a una *kinesis* y más específicamente a una *ortokinesis*. Las *kinesis* comprenden aquellos mecanismos donde la respuesta del animal es producto de la intensidad del estímulo y no de la dirección de éste. En la *ortokinesis*, la intensidad del estímulo ejerce un efecto modulador en la actividad locomotora del insecto, es decir, sobre la velocidad de desplazamiento (Matthews y Matthews 1978). De todas maneras, no descartamos que otros mecanismos estén involucrados en la respuesta de los piojos a estímulos térmicos y lumínicos.

En la segunda parte de este capítulo, se demostró que las condiciones de luz y temperatura seleccionadas (baja intensidad de luz y 30°C) permitieron observar respuestas comportamentales reproducibles y coherentes. Además, se demostró por primera vez que la actividad locomotora de piojos adultos puede ser alterada por dosis subletales de compuestos tóxicos. Estos resultados brindan información sustancial sobre cómo sería la potencial migración de piojos entre hospedadores en el caso hipotético de estar expuestos a compuestos tóxicos, como por ejemplo durante la aplicación de pediculicidas. Las dosis subletales de cipermetrina provocaron respuestas hiperactivadas en piojos adultos como se demostró en otros artrópodos como arañas y triatominos (Baatrup et al 1992, Alzogaray et al 2001). Las dosis subletales de DEET provocaron respuestas hipoactivadas en piojos. Del mismo modo, Sfara

y colaboradores (2013) encontraron que *Blatella germanica*, bajo el efecto del DEET, presentó un comportamiento de hipoactivación.

La observación de comportamientos estereotipados en piojos provocados por compuestos tóxicos demostró que la medición de la actividad locomotora en nuestra configuración experimental sería un parámetro apropiado para evaluar compuestos de importancia biológica, como por ejemplo los involucrados en la interacción hospedador-parásito y en las relaciones intraespecíficas de este insecto. Nuevos estudios comportamentales en los piojos permitirán amplificar el conocimiento de la biología de este insecto, herramienta elemental para un control más exitoso y preciso de la transmisión y la reinfestación.

Capítulo 2

EFFECTO ARRESTANTE DE COMPONENTES DEL CUERO CABELLUDO EN EL COMPORTAMIENTO DE *PEDICULUS HUMANUS* *CAPITIS*

2.1. Introducción

Los piojos de la cabeza dependen exclusivamente del microambiente del cuero cabelludo humano que le proporciona refugio, alimento y oviposición. Es posible que una combinación de factores físicos y químicos influya al piojo de la cabeza para seleccionar a sus hospedadores. En la actualidad, desconocemos si los piojos de la cabeza utilizan claves químicas para el reconocimiento del hospedador. Sin embargo, en uno de sus primeros trabajos, Wigglesworth (1941) demostró que un piojo del cuerpo adulto, en una arena de doble elección, siempre prefería la zona de la arena con olor humano con respecto a la otra zona con un olor control. Además, si se les presentaba una zona con olor a conejo o perro y la otra zona con olor humano, también preferían la zona con olor humano. Este autor también observó que el atractivo del olor humano aumentaba cuando se le agregaba el "olor a piojos", es decir olor de sus congéneres y sus excretas. En diseños experimentales similares, se observó que el piojo de la paloma, *Columbicola columbae* L., permanecía la mayor parte del tiempo en la zona de la arena con olor a paloma que en la zona control (Rakshpal 1959). Más tarde Mumcuoglu y sus colaboradores (1986), en ensayos de comportamiento con estímulos intraespecíficos presentes en las heces, demostraron la respuesta de agregación frente a ellos. Entre dichos compuestos encontraron la hemoglobina, xantina, hipoxantina, ácido úrico y sales de amonio.

Como se dijo antes, los hospedadores emiten una diversidad de estímulos al ambiente que son potencialmente utilizados por los artrópodos hematófagos

como claves de orientación (Lehane 2005). El cuero cabelludo humano contiene numerosas glándulas sebáceas que excretan grandes cantidades de lípidos no polares en la superficie de la piel (Downing 1992). Además, la composición microbiana de la piel afecta fuertemente la producción de estas secreciones glandulares (Verhulst et al., 2011). En conjunto, los compuestos presentes en la piel humana le otorgan a cada individuo su propia "huella o identidad química" que muchos insectos hematófagos utilizan para localizar a su hospedador. Es indudable que algunas personas son más susceptibles a las picaduras de mosquitos que otras, o que algunos niños son más propensos a ser infestados por piojos que otros. Compuestos químicos presentes en la piel, como ácidos grasos libres y el ácido láctico, resultaron ser modificadores del comportamiento de mosquitos, simúlidos, triatominos y moscas hematófagas (Lehane 2005). La acumulación de estos y otros compuestos presentes en la piel podría ser un factor que favorezca la atracción o preferencia de insectos hematófagos por ciertas personas. Sin embargo, la evaluación de la respuesta de los insectos hematófagos a los compuestos de la piel representa un problema complejo ya que el comportamiento de búsqueda es el resultado de la combinación de varios factores: las características y capacidades biológicas del insecto (incluidos los patrones locomotores y la percepción de la información sensorial), factores ambientales externos y factores internos que determinan las necesidades de un individuo en un momento particular (Bell 1990).

A pesar que los piojos causan una de las infestaciones parasitarias humanas más prevalentes en el mundo, las bases sensoriales de la percepción del hospedador en el piojo de la cabeza han sido escasamente estudiadas.

En este capítulo, se estudió el comportamiento del piojo en respuesta a compuestos presentes en el cuero cabelludo humano. Se analizó si la respuesta hacia compuestos humanos de la cabeza podría verse afectada por variaciones intrínsecas de las muestras de cuero cabelludo, por ejemplo, 1- por diferencias entre las muestras de distintos voluntarios y 2- el tiempo transcurrido luego del último lavado de la cabeza del voluntario. Y además si dicha respuesta era diferente entre machos y hembras.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Insectos

Los machos y hembras se recolectaron y se mantuvieron hasta el momento de los ensayos como se detalla en el Capítulo 1.

2.2.2. Colecta de compuestos del cuero cabelludo humano

Las muestras se obtuvieron frotando el cuero cabelludo humano con papeles de filtros en distintas zonas de la cabeza de 5 voluntarios. Cada muestra se colectó cinco minutos antes de los ensayos comportamentales. Los trozos de papel de filtro Whatman (1 cm x 1 cm) (Buckinghamshire, Reino Unido) se frotaron suavemente contra el cuero cabelludo durante 30 segundos y se reservaron hasta el momento del ensayo. Diez días antes de la toma de muestra, cada sujeto recibió un champú libre de fragancias (Biferdil®, Argentina) para disminuir el impacto de fuentes exógenas de compuestos químicos.

2.2.3. Dispositivo experimental

La arena experimental consistió en un papel de filtro circular (diámetro: 55 mm) como el sustrato de la caja de Petri. La arena fue dividida en dos zonas simétricas con el trazado de una línea (Figura 1B). Se realizaron dos tipos de ensayos: 1- cuando en ambas zonas de la arena se colocaban papeles de filtro (1 cm x 1 cm) limpios o sin claves químicas, 2- cuando en una de las zonas, denominada zona estímulo, se colocaba el papel de filtro con la muestra de cuero cabelludo humano y en la zona opuesta o control de la arena se colocaba un papel limpio (Figura 1). Cada individuo de *P. humanus capitis* se colocó delicadamente en el centro de la arena y se le permitió caminar durante cinco minutos. Como se explicó anteriormente, el comportamiento de los insectos fue filmado y grabado y los datos analizados posteriormente utilizando el programa de análisis Ethovision XT 10.1 (Noldus Information Technology, Sterling, VA). Los experimentos se realizaron bajo las condiciones óptimas de temperatura, luz y humedad (temperatura = 30 °C; luz de baja intensidad = 21 lux y humedad relativa = 50 % HR) para los insectos, determinadas experimentalmente en el Capítulo 1.

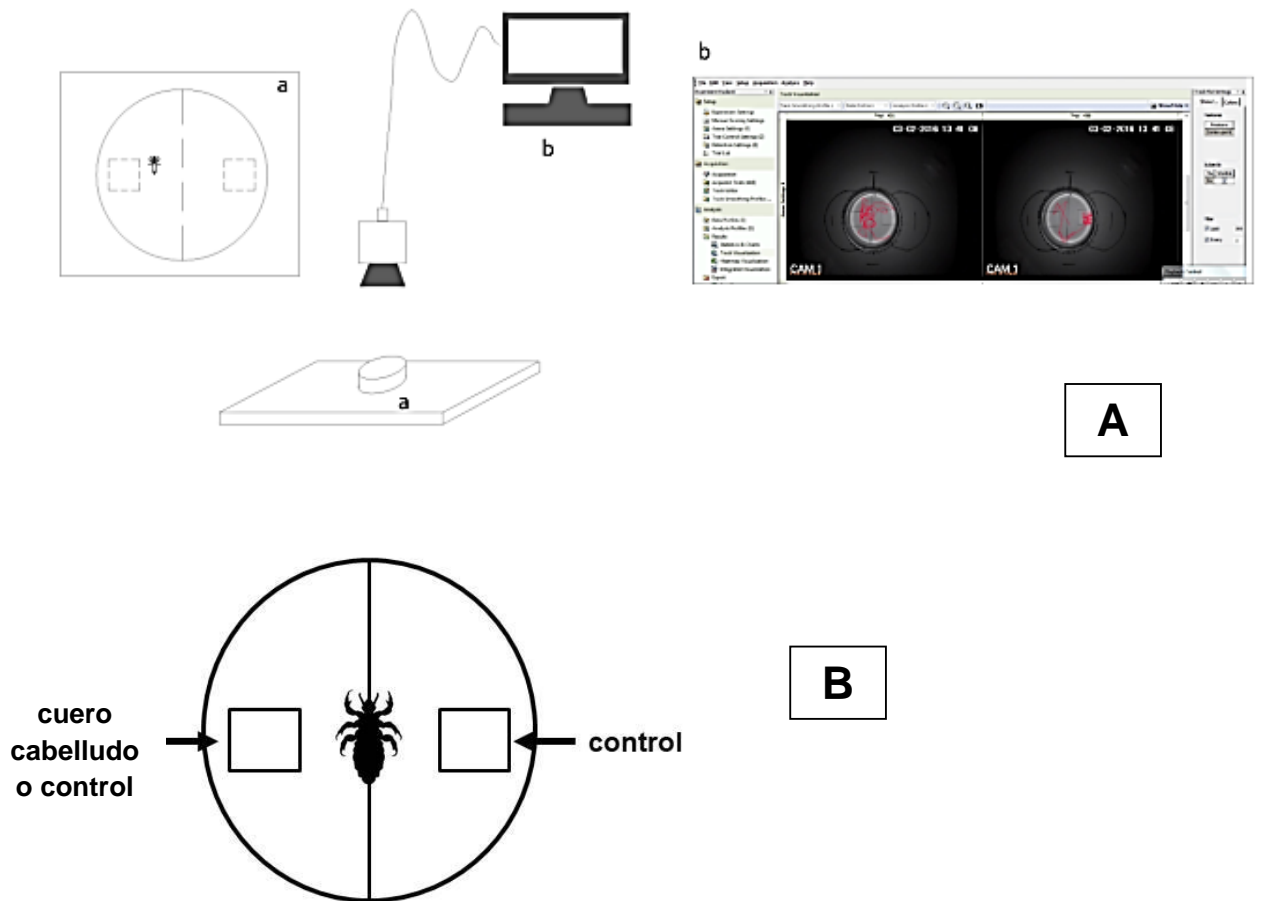


Figura 1. (A) Esquema del dispositivo experimental utilizado para medir comportamiento. (B) Detalle de la arena experimental donde se midió la respuesta del piojo a estímulos químicos del cuero cabelludo humano. La arena se dividió en dos zonas y en cada una de ellas se colocó un papel de filtro con el estímulo y en la otra el papel control o en ambas zonas se colocaban papeles de filtro limpios.

2.2.4. Efecto de variaciones entre individuos y del tiempo post lavado del cabello en la respuesta comportamental de los piojos

En el análisis de posibles variaciones intra-individuales en las muestras de cuero cabelludo participaron cinco voluntarios adultos: tres mujeres (28 - 30 años) y dos hombres (28 - 30 años).

Por otro lado, se estudió el efecto de los componentes humanos del cuero cabelludo a distintos tiempos post lavado en la respuesta comportamental de los piojos de la cabeza. Se tomaron muestras independientes a las 4, 18, 40 y 60 horas post lavado para cada voluntario. Los voluntarios recibieron instrucciones de no lavarse el cabello durante el período analizado. Por ejemplo, el día que se evaluó la respuesta comportamental a la muestra de 60 horas, el voluntario X pasó 60 horas previas al ensayo sin lavarse la cabeza. Solo se utilizaron hembras que se estudiaron individualmente.

2.2.5. Influencia del sexo de los piojos en la respuesta comportamental a sustancias provenientes del hospedador

Se analizó independientemente el comportamiento de machos y hembras a las muestras de cuero cabelludo. Para la obtención del estímulo, se recolectaron muestras de cuero cabelludo humano proporcionadas por los cinco voluntarios después de un período de 40 horas sin lavado.

2.2.6. Variables medidas

Se cuantificaron las siguientes variables utilizando el programa de registro Ethovision:

1. distancia total (cm),
2. velocidad promedio (cm / s)
3. número de veces que un piojo cruzó la línea divisoria entre las zonas de la arena (# cruces)
4. porcentaje de tiempo pasado en cada zona de la arena (% tiempo)

Adicionalmente y con fines descriptivos cualitativos se obtuvo la trayectoria de los insectos desplegada a lo largo de los ensayos.

2.2.7. Análisis estadístico

La respuesta de los piojos a los estímulos provenientes del cuero cabelludo, se analizó a través de un análisis de componentes principales (ACP, Infostat®). Al utilizar un ACP, se evitan tomar decisiones *a priori* sobre en qué variable comportamental enfocarse. Para complementar el análisis de ACP, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson para determinar las correlaciones entre el componente principal 1 (CP1) y los parámetros de comportamiento (distancia total, velocidad promedio, número de veces que un piojo cruzó la línea divisoria entre las zonas y el porcentaje de tiempo que pasó cada piojo en la zona del estímulo) con nivel de significancia $p < 0,001$.

Luego, se analizó el efecto de las muestras de cuero cabelludo humano con distintos tiempos de post lavado en el comportamiento de los piojos estudiados mediante modelos lineales generales. Para ello, los valores de CP1 obtenidos previamente se usaron para reducir las variables de comportamiento en el modelo (el CP1 es el resultado de la combinación de las cuatro variables, entonces para cada insecto existe un valor de CP1).

La normalidad de los datos se determinó gráficamente (gráfica Q-q). El supuesto de homocedasticidad no se cumplió pero la bondad de ajuste del modelo mejoró significativamente cuando modelamos la varianza mediante la función varPower.

También se estudió mediante análisis de ACP el efecto del sexo en la respuesta de los piojos expuestos a muestras de cuero cabelludo humano y el primer componente resultante (CP1) se utilizó para ejecutar un modelo lineal general con modelado de varianza a través de la función varExp.

El software estadístico R (v.3.3.1) (R Core Team 2016) se utilizó para todos los análisis.

2.3. Resultados

2.3.1. Respuesta comportamental del piojo hacia compuestos provenientes del cuero cabelludo de un hospedador

En la Figura 2 se muestra un ejemplo de la trayectoria de una hembra adulta en la arena control y en la arena con muestras de cuero cabelludo humano obtenidas a partir del software Ethovision®. En general, los insectos tendieron a ser principalmente tigmotácticos en las arenas control. En las arenas tratadas con muestras de cuero cabelludo humano, los piojos permanecieron en su mayoría arrestados en la zona del estímulo, observándose además, la elevación del cuerpo de cada insecto provocando que la cabeza se aproxime a la superficie de la zona con el estímulo. En observaciones adicionales bajo lupa, algunos insectos cuando entraron en contacto con dichas muestras provenientes del hospedador, extendieron el haustelo.

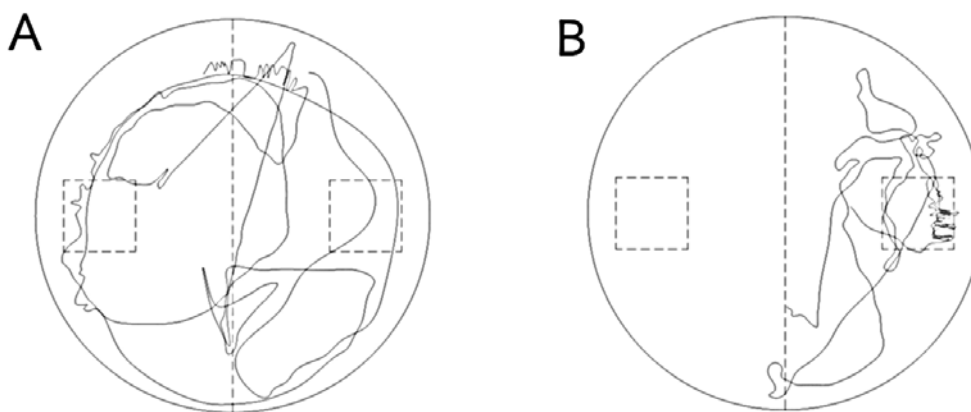


Figura 2. Ejemplo de una trayectoria que hizo una hembra adulta de *P. humanus capitis* en una arena control (A) y en una arena tratada con estímulo del hospedador (B).

2.3.2. Respuesta de los piojos según el tiempo post lavado del cabello y los diferentes voluntarios.

En la Tabla 1, se observan los valores de los parámetros locomotores promedios para cada combinación de voluntario y tiempo de post lavado del cuero cabelludo humano.

| | | Distancia promedio ± ES | Velocidad Promedio ± ES | Número de cruces entre zonas de la arena ± ES | Porcentaje de tiempo de permanencia en la zona del estímulo ± ES |
|------------|---------|-------------------------------|-------------------------------|--|---|
| Voluntario | (horas) | (cm) | (cm/s) | | (%) |
| CTRL | 4 | 73,665±4,372 | 0,305±0,028 | 19,8±3,1 | 49,329±7,523 |
| CTRL | 18 | 74,266±12,35 | 0,28±0,057 | 14,6±2,73 | 50,969±9,345 |
| CTRL | 40 | 105,143±19,962 | 0,399±0,054 | 25,4±6,816 | 57,174±6,689 |
| CTRL | 60 | 89,331±15,678 | 0,504±0,099 | 11±2 | 49,585±11,212 |
| VA28 | 4 | 48,726±7,176 | 0,253±0,041 | 8±2,950 | 87,550±5,838 |
| VA28 | 18 | 51,877±7,313 | 0,227±0,041 | 7,571±2,125 | 79,608±5,868 |
| VA28 | 40 | 49,943±13,594 | 0,221±0,073 | 3,857±1,280 | 95,401±2,609 |
| VA28 | 60 | 51,224±7,753 | 0,221±0,0347 | 5,667±1,215 | 95,864±1,862 |
| IOI29 | 4 | 61,583±8,769 | 0,395±0,075 | 7,6±2,379 | 87,118±5,758 |
| IOI29 | 18 | 53,910±8,453 | 0,222±0,041 | 2,2±0,916 | 84,447±6,908 |
| IOI29 | 40 | 49,366±7,696 | 0,240±0,049 | 7±1,927 | 80,460±7,866 |
| IOI29 | 60 | 46,750±3,820 | 0,203±0,0197 | 4,125±0,692 | 91,945±2,998 |
| PGA39 | 4 | 50,904±5,484 | 0,302±0,070 | 11,667±3,593 | 72,474±8,356 |
| PGA39 | 18 | 53,730±6,845 | 0,269±0,057 | 8,571±1,571 | 75,296±7,460 |
| PGA39 | 40 | 48,456±4,117 | 0,215±0,0219 | 11±1,879 | 78,034±5,135 |
| PGA39 | 60 | 47,186±9,056 | 0,198±0,043 | 5,8±1,827 | 83,217±5,571 |
| FGG29 | 4 | 55,658±12,678 | 0,285±0,108 | 8,8±3,652 | 86,576±6,446 |
| FGG29 | 18 | 48,145±8,904 | 0,249±0,057 | 5,8±2,396 | 91,689±5,365 |
| FGG29 | 40 | 54,571±8,290 | 0,225±0,042 | 9±2,582 | 83,911±6,632 |
| FGG29 | 60 | 38,049±3,011 | 0,179±0,022 | 7,2±1,068 | 85,241±1,845 |
| AAC28 | 4 | 47,107±8,693 | 0,256±0,062 | 7,5±2,029 | 82,349±6,416 |
| AAC28 | 18 | 46,354±3,945 | 0,194±0,019 | 7,2±1,241 | 71,778±10,775 |
| AAC28 | 40 | 45,059±4,694 | 0,178±0,024 | 3,833±1,138 | 89,515±4,311 |
| AAC28 | 60 | 45,257±4,158 | 0,167±0,017 | 4,8±0,860 | 85,331±2,659 |

Tabla 1. Valores promedios para los cuatro parámetros de locomoción: distancia promedio, velocidad promedio, número de cruces entre zonas y porcentaje de tiempo de permanencia en la zona del estímulo para cada combinación de voluntario y tiempo de post lavado del cabello.

En la Figura 3, se observa el resultado del Análisis de Componentes Principales. Para estudiar el efecto del tiempo de post lavado de las muestras de cuero cabelludo humano, el ACP produjo dos componentes principales (CP1 y CP2). El CP1 representó el 68,75% de la dispersión de los datos recopilados.

Brevemente, se observan dos grandes grupos de datos: los datos para los cinco voluntarios se aglomeraron hacia valores negativos del CP1 y los datos para los controles hacia valores positivos del CP1. No se observaron subgrupos debido al efecto del tiempo post lavado la muestra o a los voluntarios.

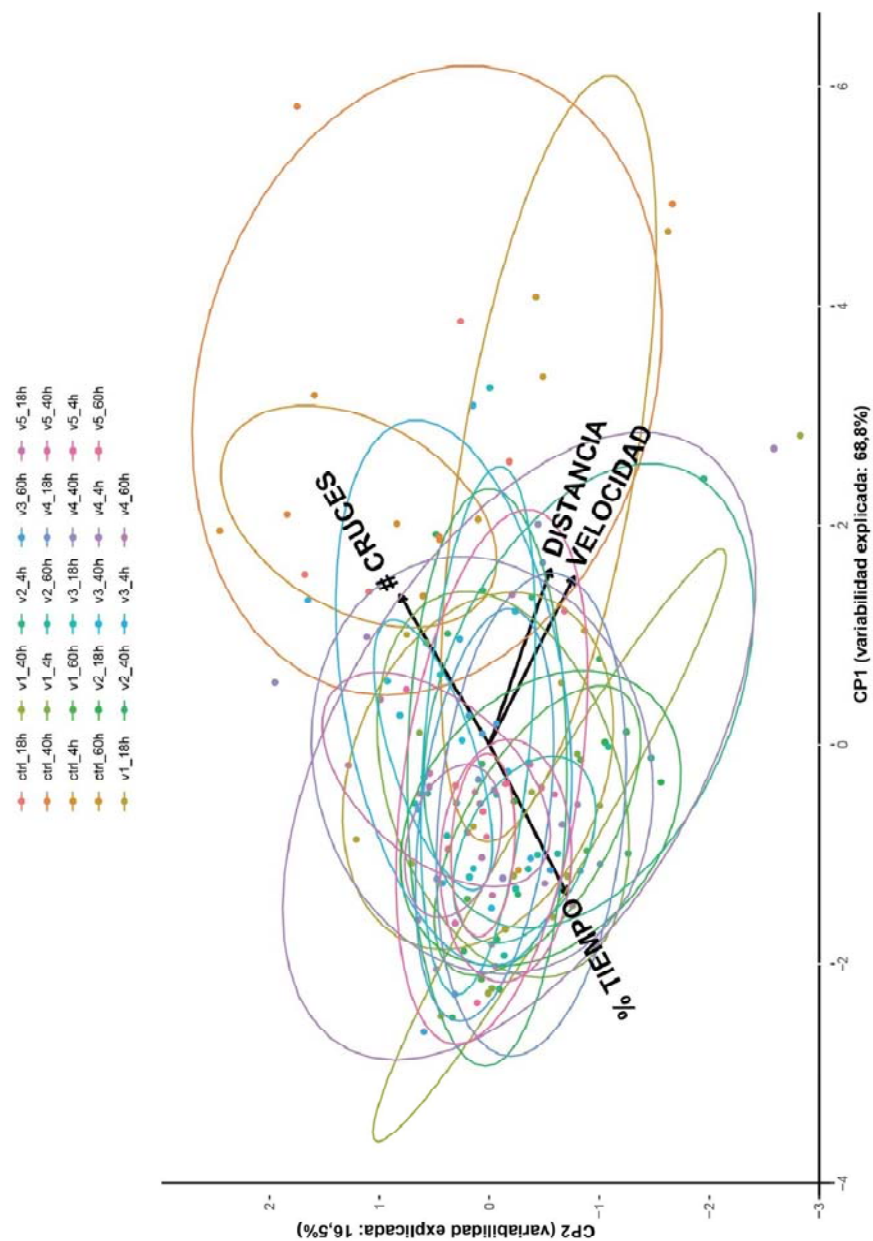


Figura 3. Análisis de componentes principales para estudiar el efecto del tiempo post lavado de las muestras de cuero cabelludo y los voluntarios. Cada punto representa la combinación de los cuatro parámetros para un piojo evaluado: distancia, velocidad, número de cruces y porcentaje de tiempo en la zona del estímulo para un determinado tratamiento. Por ejemplo, los puntos v1_18h representan aquellos piojos evaluados con la muestra sin lavado por 18 horas del voluntario 1.

En la Tabla 2 se muestran los coeficientes de correlación de Pearson de los parámetros locomotores con el CP1, que se renombró como Factor de Actividad Locomotora (FAL). Se observó que el FAL correlacionó significativamente con los cuatro parámetros estudiados ($p < 0,001$). Se encontró una correlación positiva para la distancia, velocidad y número de cruces entre zonas y una correlación negativa con el porcentaje de tiempo pasado en la zona tratada.

En resumen, los parámetros de locomoción promedio para los controles se ubicaron hacia valores positivos del CP1 mientras que los parámetros de locomoción promedio para los cinco voluntarios se aglomeraron en un rango de valores negativos del CP1. Los valores de CP1 positivos se traducen en un mayor número de cruces entre zonas, distancia recorrida y velocidad promedio en la arena y un menor porcentaje de tiempo pasado en la zona del estímulo. Valores de CP1 negativos se traducen en un menor número de cruces entre zonas, distancia recorrida y velocidad promedio en la arena y un mayor porcentaje de tiempo pasado en la zona del estímulo.

| Parámetro comportamental | Coefficiente de correlación de Pearson para Factor de actividad locomotora (FAL) |
|---|--|
| Distancia | 0,904 * |
| Velocidad | 0,865 * |
| Número de cruces entre zonas de la arena | 0,769 * |
| % de tiempo de permanencia en la zona del estímulo | -0,770* |

Tabla 2. Coeficiente correlación de Pearson entre el Factor de Actividad Locomotora (FAL) y los parámetros comportamentales. Los asteriscos muestran correlaciones significativas con $p < 0,001$.

Bajo el análisis del modelo lineal general, la interacción entre la presencia de muestras de cuero cabelludo humano y el tiempo post lavado de las muestras de cuero cabelludo humano fue no significativa ($F = 1,39$, $gl = 15$, $p = 0,1646$).

Al evaluar cada factor por separado, la presencia de sustancias del cuero cabelludo humano en la arena afectó significativamente el comportamiento del piojo de la cabeza ($F = 26,63$, $gl = 5$, $p < 0,0001$). Los insectos en promedio caminaron más lento en las arenas tratadas, arrestándose en la zona del estímulo. Mientras que para el factor tiempo sin lavado, no hubo un efecto significativo en la actividad locomotora de los piojos ($F = 0,92$, $gl = 3$, $p = 0,4345$).

En comparaciones *a posteriori*, las muestras de cuero cabelludo humano de cinco voluntarios diferentes no fueron significativamente diferentes entre sí y solo fueron significativamente diferentes al control (Figura 4).

Los piojos respondieron de manera estadísticamente uniforme a muestras del hospedador independientemente del origen de la muestra (diferentes voluntarios) o el tiempo de post lavado en nuestro esquema experimental. El FAL fue significativamente menor en arenas tratadas que en las arenas control (Figura 4).

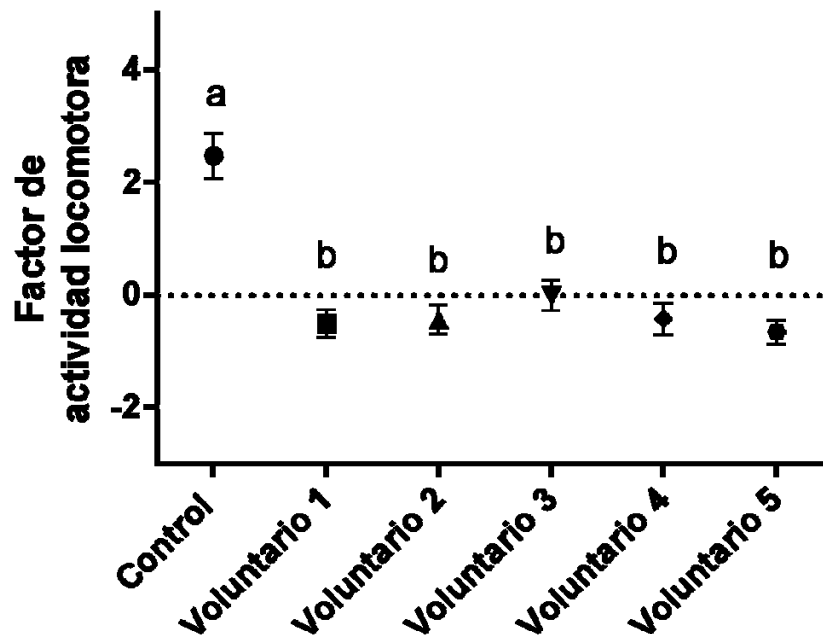


Figura 4. Factor de actividad locomotora promedio para los piojos que caminaron en arenas control y en arenas con muestras provenientes de cinco voluntarios. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0,05$)

2.3.3. Respuesta comportamental a sustancias del hospedador en machos y hembras

En la Tabla 3, se observan los valores de los parámetros locomotores promedios para cada combinación de voluntario y sexo de los piojos.

| | | Distancia promedio ± ES | Velocidad promedio ± ES | Número de cruces entre zonas de la arena ± ES | Porcentaje de tiempo de permanencia en la zona del estímulo ± SE |
|------------|--------|-------------------------------|-------------------------------|--|--|
| Voluntario | sexo | (cm) | (cm/s) | | (%) |
| CTRL | macho | 54,47±6,55 | 0,21±0,07 | 9,9±1,6 | 50,34±6,76 |
| VA28 | macho | 46,15±5,28 | 0,17±0,02 | 5,29±0,75 | 85,19±5,12 |
| IOI29 | macho | 54,8±10,4 | 0,22±0,05 | 11±5 | 78,3±4,3 |
| PGA39 | macho | 55,98±19,83 | 0,22±0,08 | 8,5±4,4 | 84,31±10,5 |
| FGG29 | macho | 46,59±5,14 | 0,16±0,02 | 3,5±0,5 | 90,4±2,5 |
| AAC28 | macho | 43,27±8,02 | 0,15±0,03 | 3±1 | 89,6±4,3 |
| CTRL | hembra | 105,14±19,96 | 0,399±0,05 | 25,4±6,82 | 57,174±6,69 |
| VA28 | hembra | 49,943±13,59 | 0,221±0,07 | 3,857±1,28 | 95,401±2,61 |
| IOI29 | hembra | 49,366±7,69 | 0,240±0,05 | 7±1,93 | 80,460±7,87 |
| PGA39 | hembra | 48,456±4,11 | 0,215±0,02 | 11±1,88 | 78,034±5,13 |
| FGG29 | hembra | 54,571±8,29 | 0,225±0,04 | 9±2,58 | 83,911±6,63 |
| AAC28 | hembra | 45,059±4,69 | 0,178±0,02 | 3,833±1,14 | 89,515±4,31 |

Tabla 3. Valores promedios para los cuatro parámetros de locomoción: distancia promedio, velocidad promedio, número de cruces entre zonas y porcentaje de tiempo de permanencia en la zona del estímulo para cada combinación de voluntario y sexo de los piojos.

El Análisis de Componentes Principales explicó el 68,8% de la variabilidad de los datos recopilados para piojos de ambos sexos y cinco voluntarios diferentes.

Solo las elipses que abarcan los controles para machos y hembras se desprenden del resto de los datos para los piojos machos y hembras. Los valores de CP1 para piojos machos y hembras que respondieron a muestras de distintos voluntarios se solaparon en su mayoría (Figura 5).

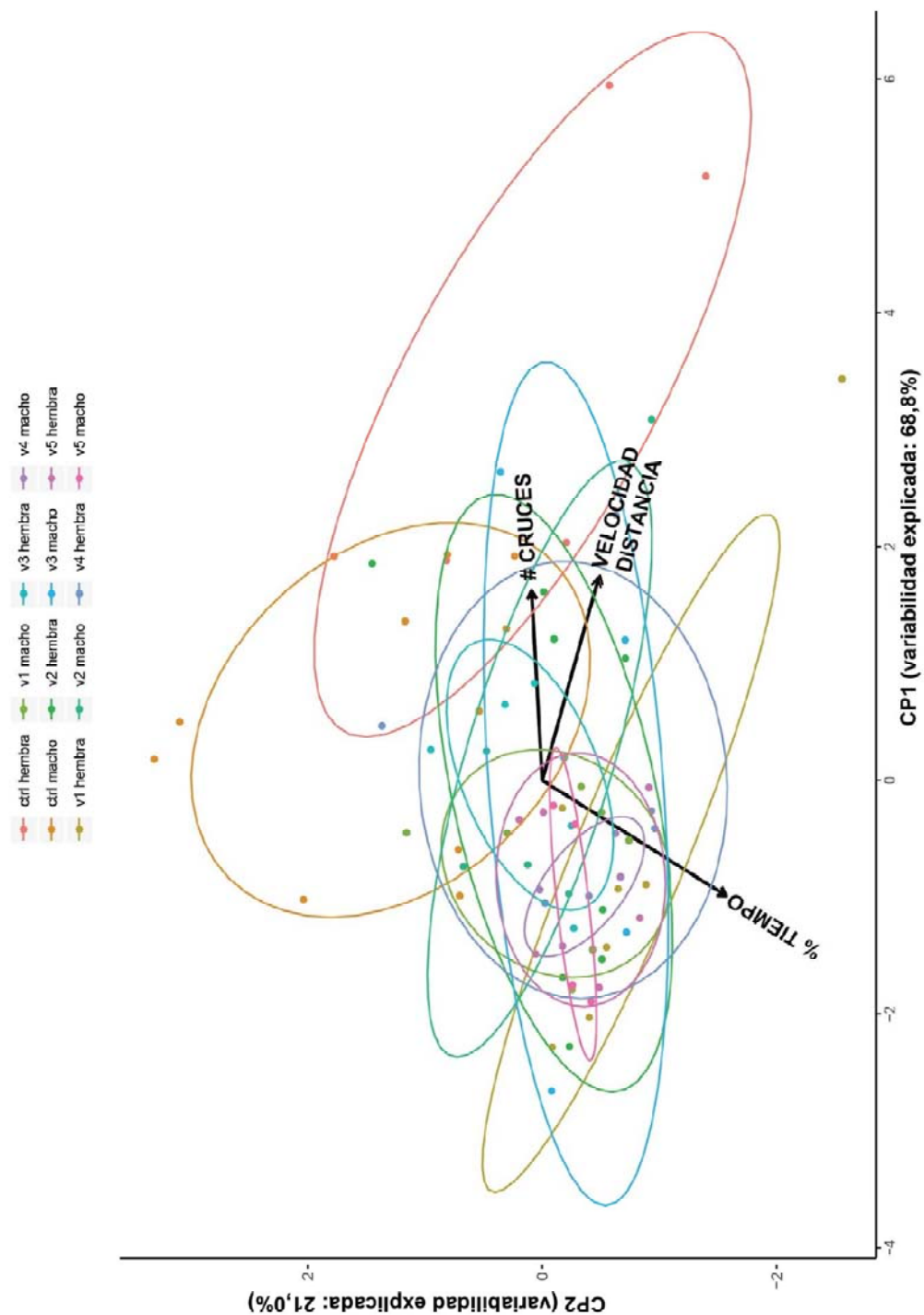


Figura 5. Análisis de componentes principales para estudiar el efecto del sexo y los voluntarios. Cada punto representa la combinación de los cuatro parámetros para un piojo evaluado: distancia, velocidad, número de cruces y porcentaje de tiempo en la zona del estímulo para un determinado tratamiento.

El factor de actividad locomotora (FAL) correlacionó positivamente con la distancia, la velocidad y el número cruces entre zonas, y negativamente con el porcentaje del tiempo de permanencia en la zona del estímulo (Tabla 4).

| Parámetro comportamental | Coefficiente de correlación de Pearson para Factor de actividad locomotora (FAL) |
|--|--|
| Distancia | 0,936 * |
| Velocidad | 0,923* |
| Número de cruces entre zonas de la arena | 0,864 * |
| % de tiempo de permanencia en la zona del estímulo | -0,527* |

Tabla 4. Coeficiente correlación de Pearson entre el Factor de Actividad Locomotora (FAL) y los parámetros comportamentales. Los asteriscos muestran correlaciones significativas con $p < 0,001$.

La interacción entre el factor presencia/ausencia del estímulo y el sexo de los piojos fue no significativa ($F = 1,58$; $gl = 5$; $p = 0,179$).

Tanto los piojos machos como hembras eligieron significativamente la zona del estímulo, mostrando un comportamiento arrestado ($F = 4,60$; $gl = 5$; $P = 0,0013$). El efecto del sexo fue marginalmente significativo: los piojos machos mostraron en promedio una menor actividad locomotora en la zona del estímulo que las hembras ($F = 4,12$; $gl = 1$; $p = 0,0471$) (Figura 6). Sin embargo, este efecto marginal del sexo pareciera deberse a hembras particularmente móviles

en las arenas controles y no a respuestas diferenciales entre machos y hembras en las arenas con el estímulo del hospedador.

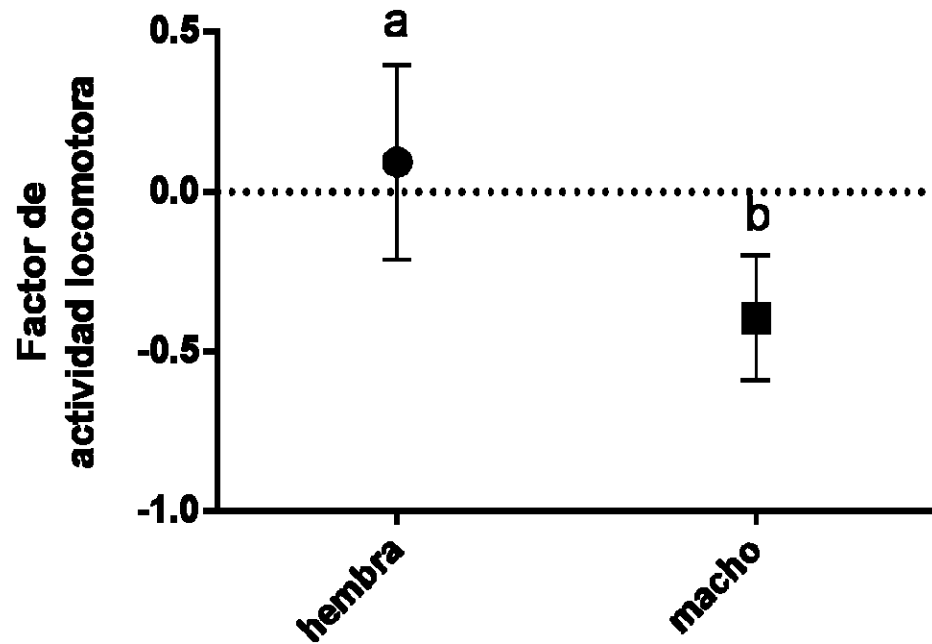


Figura 6. Factor de actividad locomotora para piojos machos y hembras. Letras distintas indican diferencias significativas, $p < 0.05$.

2.4. Discusión

En este capítulo, establecimos por primera vez que muestras provenientes del cuero cabelludo humano desencadenan un comportamiento arrestante en piojos de la cabeza adultos. Es decir, los piojos disminuyen su actividad locomotora promedio y permanecen en cercanías del estímulo al percibir los compuestos del cuero cabelludo. Carrol y sus colaboradores (1995) observaron el cese de la actividad locomotora de la garrapata, *Ixodes scapularis* en presencia de extractos de la glándula tarsal de su hospedador, el venado de cola blanca, *Odocoileus virginianus*. Este comportamiento también se ha observado en parasitoides interactuando con sustancias de sus hospedadores, por ejemplo el hiperparasitoide del áfido, *Alloxysta victrix*, se arrestó en presencia de secreciones de los cornículos de los áfidos y extractos de áfidos parasitados (Grasswitz 1998).

El efecto arrestante de los piojos frente a los estímulos provenientes del hospedador podría ser el resultado de un mecanismo ortokinético. Es decir, un mecanismo en el cual la velocidad de la actividad locomotora del insecto es afectada por un estímulo externo (Kennedy 1975). Adicionalmente, cuando los piojos estuvieron en presencia de sustancias del cuero cabelludo humano no solo se observó una respuesta locomotora, sino que también se observó que los individuos que estaban directamente sobre la zona de estímulo, acercaban sus cabezas y elevaban el resto de su cuerpo. Incluso, en varios especímenes, se evidenció la protrusión de los haustelos en contacto con la muestra de cuero cabelludo. Este conjunto de observaciones estarían dando la pauta que el

estímulo químico del hospedador sería el disparador de comportamientos asociados a la búsqueda de alimento una vez que el piojo llega al hospedador. Nuttall (1917) describió los hábitos de alimentación de los piojos humanos mencionando que los piojos alimentados sobre la mano de un voluntario elevaban la parte posterior de sus cuerpos mientras se alimentaban. Bajo las condiciones de nuestros ensayos, es evidente que los piojos perciben los olores de las sustancias del cuero cabelludo humano como indicadores de recursos alimenticios, como se demostró con otras claves asociadas al hospedador en otros insectos hematófagos (como el calor, el dióxido de carbono, etc.).

La respuesta de los piojos no se modificó significativamente cuando se moduló el tiempo post lavado de las muestras de cuero cabelludo humano ni tampoco por las muestras de voluntarios diferentes. Una explicación posible con respecto al no efecto de muestras más “viejas” (y probablemente más concentradas) es que los piojos tengan una sensibilidad muy alta a los estímulos del hospedador observándose respuestas significativas con muestras de poco tiempo post lavado. Con respecto a las muestras provenientes de distintos hospedadores, si bien no observamos diferencias entre voluntarios, no es posible descartar que exista una “selección” de hospedadores en base a claves químicas. Sería necesario para confirmar estos resultados realizar experimentos de doble elección con muestras de diferentes individuos de forma simultánea.

A diferencia de los antecedentes previos, el presente estudio ha registrado medidas de comportamiento estadísticamente confiables, que brindan mejor información acerca de cómo estos insectos evalúan la información proveniente

del hospedador. Se esperaría que un comportamiento de arrestamiento tan marcado esté directamente asociado con una maquinaria quimiosensorial compleja. Sin embargo, estudios previos en piojos humanos y piojos de otros vertebrados, mostraron que existe una reducción en las estructuras periféricas sensoriales y en el número de genes sensoriales en comparación con otros insectos estudiados (Kirkness et al. 2010, Crespo y Vickers 2012).

En el esquema experimental desarrollado, no se pudo determinar la modalidad sensorial por la cual los piojos procesan la información del hospedador y más estudios son necesarios. Los órganos sensoriales de los piojos como la antena, las piezas bucales y las patas son candidatos a presentar estructuras sensoriales que puedan reconocer la información relacionada con el hospedador.

Los piojos están altamente especializados en el movimiento entre los cabellos del hospedador. Sin embargo, tienden a moverse con dificultad y muy lentamente en otros sustratos, como el vidrio, el papel, la seda, etc. (Wigglesworth, 1941). En consecuencia, el mecanismo más relevante por el cual llegan al hospedador es el mero movimiento entre los hospedadores cuando éstos se encuentran relativamente cerca (Lehane 2005, Heukelbach 2010). En este escenario particular, el piojo depende casi exclusivamente de las habilidades sociales de su hospedador para propagarse e iniciar una nueva colonia (Rozsa y Apari 2012).

Bajo estas condiciones, los piojos muestran un comportamiento de “búsqueda” diferente y única que solo se puede comparar con la estrategia de emboscada de una garrapata que consiste en posicionarse en la punta de un arbusto para

aumentar la probabilidad de que un hospedador lo contacte en lugar de moverse activamente hacia él (Carroll 1995). Sin embargo, estos arácnidos en general pueden sobrevivir períodos de tiempo más largos sin alimento, mientras que los piojos de la cabeza pueden sobrevivir pocas horas fuera del hospedador.

Por lo tanto, los piojos, debido a sus limitaciones fisiológicas, solo pueden “confiar” en el comportamiento social de sus hospedadores y no pueden realizar una búsqueda activa usando claves químicas y físicas a larga distancia como lo hacen otros insectos hematófagos (Guidobaldi et al., 2014, Barrozo et al. 2017).

Teniendo en cuenta la biología y ecología particular de los piojos de la cabeza, proponemos que éstos evalúan claves asociadas al hospedador durante el movimiento de uno a otro. Alternativamente, la información quimiosensorial podría evaluarse cuando el piojo ya se encuentra en la cabeza y la información procesada los haría tomar la decisión de permanecer o abandonar ese hospedador. En ambos casos, la predicción de que existe una infestación diferencial entre hospedadores es apropiada. Esta condición, que significa que la mayoría de los hospedadores albergan pocos piojos, mientras que algunos hospedadores portan la gran mayoría de parásitos, representa una estrategia común en poblaciones de parásitos incluyendo diferentes especies de piojos (Shaw y Dobson 1995, Buxton 1946, Wigglesworth 1941, Heukelbach 2010).

En conclusión, en este capítulo se demostró por primera vez que los piojos disminuyen su actividad locomotora y presentan un comportamiento asociado a

la búsqueda de alimento cuando perciben sustancias del cuero cabelludo humano.

2.5. Anexo

Se estudió el efecto de un factor externo (temperatura) e interno (el ayuno) en la respuesta de los piojos a sustancias provenientes del hospedador.

Experimento 1: Efecto de la temperatura de la arena en la respuesta comportamental a sustancias provenientes del hospedador

Se estudió el efecto de la temperatura en la respuesta de los piojos a sustancias provenientes del hospedador. Los piojos se expusieron a papeles con estímulo vs papeles control en uno de los dos niveles del tratamiento Temperatura: en una arena a 25°C o una a 30°C. Para cada arena, la temperatura se midió antes y después de cada ensayo con un termómetro digital.

Experimento 2: Efecto del ayuno en la respuesta comportamental a sustancias provenientes del hospedador

El efecto del ayuno en la respuesta comportamental de los piojos a sustancias provenientes del hospedador se estudió en nuestro dispositivo experimental. El tiempo de ayuno se moduló alimentando a los insectos sobre los brazos de un voluntario, en dos tratamientos: 5 minutos de ayuno y dos horas de ayuno. Cada piojo, al cual se le asignó al azar uno de los dos niveles del tratamiento, se evaluó individualmente en la arena de doble elección de estímulo del hospedador vs papel limpio.

En los Experimentos 1 y 2 solo se usaron muestras provenientes de un solo voluntario.

Resultados

Experimento 1: Efecto de la temperatura de la arena en la respuesta comportamental a sustancias provenientes del hospedador

No se observó efecto significativo de la temperatura de la arena sobre la respuesta comportamental de los piojos a sustancias provenientes del hospedador ($t = 0,0917$; $p = 0,9275$; $gl = 31$). Los piojos eligieron permanecer un mayor porcentaje de tiempo en la zona del estímulo independientemente de la temperatura de la arena (tanto en la arena a 25°C como a 30°C).

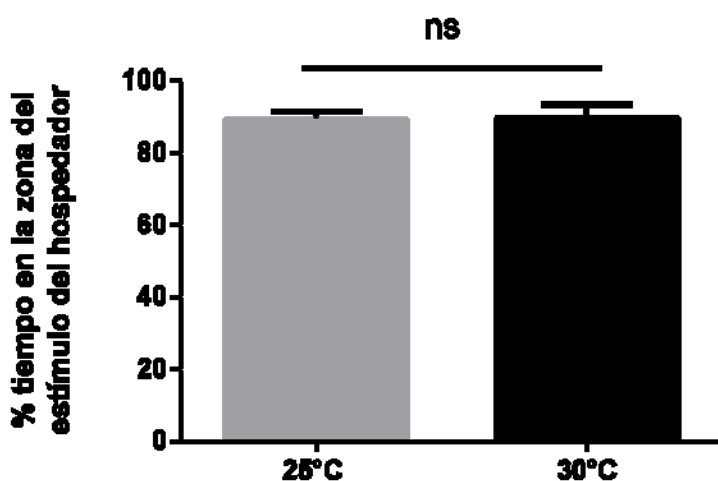


Figura 1. Porcentaje de tiempo promedio que pasaron los piojos en la zona del estímulo del hospedador en arenas a 25°C y a 30 °C. Abreviación: ns= el efecto del tratamiento fue no significativo.

Experimento 2: Efecto del ayuno en la respuesta comportamental a sustancias provenientes del hospedador

No se observó efecto significativo de los tiempos de ayuno evaluados en la respuesta comportamental de los piojos a sustancias provenientes del hospedador ($t = 0,5026$; $p = 0,6192$; $gl = 28$). Los piojos eligieron permanecer

un mayor porcentaje de tiempo en la zona del estímulo independientemente del tiempo de ayuno (tanto con ayuno de 5 minutos como de 2 horas).

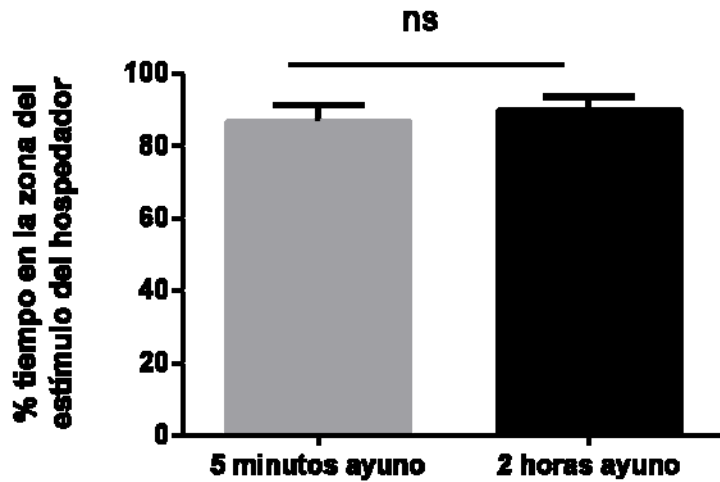


Figura 2. Porcentaje de tiempo promedio que pasaron los piojos en la zona del estímulo del hospedador tratados con ayuno de 5 minutos y 2 horas. Abreviación: ns= El efecto del tratamiento fue no significativo.

Con los resultados de estas dos series experimentales, se continuó con la caracterización de la respuesta de los piojos a muestras del cuero cabelludo de voluntarios y tiempos de post lavado diferentes.

Capítulo 3

EL ROL DE LA ANTENA DE *PEDICULUS HUMANUS* CAPITIS: UNA APROXIMACIÓN MORFOLÓGICA

3.1. Introducción

En la búsqueda de recursos, los organismos detectan diferentes claves provenientes del ambiente a través de los órganos sensoriales. En los insectos, la unidad estructural y funcional que participa en la recepción sensorial es la sensilia, la cual puede estar presente en distintos órganos sensoriales como las patas, el ovipositor, aparato bucal y especialmente en las antenas. La distribución y diversidad de sensilias es mayor en las antenas en general. Como resultado de esto, las antenas representan el órgano sensorial multimodal más importante de los insectos, presentando no solo sensilias olfativas, sino también de contacto, mecano-, higo- y termorreceptoras, y a veces hasta sensores para CO₂ (Keil 1999). La función primaria y a veces única de la antena es como órgano sensorial. Por lo tanto, es de esperar que su tamaño y el número de sensilias que posea sean reflejos directos de las necesidades sensoriales del insecto (Chapman 1982).

La antena de los piojos asociados a diferentes vertebrados (orden Phthiraptera) fue descrita en varias ocasiones. Ésta está formada por un escapo, un pedicelo y un flagelo dividido en tres flagelómeros. Piojos de elefantes, de gallinas, de palomas, de vacas, de cerdos y de hasta humanos presentan, en general, pocos y similares tipos de sensilias concentradas en los últimos dos flagelómeros (Wigglesworth 1941, Miller 1969, Uberlaker 1973, Slifer y Sekhon 1980, Baker y Chandrapatya 1992). La antena del piojo humano del cuerpo fue caracterizada por primera vez por Keilin y Nuttall (1930) en su trabajo denominado “Estudios Iconográficos de *Pediculus humanus*”. En él, se

encuentra una figura (Figura 5 de sección Introducción) que ilustra una antena vista por transparencia donde se pueden observar varias sensillas (la mayoría en el último flagelómero) y las neuronas que se encuentran en la base de ellas. Inclusive, se puede observar un nervio antenal que viaja en sentido distal a proximal por la antena. Wigglesworth (1941) retoma el estudio de la fisiología sensorial del piojo del cuerpo y en él postula que la antena presenta tres tipos de sensillas: órganos clavija, órganos penacho y pelos táctiles. Detalló dos tipos de órganos clavija: tres “fuertemente puntiagudos” y seis o siete “punta redondeada”.

También informó que al cortar transversalmente los órganos clavija, la pared cuticular era excesivamente fina y que debajo de cada uno se podían observar un grupo de seis neuronas. Además, postuló la existencia de tres órganos penacho, dos en el tercer flagelómero y uno en el segundo; cada uno presentando en su base entre cinco y seis neuronas. Luego, Miller (1969) corrigió las observaciones de Wigglesworth, concluyendo que habría solo dos órganos penachos (uno en el tercer flagelómero y uno en el segundo flagelómero) en lugar de tres y agregó un cuarto tipo de sensilia: los “órganos del poro”.

En 1980, Slifer postuló a los órganos clavija, órganos del poro y órganos penacho e inclusive la parte cuticular de la antena de donde los órganos clavija emergían como quimiorreceptores. Más tarde, en un estudio exhaustivo de los órganos penacho mediante microscopía electrónica de transmisión, Steinbrecht (1994) concluyó que este tipo de sensilia sería de tipo bimodal y que evaluaría tanto estímulos hídricos como térmicos.

Desde 1994, no se publicaron nuevos estudios sobre la antena del piojo humano. Al presentar un bajo número de sensilias, los piojos son el modelo ideal para tratar de asociar tipo de sensilia con su función bajo un enfoque multidisciplinario.

El presente capítulo tiene el objetivo de contribuir al estudio morfológico del rol de la antena en la evaluación de estímulos asociados al hospedador. Para ello describimos morfológicamente las sensilias presentes en la antena de piojos adultos y comenzamos a describir el cerebro de *P. humanus capitis*. En particular, analizamos las proyecciones de neuronas sensoriales de las antenas que viajan al cerebro del piojo de la cabeza y discutimos en base a nuestros resultados morfológicos las implicancias de estas estructuras sensoriales en el reconocimiento del hospedador.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Insectos

Los insectos fueron recolectados como se detalla en el capítulo 1. Los insectos se llevaron al laboratorio donde fueron seleccionados y almacenados en solución de alcohol 70%. Se utilizaron hembras, machos y ninfas I, II y III.

3.2.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La organización externa de la antena de *P. humanus capitis* adultos y ninfas se escaneó por microscopía electrónica de barrido para describir e identificar estructuras candidatas a evaluar al hospedador. Los insectos que se

almacenaron en alcohol 70% durante 72 hs, se secaron al aire y luego se montaron en placas de aluminio con cinta de carbono. Los insectos se dispusieron sobre la cinta en diferentes posiciones para facilitar la observación de las estructuras de interés. Luego, se metalizaron con una mezcla de Oro-Paladio. Posteriormente, los individuos se examinaron con un microscopio Carl Zeiss NTS SUPRA 40 perteneciente al Centro de Microscopía Avanzadas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Las imágenes se grabaron digitalmente para su posterior análisis.

Se midieron las sensillas y los segmentos antenales utilizando las imágenes digitales que se obtuvieron del microscopio. Las medidas de las sensillas sólo se realizaron en las antenas de las hembras y se obtuvieron a partir del software de procesamiento y medición de imágenes ImageJ (Wayne Rasban National Institute of Healths, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Para cada estructura se midió el largo total y el diámetro. La terminología empleada y clasificación de los tipos de sensillas se realizó en base a la morfología externa.

3.2.3. Tinción anterógrada

3.2.3.1. Protocolo de neurobiotina

Se inmovilizaron hembras vivas sobre portaobjetos con cinta de papel doble faz dejando la cabeza expuesta y cuidando de no tapar los espiráculos distribuidos a lo largo del cuerpo con la contención de cinta. Luego, se cortaron ambas antenas de cada insecto con microtijeras (World Precision Instruments, USA) a la altura aproximada entre el pedicelo y el primer flagelómero bajo lupa. En cada antena cortada se colocó un capilar previamente estirado y afinado llenado con una solución 1 % de neurobiotina (Neurobiotin Tracer®, Vector laboratorios, Burlingame, USA) en KCl 0,25M (Figura 1). Se dejó migrar el

marcador neuronal durante 6 horas aproximadamente, lo cual se realizó en el interior de una cámara húmeda (caja de Petri con algodón mojado en agua) para evitar la deshidratación del insecto.

Luego, se disecaron los cerebros de todos los insectos tratados bajo lupa en solución buffer Millonig. La remoción de los cerebros de los piojos resultó muy dificultosa principalmente por el tamaño del insecto y la delicada estructura de los tejidos neuronales. Sin embargo, la cutícula fina y de color caramelo fue una ventaja. Con luz de aplicada de costado y con un fondo negro, se observaron las estructuras de interés directamente por transparencia. Las disecciones exitosas fueron aquellas, donde el haustelo y clipeo fueron firmemente sujetos y luego rasgados con la ayuda de una pinza Dumont nro 55. Inmediatamente, cada cerebro salió por la abertura hecha previamente, oprimiendo suavemente la cabeza. El pequeño cerebro libre se levantó de la solución buffer Millonig con la ayuda de un pelo de pincel. Además, también se cortaron cabezas enteras luego de la marcación anterógrada.

Los cerebros disecados y las cabezas enteras se incubaron en una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en Millonig durante una noche.

Al día siguiente, los cerebros y cabezas se lavaron tres veces con solución Millonig. Se los sometió a deshidrataciones crecientes, un paso de metilsalicilato u óxido de propileno, y luego a deshidrataciones decrecientes. A continuación, después de un lavado con buffer Millonig, las muestras se incubaron en solución de Oregon Green (488, Molecular Probes, OR, USA) en oscuridad durante una noche. Finalmente, luego de un último lavado con buffer,

los cerebros y cabezas de piojos fueron colocados en portas excavados y se utilizó VectaShield (Vector laboratorios, USA) como medio de montaje.

3.2.3.2. Protocolo de rodamina dextrano

Este protocolo es similar al descrito para neurobiotina (sección 3.3.3.1). Se colocó una solución de rodamina dextrano al 10 % en agua destilada en los capilares. La solución migró a través de las antenas de los insectos montados durante seis horas en oscuridad. Luego, se realizó la disección de cerebros o se cortaron las cabezas respectivamente. Ambos fueron almacenados en solución fijadora de PFA 4 % durante una noche. Al día siguiente, las muestras se lavaron en buffer Millonig y posteriormente se montaron en VectaShield en portas excavados.

Todas las muestras se analizaron en el microscopio confocal (Olympus FV300/BX61), Centro de Microscopía Argentina, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales). Las reconstrucciones 3D de los lóbulos antenales se realizaron utilizando el programa Reconstruct ®.

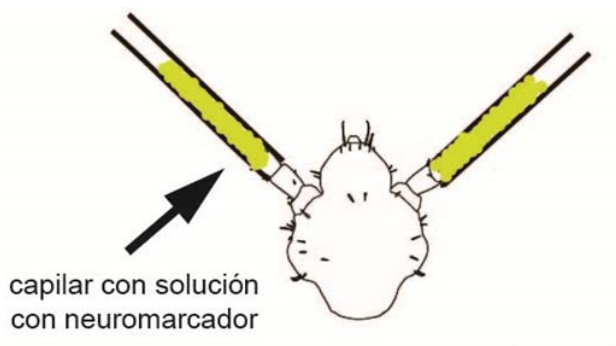


Figura 1. Método capilar para la migración del marcador neuronal.

3.3. Resultados

3.3.1. Generalidades de la antena

Las antenas de hembras, machos y ninfas presentaron en general las mismas estructuras sensoriales y el mismo número de segmentos antenales (escapo, pedicelo y un flagelo formado por tres flagelómeros) (Figura 2A). En las ninfas se observaron fusiones graduales entre los distintos segmentos (Figura 2B).

La antena de hembras de *P. humanus capitis* midieron en promedio $295,15 \pm 15,12 \mu\text{m}$. Las mismas están compuestas por un escapo, con largo promedio de $53,32 \pm 6,15$, un pedicelo de $78,20 \pm 5,54$ y un flagelo de $150,18 \pm 9,07 \mu\text{m}$. El flagelo está subdividido en tres subsegmentos o flagelómeros, llamados F1, F2 y F3 de proximal a distal (Figura 2A). Los F1 y F2 miden $50,3 \pm 5,1 \mu\text{m}$ y $41,74 \pm 3,14 \mu\text{m}$, respectivamente, y el F3 mide $58,16 \pm 4,13 \mu\text{m}$. Se identificaron cinco tipos de estructuras sensoriales a lo largo de la antena de los piojos mediante MEB: cerdas, órganos penacho, órganos del poro, sensilias basicónicas (u órganos clavija) y un poro (Figura 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9).

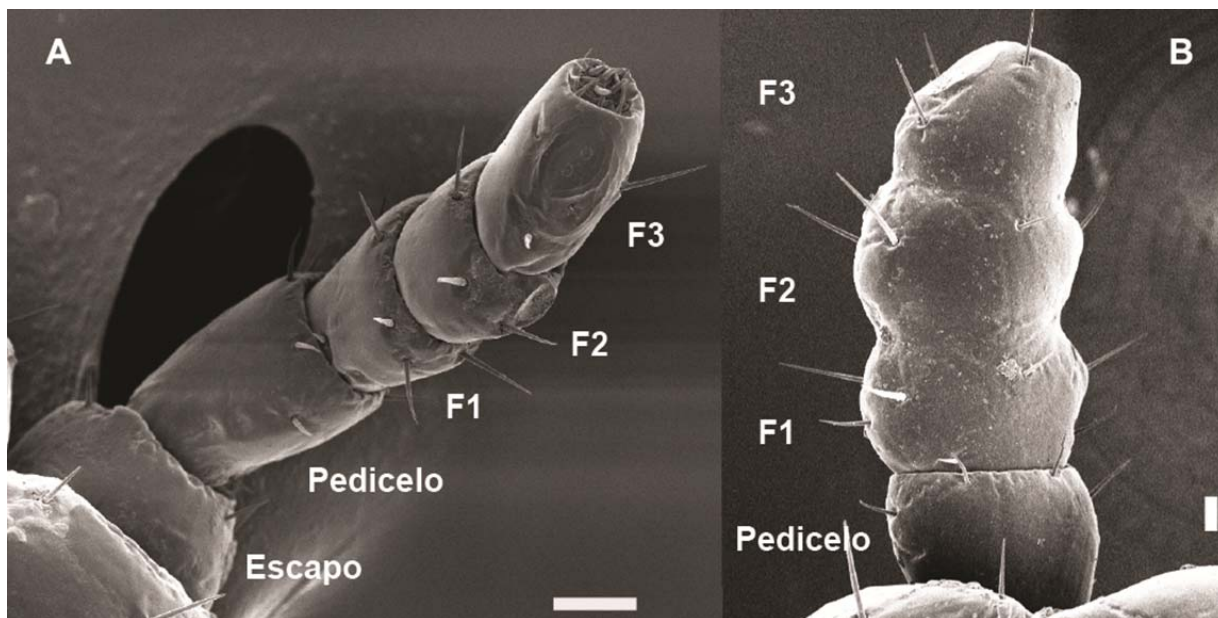


Figura 2. Imagen de una antena de hembra adulta (A) y de una ninfa III (B). Barra A= 30 μm , Barra B= 10 μm .

3.3.2. Cerdas

Las cerdas o sensilias tricoideas se encuentran en todos los segmentos de la antena (Figura 3A). Muestran un bolsillo bien desarrollado en la base afinándose hacia el extremo distal. En la superficie de la cutícula de las cerdas no se observaron poros (Figura 3B). El escapo, el pedicelo y el F1 presentan exclusivamente cerdas. Tres cerdas se identificaron en el escapo y entre 5 y 7 en el pedicelo (Figura 3A), midiendo en promedio $16,46 \pm 1,02 \mu\text{m}$ y $15,21 \pm 1,84 \mu\text{m}$ respectivamente.

Se encontraron cerdas más largas en el flagelo. F1 y F2 presentaron entre 5 y 6 cerdas de $25,56 \pm 2,24 \mu\text{m}$ y $26,98 \pm 1,67 \mu\text{m}$ respectivamente, mientras que el F3 solo presentó 3 cerdas de $22,39 \pm 2,69 \mu\text{m}$.

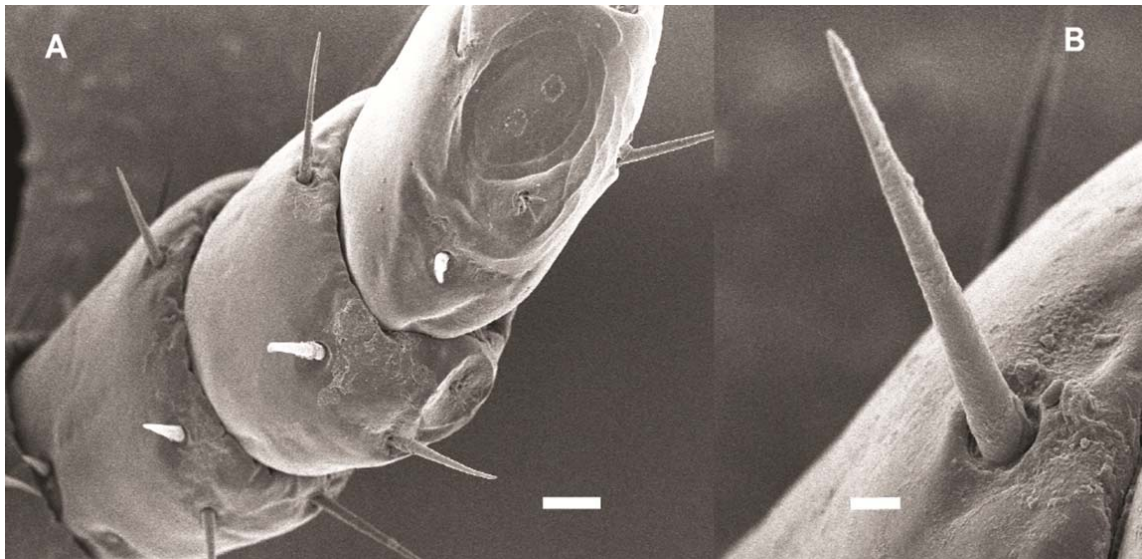


Figura 3. Disposición de las cerdas en los tres últimos flagelómeros (A) Detalle de una cerda (B). Barra A= 10 μm , Barra B= 2 μm .

3.3.3. Órganos penacho

Se identificaron dos órganos penacho localizados en la zona dorsolateral de F2 y F3 (Figura 4A). Cada órgano consiste en una cavidad profunda y circular ($3,54 \pm 0,21 \mu\text{m}$ de diámetro) de la cual emergen 6 pelos. Estos pelos tienen una longitud promedio de $3,31 \pm 0,18 \mu\text{m}$ (Figura 4B).

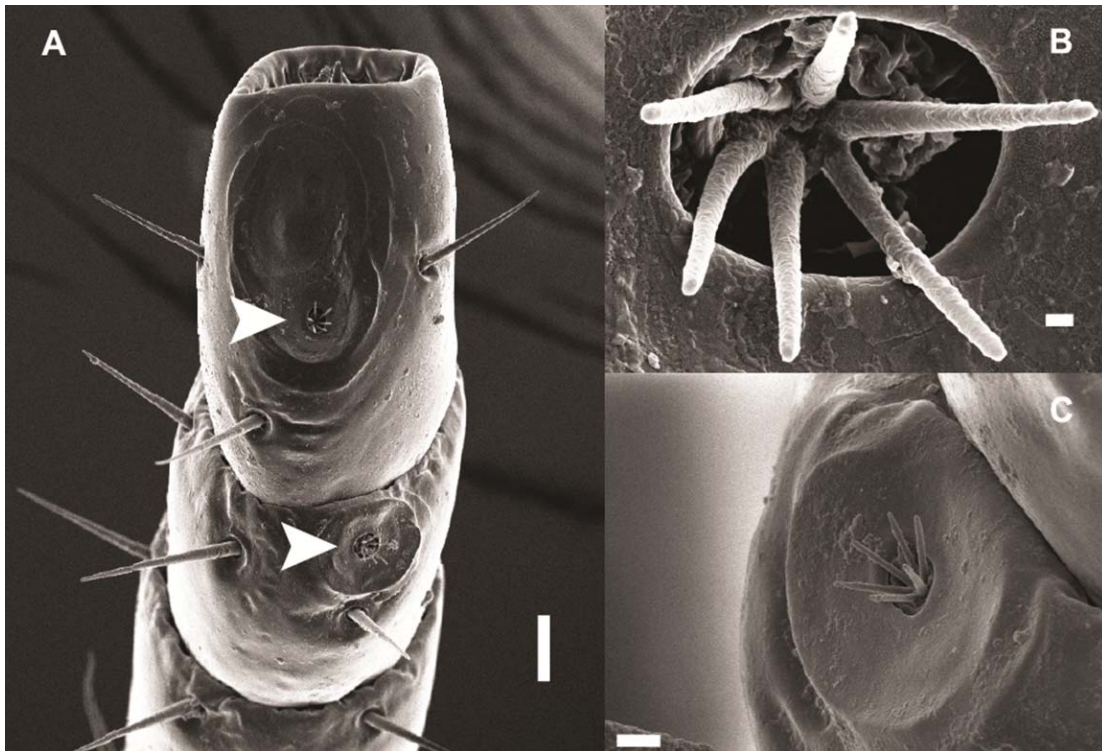


Figura 4. Detalle de los F2 y F3. Las flechas indican la posición de los órganos penacho (A). Detalle del órgano penacho presente en el F3 (B) Detalle del órgano penacho presente en el F2 (C). Barra A= 10 μ m, Barra B= 300 nm, Barra C= 2 μ m

3.3.4. Órganos del poro y el poro simple

Se encontraron dos órganos del poro centrados en una depresión oval y superficial ($29,3 \pm 2,4 \mu\text{m}$ de diámetro) en la zona dorsolateral del F3 (Figura 5A). Cada órgano exhibe una estructura con forma de sol, presentando una placa central de $0,32 \pm 0,02 \mu\text{m}$ de diámetro rodeada por 49 ± 1 surcos de $0,73 \pm 0,04 \mu\text{m}$ de longitud) (Figura 5B, C). En algunas antenas, se observó la fusión azarosa de estos surcos.

Además, se observó una estructura que denominamos poro simple ubicado en la zona dorso-medial del F3 cercano al órgano penacho y los órganos del poro (Figura 5A, D). Se observó un único poro simple cuyo diámetro fue de $0,49 \pm 0,03 \mu\text{m}$.

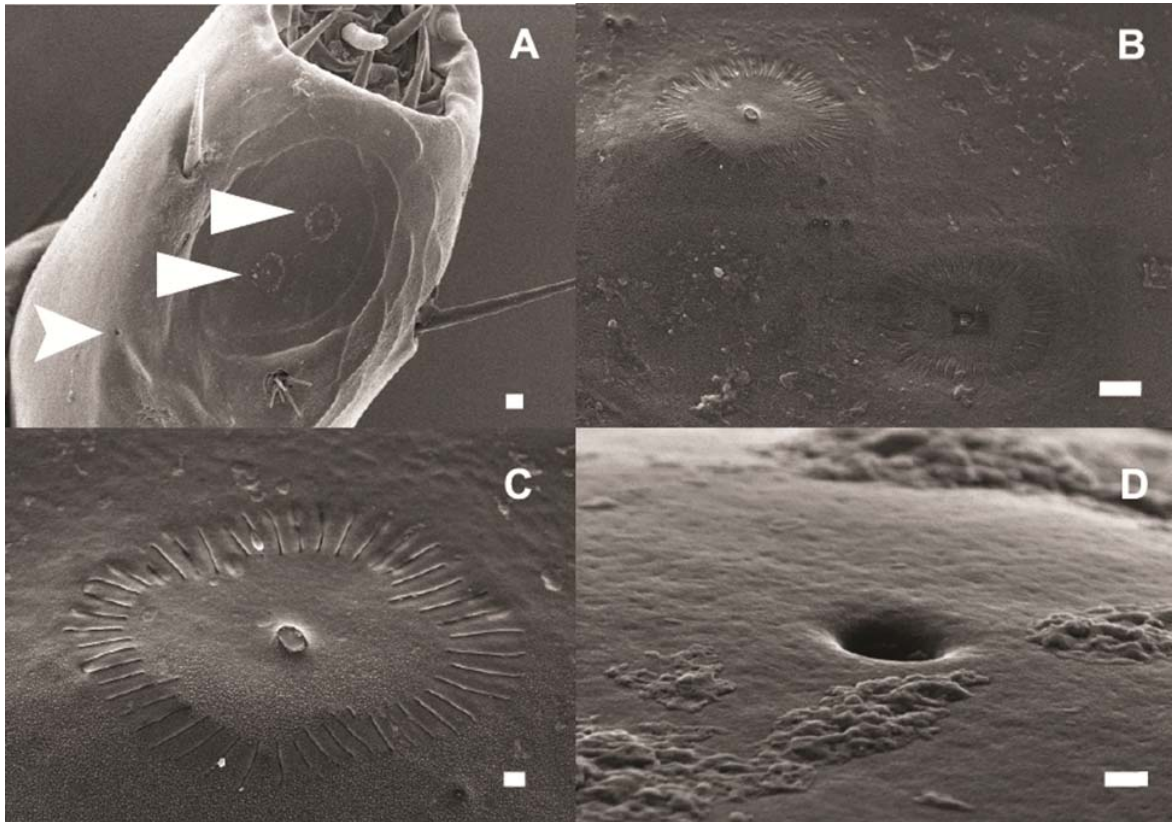


Figura 5. Detalle del F3, las flechas indican la posición de los dos órganos del poro y del poro, respectivamente (A) Detalle de un par de órganos del poro (B) Detalle de un órgano del poro donde se observan los numerosos surcos (C) Detalle del poro (D). Barra A= $2 \mu\text{m}$; Barra B= $1 \mu\text{m}$; Barra C= 200 nm ; Barra D= 200 nm .

3.3.5. Sensilias basicónicas

En el extremo distal de F3 se observaron diferentes tipos de sensilias (Figura 6). Entre ellos, se pueden identificar alrededor de diez sensilias basicónicas de

3 tipos morfológicos: “tipo dedos”, “punta fina” y “punta redondeada”. Las sensillas “tipo dedos” ($8,13 \pm 0,95 \mu\text{m}$ de longitud) se caracterizan por la presencia de numerosos “dedos” cortos en la punta de su estructura y por la presencia de poros a lo largo de su superficie. En cada antena se encontraron cuatro sensillas “tipo dedos” (Figura 7).

Las basicónicas de tipo “punta fina” ($9,25 \pm 0,03 \mu\text{m}$ de longitud) también exhiben múltiples poros distribuidos uniformemente a lo largo de la cutícula, aunque esta sensilia termina en un extremo fino y puntiagudo (Figura 8). Se encontraron cuatro sensillas de este tipo en cada antena.

Por último, se observaron dos basicónicas de tipo “punta redondeada” en el extremo distal del F3. Con una longitud promedio de $6,56 \pm 0,16 \mu\text{m}$, estas sensillas presentaron una pared uniforme y un poro único en la punta (Figura 9).

La inspección morfológica de la antena de piojos reveló que el F3 posee la mayor diversidad de sensillas.

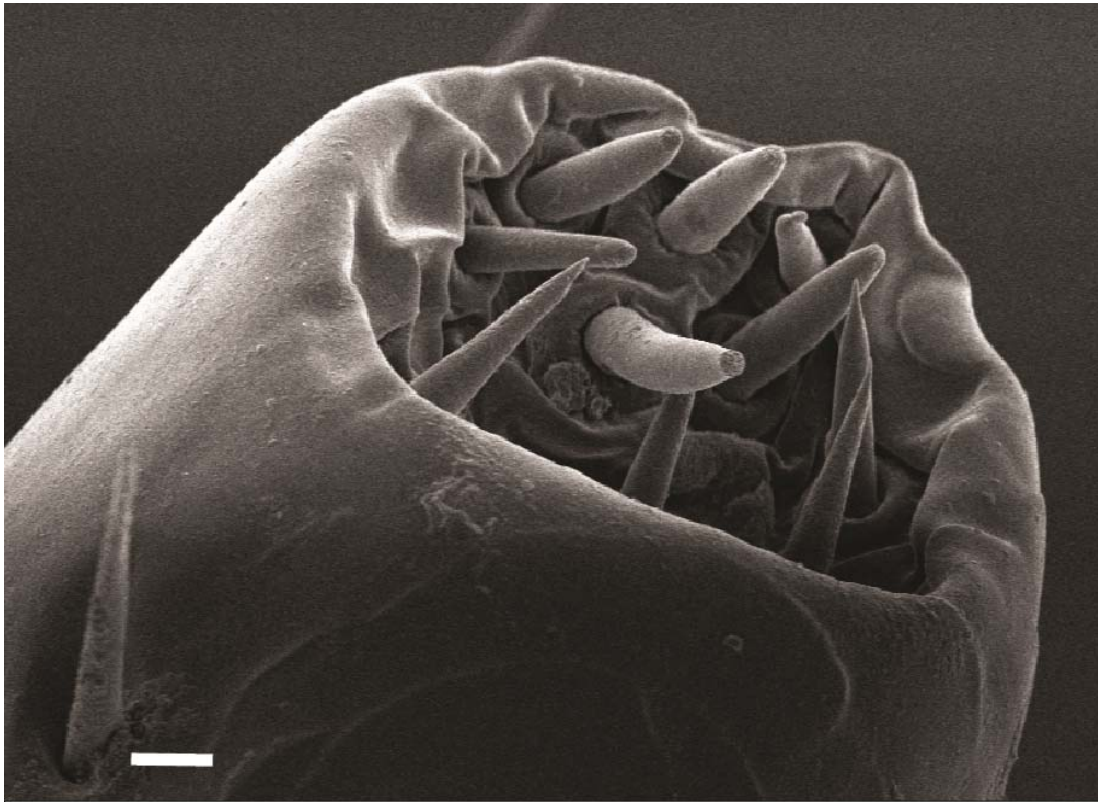


Figura 6. Detalle del extremo distal de un F3. Barra = 3 μ m.

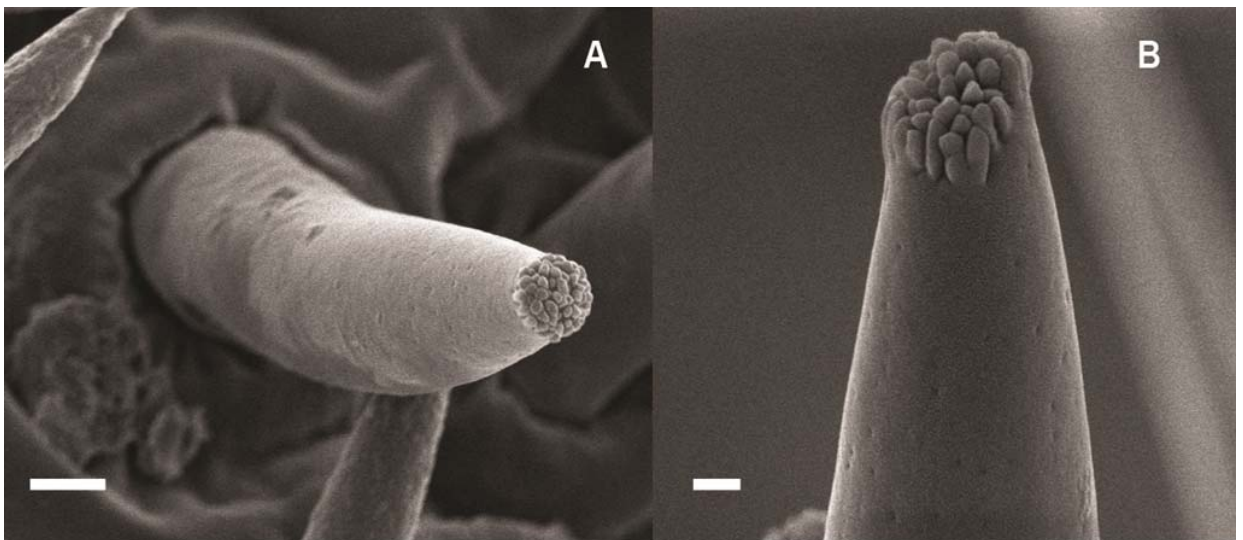


Figura 7. Imagen de una sensilia "tipo dedos" donde se ve su inserción en la cutícula (A) Detalle del arreglo terminal de la sensilia. Además se observan numerosos poros en toda su pared (B). Barra A = 1 μ m; Barra B= 300 nm.

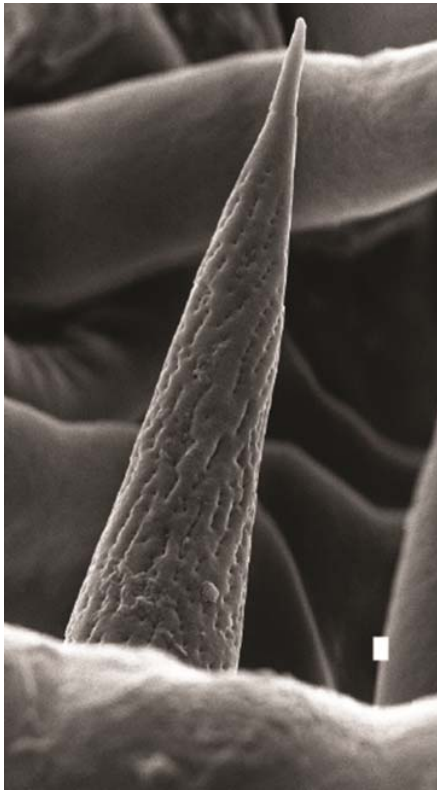


Figura 8. Imagen de una sensilia de tipo “punta fina” con numerosos poros alineados en su cutícula. Barra= 200 nm.



Figura 9. Imagen de una basicónica de tipo “punta redondeada” con un poro terminal en la zona apical. Barra= 1 μm .

3.3.6. Proyecciones neuronales de la antena al cerebro

La cutícula de la cabeza del piojo de la cabeza es transparente y las estructuras internas son visibles bajo lupa. Los 2 protocolos de tinción llevados a cabo (es decir, neurobiotina y rodamina dextrano) revelaron resultados similares. En todas las preparaciones se observó un nervio antenal con un solo tracto entrando a la cápsula de la cabeza a través de cada antena (Figura 10 B). El volumen medio del cerebro de los piojos es de $6,626 \times 10^6 \pm 1,126 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ ($246,25 \pm 11,19 \mu\text{m}$ de ancho, $185 \pm 2 \mu\text{m}$ de alto). Para estas mediciones se utilizaron 5 cerebros y la cifra del volumen se obtuvo suponiendo que la forma del cerebro se aproxima a un cilindro sin los lóbulos ópticos.

Ambos nervios antenales inervaron un neuropilo en el cerebro del piojo, correspondiente al lóbulo antenal (LA). Los LA presentan una forma de herradura, situado ventralmente cerca de los conectivos esofágicos. El LA mide en promedio $54,17 \pm 2,46 \mu\text{m}$ de ancho y $38,16 \pm 1,74 \mu\text{m}$ de alto, medidas que se obtuvieron a partir del área de proyección de las neuronas sensoriales observadas en el LA, utilizando el ancho promedio de los cerebros como referencia ($N = 4$ cerebros). Las tinciones llevadas a cabo revelaron que los LAs del piojo tienen una estructura glomerular (Figura 11A). Luego del análisis de las imágenes y a través de la reconstrucción tridimensional de los LAs, se identificaron entre 8 y 10 glomérulos en cada LA (Figura 11C, D). Para las reconstrucciones 3D se utilizaron tres individuos diferentes. En todas las muestras analizadas, la posición de los glomérulos fue aproximadamente similar (Figura 11C, D).

Por último, también se observó, aunque en una única preparación de neurobiotina, una proyección ipsilateral hacia la zona media del protocerebro (Figura 11A).

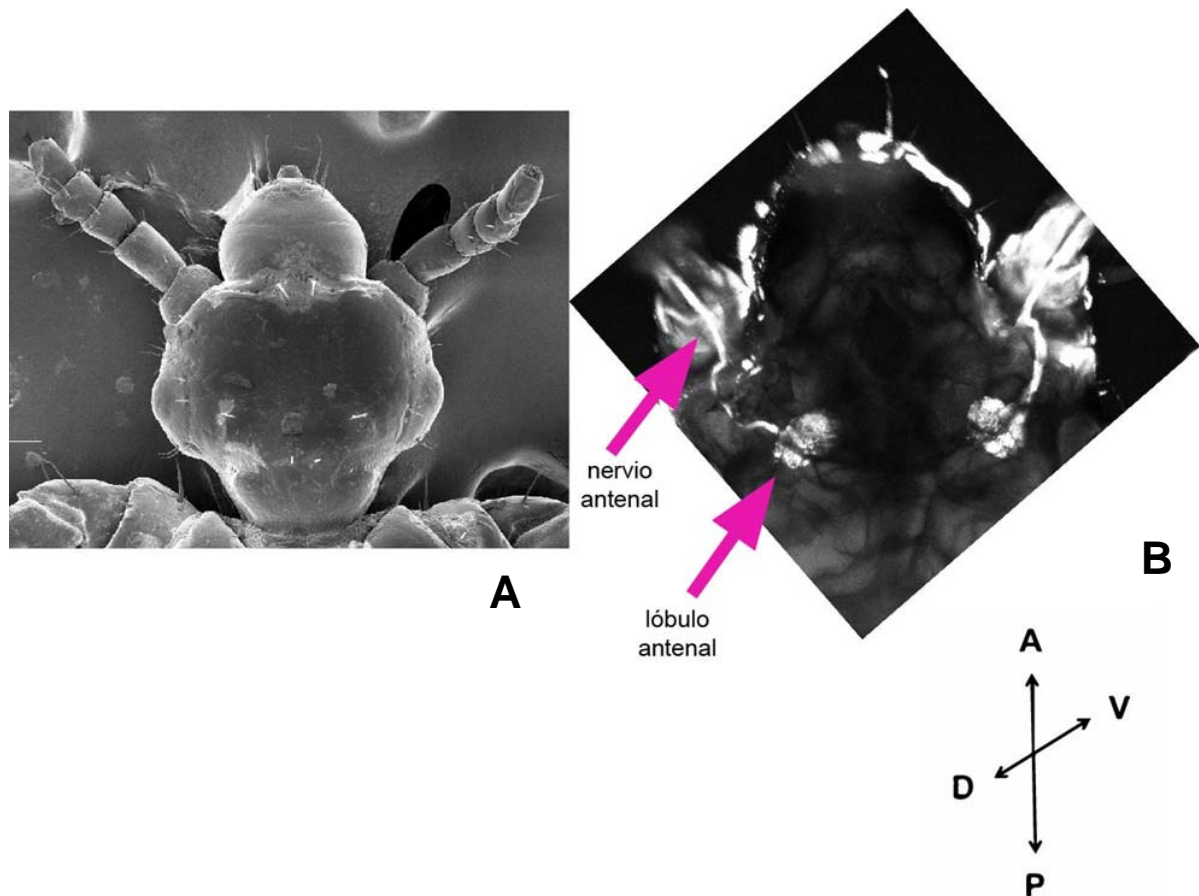


Figura 10. Imagen del MEB de una vista dorsal de la cabeza y antenas de un piojo adulto (A). Vista dorsal de un piojo tratado con rodamina donde se observa el nervio antenal llegando a un neuropilo que postulamos como el lóbulo antenal (B).

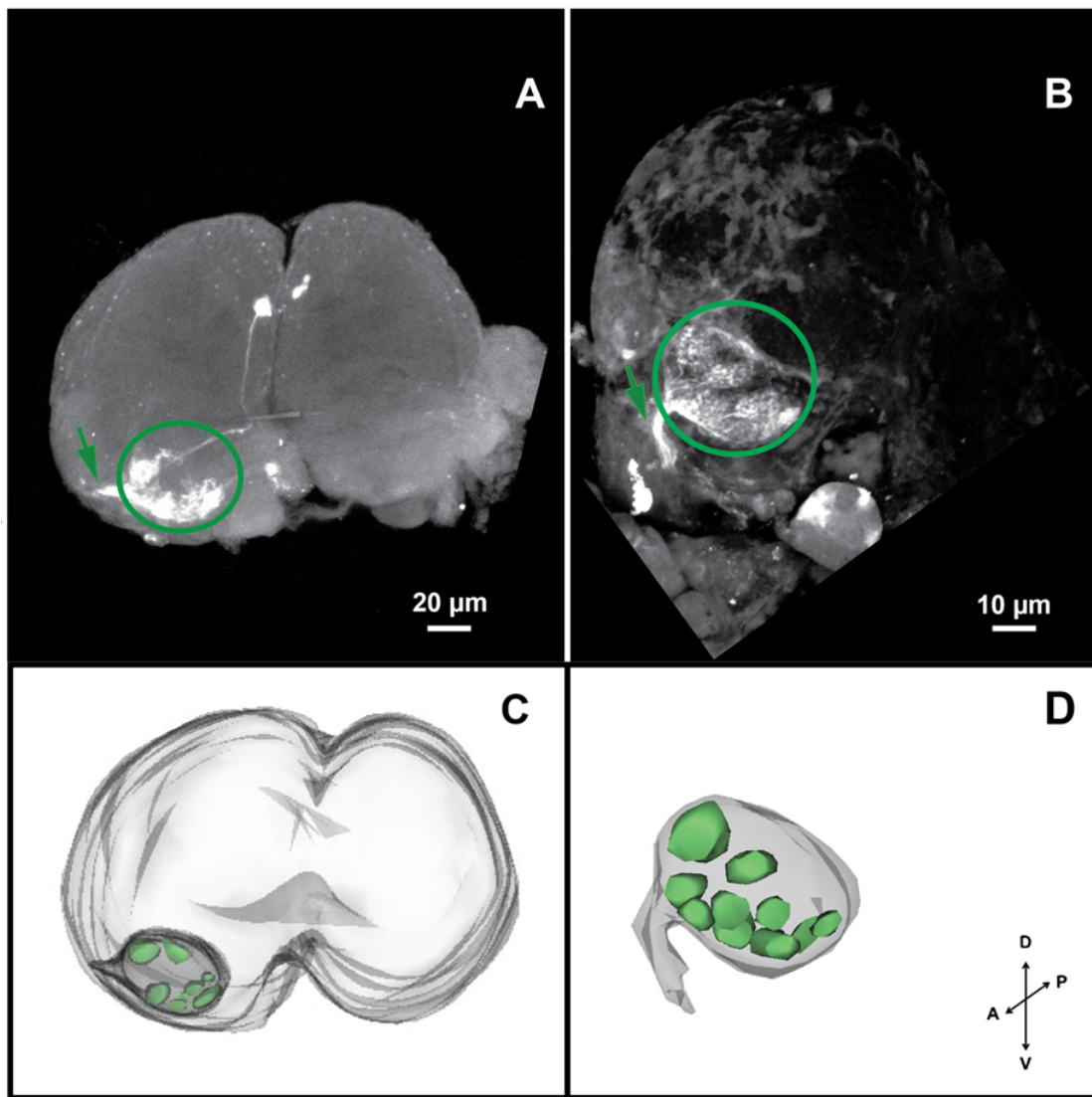


Figura 11. Vista anterior de un cerebro de piojo adulto tratado con neurobiotina donde se observa el nervio antenal (flecha) llegando al lóbulo antenal (círculo). También se observa una proyección que alcanza la zona media del protocerebro (A). Detalle de un lóbulo antenal en otro cerebro donde se observan con más detalle las estructuras glomerulares (B). Reconstrucción 3D del lóbulo antenal observado en (A) y en (B) donde se observan entre 8 y 10 glomérulos (C- D).

3.4. Discusión

Lo expuesto en este capítulo representa el primer estudio de la morfología de la antena y de las estructuras centrales involucradas en la integración de la información periférica proveniente de las antenas de los piojos de la cabeza. Como sucede con la mayoría de los animales que desarrollan estilos de vida parasitarios, en los piojos de la cabeza observamos un sistema sensorial relativamente simple. En particular, nuestros estudios morfológicos mediante MEB nos permitieron describir distintas estructuras sensoriales en la antena que podrían estar asociadas a la detección de estímulos de diferentes modalidades sensoriales: química (gustativa y olfativa) y física (mecánica, térmica e hídrica). Además, los protocolos de tinción llevados a cabo en este capítulo revelaron un par de neuropilos con pocas estructuras glomerulares que postulamos como los lóbulos antenales del cerebro del piojo de la cabeza.

Las sensilias del piojo de la cabeza descritas en este trabajo mostraron ser muy similares a las de otros miembros del orden Phthiraptera estudiados previamente (Miller, 1969; Ubelaker et al., 1973; Slifer y Sekhon, 1980; Baker y Chandrapatya, 1992). A lo largo de todos los subórdenes de Phthiraptera (es decir, Anoplura, Ischnocera, Amblycera y Rhynchophthirina) la morfología de las antenas es bastante similar y conservada, caracterizada por la concentración de sensilias en la zona distal de la antena (Baker y Chandrapatya, 1992; Arya et al., 2012). Mediante el análisis de las imágenes obtenidas del MEB, encontramos un patrón espacial similar de sensilias

antenas en machos, hembras y ninfas. Adicionalmente, las estructuras sensoriales del piojo de la cabeza serían similares a las reportadas parcialmente para los piojos del cuerpo (Wigglesworth, 1941; Slifer y Sekhon, 1980, Steinbrecht, 1994; observación personal).

De acuerdo con trabajos previos y nuestros resultados, el esquema sensorial general de la antena de los piojos de la cabeza está representado por alrededor de entre 20 y 25 cerdas, 2 órganos penacho, 2 órganos del poro, 1 poro simple, 4 basicónicas "tipo dedos", 4 basicónicas de tipo "punta fina" y 2 basicónicas de "punta redondeada".

En base a la morfología externa de las sensilias y a la literatura en otros piojos, podemos proponer funciones para cada una de ellas. Las cerdas, las cuales son finas y largas y presentan una base articulada podrían cumplir un rol como mecano- y propioceptores. Los órganos penacho podrían funcionar como termo-higroreceptores. Esta afirmación está basada en el trabajo de Steinbrecht (1994) quien realizó un estudio exhaustivo de estas estructuras en los piojos del cuerpo mediante la aplicación de técnicas de criofijación y concluyó que los órganos penachos son sensilias bimodales que detectan tanto estímulos térmicos como hídricos. Steinbrecht (1994) también describió a los órganos del poro en los piojos del cuerpo y sugirió que también éstos serían de naturaleza bimodal: termorreceptores y quimiorreceptores olfativos. En este trabajo identificamos dos de estos órganos del poro en el F3 del piojo de la cabeza. Un cuarto tipo de sensilia que sólo fue observada anteriormente en especies del género *Damalinia* (Soler Cruz y Martín Mateo, 1998) y ha sido propuesta simplemente como "poro" se describe aquí por primera vez en *P. humanus capitis*. Esta estructura podría tratarse de una sensilia de tipo

celocónica con potencial función termorreceptora, ya que coincide con otras sensilias morfológicamente similares presentes en triatominos como *Triatoma infestans* (Bernard, 1974) y *Rhodnius prolixus* (Catalá y Schofield, 1994), y la chinche de cama *Cimex lectularius* (Steinbrecht and Muller, 1976).

Wigglesworth (1941) y Slifer y Sekhon (1980) postularon que las sensilias basicónicas presentes en el extremo distal de la antena del piojo del cuerpo eran potenciales quimiorreceptores. Nuestro trabajo muestra por primera vez con gran detalle la estructura de estos pelos sensoriales. Se identificaron tres morfotipos: basicónicas “tipo dedos”, “punta fina” y “punta redondeada”. Basándonos estrictamente en la morfología de estas estructuras, dos de ellas (las basicónicas “tipo dedos” y las “punta fina”) serían sensilias olfativas, ya que su cutícula presenta poros distribuidos uniformemente. Las sorprendentes protuberancias presentes en la punta de las basicónicas “tipo dedos” podrían tratarse de una disposición espacial para aumentar la captación de olores del entorno. El tercer tipo de basicónica (basicónica “punta redondeada”) sólo presentó un poro en la punta, lo que sugiere que podría tratarse de un quimiorreceptor de contacto o gustativo.

Otra característica común en todo el orden Phthiraptera es el número relativamente bajo de sensilias presentes en las antenas. Chapman (1982) propuso que los insectos que viven en ambientes donde las dosis de estímulos relevantes son particularmente altas presentarían un número relativamente bajo de sensilias. El bajo número de receptores puede proporcionar baja sensibilidad, pero a su vez ofrece un esquema simplificado para la integración de la información en el sistema central.

Otra hipótesis que podría explicar una maquinaria sensorial acotada sería que un bajo número de sensillas representaría una adaptación para evitar la deshidratación (Kristoffersen et al., 2008) y dado que los piojos en general son propensos a morir rápidamente fuera del hospedador debido a la pérdida de agua (Nuttall, 1919; Wigglesworth, 1941; Buxton, 1946), éste podría ser el caso.

Adicionalmente, estudiamos las proyecciones antenales al cerebro del piojo de la cabeza para describir las estructuras centrales involucradas en la integración de la información periférica de la antena. Los resultados de las tinciones llevadas a cabo en los cerebros de *P. humanus capitis* revelaron un lóbulo antenal reducido en comparación con los lóbulos antenales de otros insectos (Galizia et al., 1999; Laissue et al., 1999; Zube et al., 2008; Couton et al., 2009). No obstante, tras las reconstrucciones 3D de tres lóbulos antenales, identificamos entre 8 y 10 marcas fluorescentes más intensas o glomérulos que le dan una estructura glomerular a los LAs. Escasa es la información acerca de la ecología sensorial del piojo de la cabeza, por ejemplo, no sabemos aún cuáles son los olores relevantes en la vida de un piojo. Aunque podríamos especular que los olores de mayor relevancia serían aquellos emitidos por el hospedador, el cual representa para un piojo su alimento, refugio, reproducción y sitio de oviposición. Los hábitos alimentarios pueden ser otra razón para el número reducido de glomérulos en los lóbulos antenales (Kollman et al., 2016). Los piojos de la cabeza son especialistas extremos, alimentándose solo de sangre humana a lo largo de su ciclo de vida. Contrariamente, otros insectos hematófagos pueden tener un abanico más amplio de hospedadores

potenciales, hecho que se traduce en la necesidad de un sistema sensorial más complejo que les permita percibir más olores. Teniendo en cuenta los múltiples estudios de lóbulos antenales en insectos de diferentes órdenes, es más probable que los menos desarrollados sean el resultado de una adaptación convergente a un estilo de vida similar y requerimientos ecológicos y etológicos específicos en lugar de tratarse de una característica intrínseca de un taxon dado (Kollman et al., 2016).

La presencia de glomérulos pocos definidos y/o escasos no sería un indicador directo de la ausencia o pobre sentido del olfato: los piojos de la cabeza responden en forma conspicua a olores humanos (Wigglesworth, 1941; Ortega Insaurralde et al., 2017; Galassi et al., 2018) y a repelentes (Tolozza et al., 2006; Pelletier et al., 2015; Peock y Maunder, 1993). De manera similar, el piojo de la paloma *Columbicola columbae* (Crespo y Vickers, 2012), libélula de vientre plano *Libellula depressa* (Rebora et al., 2013) y el psílido de la zanahoria *Tryoza apicalis* (Kristoffersen et al., 2008) responden significativamente a olores relevantes en su biología presentando lóbulos antenales simples y/o aglomerulares.

Lo expuesto en este capítulo representa el primer paso en el estudio funcional de las estructuras sensoriales descriptas en la antena para ganar conocimiento en la biología sensorial involucrada en la interacción hospedador-piojo de la cabeza.

Capítulo 4

EL ROL DE LA ANTENA DE *PEDICULUS HUMANUS* *CAPITIS*: UNA APROXIMACIÓN COMPORTAMENTAL

4.1. Introducción

La exploración de la base sensorial de ciertos comportamientos (como la búsqueda de alimento, detección de una clave intraespecífica, de refugio, etc.) se puede abordar mediante distintos enfoques, entre ellos la remoción mecánica de estructuras candidatas y la observación *a posteriori* de cómo se modifica la respuesta de interés. Por ejemplo, Roth (1951) demostró que la amputación de ambos flagelos de las antenas de hembras del mosquito *Aedes aegypti* suprimía el comportamiento de búsqueda de sangre humana. Por otro lado, mosquitos con tarsos removidos no respondieron a superficies húmedas de la misma manera que mosquitos intactos (Bar-Zeev, 1960). En otro modelo animal, la remoción de las antenas de la chinche de cama *Cimex lectularius* redujo significativamente la respuesta de agregación a papeles previamente manchados por otros congéneres (Olson et al., 2009).

Wigglesworth (1941) en su obra pionera "La Fisiología Sensorial del Piojo Humano" detalló, a través de ensayos comportamentales, cómo los piojos respondían a diversos estímulos tales como olores, calor y fuentes húmedas. En sus diseños experimentales, él se preguntó, entre otras cosas, si al anular una sensilia específica de la antena se suprimía la respuesta a la que estaba ajustada. Por ejemplo, observó que los piojos del cuerpo eran repelidos por ciertos olores y evitaban las regiones húmedas en arenas experimentales de dos opciones. Sin embargo, cuando cubría las sensilias de la punta de la antena con pintura de celulosa, el comportamiento de evitación a un olor repelente cesaba y cuando hacía lo mismo con los órganos penacho, la

respuesta a la humedad también se suprimía. Más tarde, Mumcuoglu et al. (1986) y Peock y Maunder (1993) también observaron que el comportamiento de agregación a las heces en los piojos del cuerpo y la repelencia al piperonal en piojos de la cabeza respectivamente, desaparecían después de tratar a los insectos con antenectomías parciales.

Siguiendo el esquema experimental de estos autores, primero evaluamos la respuesta comportamental de piojos adultos a estímulos de distinta modalidad: químico, hídrico y térmico. Luego, nos preguntamos si la antena del piojo es el órgano sensorial que media la respuesta comportamental a distintas modalidades de estímulo. Y más específicamente nos preguntamos cuales serían las sensilias candidatas presentes en la antena a evaluar cada tipo de estímulo. Para acercarnos a las respuestas de estas dos preguntas, se estudió el efecto de cortar los flagelómeros de la antena en la respuesta comportamental de piojos adultos en presencia de estímulos químicos, hídricos y térmicos.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Insectos

Los piojos se recolectaron y almacenaron como se describe en el Capítulo 1.

Se utilizaron hembras para todos los ensayos. El número de réplicas fue de 15 para cada tratamiento.

4.2.2. Dispositivo experimental

La arena se describió en el Capítulo 2. Las réplicas de cada serie experimental se llevaron a cabo cambiando la posición del estímulo entre el lado izquierdo o

derecho para evitar heterogeneidad espacial donde no se deseó intencionalmente.

Un individuo se liberó en el medio de la arena y su comportamiento se registró durante 5 minutos como se describió en el Capítulo 2. Se registró el tiempo que un piojo pasó en la zona del estímulo. Todos los ensayos se desarrollaron bajo condiciones de luz, temperatura y humedad controladas.

4.2.3. Ablación antenal

La cirugía de los flagelómeros antenales se realizó con un par de micro-tijeras (World Precision Instruments) en piojos inmovilizados con plastilina bajo lupa. Los tratamientos aplicados a cada individuo fueron los siguientes (detallados en la Figura 1):

- **INT:** Ambas antenas intactas
- **F3-:** Ambas antenas con los flagelómeros 3 removidos
- **F2F3-:** Ambas antenas con los flagelómeros 3 y 2 removidos
- **1ANT:** Una antena intacta y la otra sin los flagelómeros 3 y 2

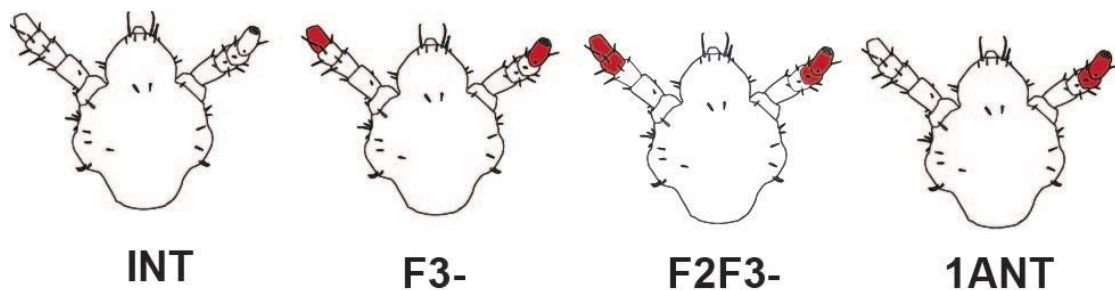


Figura 1. Esquema de los distintos tratamientos aplicados a cada grupo de piojos.

Estudios previos a los que se detallan a continuación se realizaron para analizar el efecto de la cirugía en piojos controles. Los resultados se detallan en el Anexo de este capítulo.

4.2.4. Preparación de los estímulos químicos provenientes del hospedador

Se colectaron muestras de cuero cabelludo de un voluntario como se describió en el Capítulo 2 (Mat y Met 2.2.2). Un papel de filtro con los estímulos químicos se colocó en una zona de la arena (zona estímulo), mientras que en el lado contrario se dispuso un papel de filtro limpio (zona control). Cada papel fue reemplazado en cada ensayo. La temperatura de la arena para este experimento se mantuvo a 30°C.

4.2.5. Preparación del estímulo hídrico

Se agregaron 100 microlitros de agua corriente en una mitad de la arena, humedeciendo el papel de filtro que sirvió como sustrato. Para esto se usó una micropipeta con la que se distribuyó el agua homogéneamente. De esta manera, la zona del estímulo de la arena permaneció húmeda, mientras que la otra zona se mantuvo seca. Con el objetivo de minimizar la evaporación del agua en la zona del estímulo, los experimentos se iniciaron inmediatamente después de distribuir el agua. Los ensayos se llevaron a cabo a una temperatura ambiental de 22 °C.

4.2.6. Preparación del estímulo térmico

La heterogeneidad térmica se generó en la arena mediante una placa termostática programada a 32 ± 2 ° C que se dispuso debajo de la zona del estímulo de la arena. El lado control se mantuvo a una temperatura de 22 ± 2 °

C. La temperatura en ambas zonas de la arena se midió antes y después de cada ensayo.

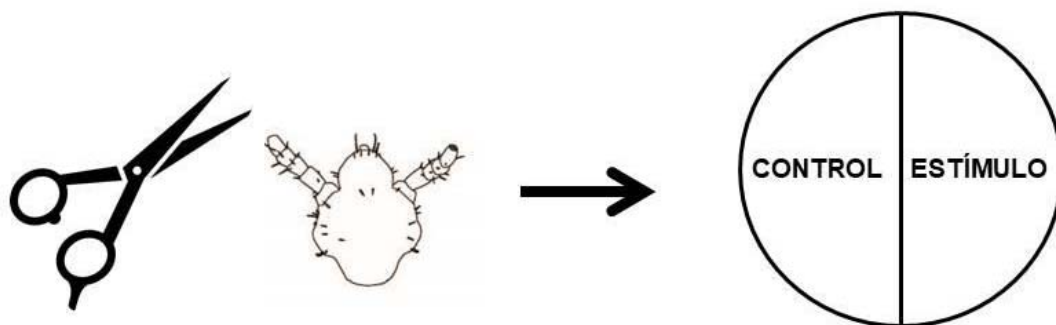


Figura 2. Esquema del ensayo comportamental.

4.2.7. Análisis estadístico

El tiempo de permanencia en la zona del estímulo se cuantificó para cada insecto como una medida de preferencia. También se registró, el tiempo total de locomoción para cada individuo, como una medida de la activación provocada por el estímulo.

Las diferencias estadísticas entre los grupos experimentales (es decir, *INT*, *F3*-, *F2F3*- y *1ANT*) se evaluaron por medio de ANOVAs de un factor seguidos por comparaciones *a posteriori*, después de verificar la homocedasticidad y la normalidad de los datos. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico R (v.3.3.1) (R Core Team 2016).

4.3. Resultados

4.3.1. Función de la antena en la respuesta a estímulos químicos provenientes del hospedador

Los insectos con ambas antenas intactas (*INT*) o con una sola antena intacta (*1ANT*) permanecieron significativamente la mayor parte del tiempo en la zona con el estímulo químico (compuestos del cuero cabelludo) con respecto a los grupos antenectomizados (*F3-* y *F2F3-*) (Figura 3 A, ANOVA de 1 factor, $F = 15,76$, $gl = 3$, $p = 1,74e^{-07}$, comparaciones de Tukey HSD: *INT* vs *F3-*, $p < 0,001$; *INT* vs *F2F3-*, $p < 0,01$; *1ANT* vs *F3-*, $p < 0,001$; *1ANT* vs *F2F3-*, $p = 0,02$). La ausencia de flagelómero 3 (*F3-*) fue suficiente para que los insectos pierdan la preferencia por la zona del estímulo. Además, los piojos *INT* mostraron un nivel de actividad significativamente menor que los otros grupos (Figura 3B, ANOVA de 1 factor, $F = 16,7$, $gl = 3$, $p < 0,001$; comparaciones de Tukey HSD: *INT* vs *1ANT*, $p = 0,0055$; *INT* vs *F3-*, $p < 0,001$; *INT* vs *F2F3-*, $p < 0,01$). Los insectos *INT* una vez que llegaron al lado donde se encontraba el estímulo de cuero cabelludo disminuyeron su nivel de actividad. Sin embargo, cuando se ablacionaron ambos *F3-* de las dos antenas o los flagelomeros *F2F3-* también de ambas antenas, tanto la preferencia como el efecto arrestante por la zona que presentaba el estímulo de cuero cabelludo desaparecieron. Resultados intermedios se obtuvieron en los piojos del tratamiento *1ANT*, donde se observó una preferencia similar a los piojos *INT* por permanecer en la zona con estímulo, pero no se arrestaron significativamente en dicha zona como si lo hicieron los insectos *INT*.

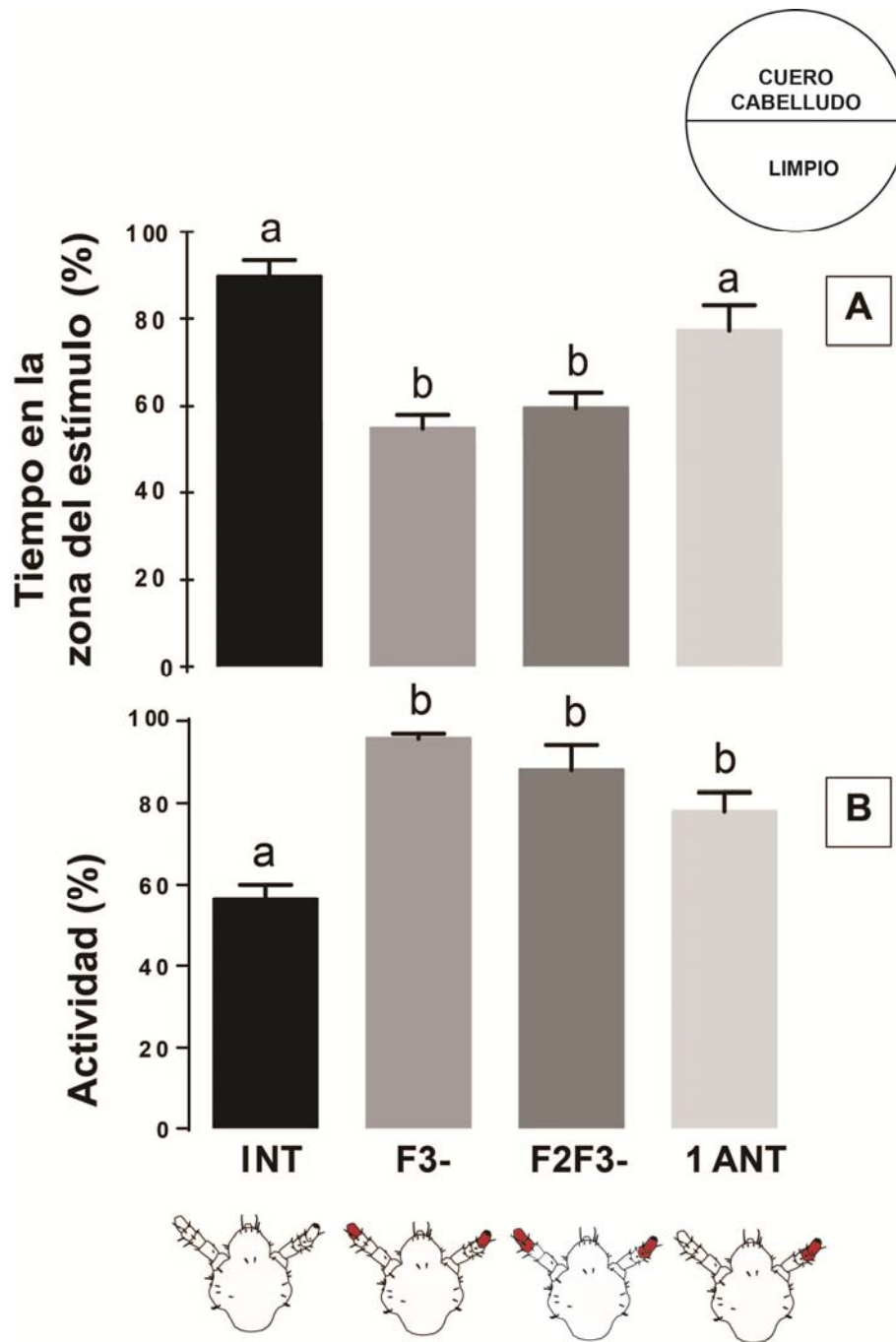


Figura 3. Respuesta comportamental de los piojos a estímulos químicos presentes en el cuero cabelludo. A) Tiempo de permanencia en la zona del estímulo en insectos intactos y antenectomizados, expresado como porcentaje del tiempo total del ensayo. B) Actividad de piojos intactos y antenectomizados, medida como el porcentaje del tiempo que los insectos caminaron sobre la arena con independencia de la región en que prefirieron permanecer. Diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de 1 factor, $p < 0,05$).

4.3.2. Función de la antena en la respuesta al estímulo hídrico

Los piojos con antenas intactas (INT) permanecieron significativamente menos tiempo en la zona húmeda de la arena que los insectos simétricamente antenectomizados (*F3-* y *F2F3-*) (Figura 4 A, ANOVA de 1 factor, $F = 5,047$, $gl = 3$, $p = 0,00364$, comparaciones de Tukey HSD: *INT* vs *F3-*, $p = 0,032$; *INT* vs *F2F3-*, $p = 0,005$). Los insectos con una sola antena (*1ANT*) presentaron un comportamiento de evitación parcial de la zona húmeda, con valores de preferencia intermedios entre los individuos INT y los ablacionados (comparación Tukey HSD, *1ANT* vs *INT*, $p = 0,644$; *1ANT* vs *F3-*, $p = 0,356$; *1ANT* vs *F2F3-*, $p = 0,104$). Por otro lado, los niveles de actividad de los piojos de diferentes grupos experimentales no difirieron significativamente (Figura 4 B, ANOVA de 1 factor, $F = 1,451$, $gl = 3$, $p = 0,238$), lo que sugiere que la humedad genera una aversión espacial pero no una modulación cinética. Además, estos resultados confirman que la ablación de segmentos antenales no tuvo efectos sobre la locomoción de los piojos. De forma similar a la serie anterior, la ablación de *F3* y / o *F2* y *F3* causó una pérdida significativa de la respuesta aversiva a la zona húmeda de la arena, lo que sugiere que *F3* probablemente contiene las estructuras sensoriales implicadas en la detección de la humedad.

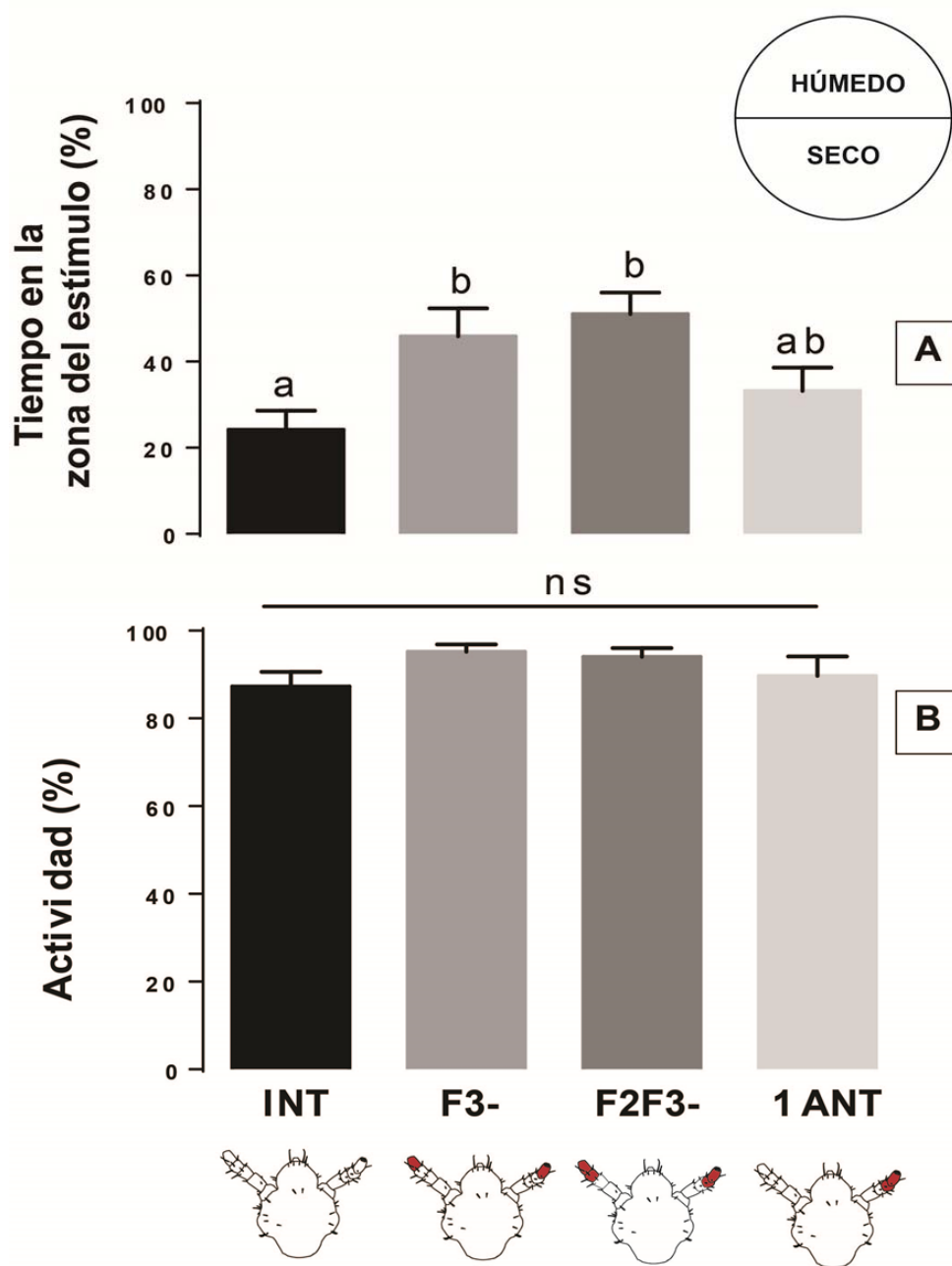


Figura 4. Respuesta comportamental de los piojos a un estímulo hídrico. A) Respuesta de preferencia de piojos intactos y antenectomizados en una arena de dos opciones, medida como el porcentaje del tiempo pasado en el lado del estímulo. B) Niveles de actividad de piojos intactos y antenectomizados, medido como el porcentaje del tiempo que los insectos caminaron sobre la arena. Diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de 1 factor, $p < 0,05$).

4.3.3. Función de la antena en la respuesta al estímulo térmico

Los piojos con antenas intactas (INT) prefirieron permanecer significativamente más tiempo en la zona a $32 \pm 2^\circ \text{C}$ en comparación con los insectos antenectomizados (es decir, *F3-*, *F2F3-* y *1ANT*; Figura 5 A, ANOVA de 1 factor, $F = 9,819$, $gl = 3$, $p < 0,001$, comparaciones de Tukey HSD: *INT* vs *1ANT*, $p = 0,029$; *INT* vs *F3-*, $p < 0,001$; *INT* frente a *F2F3-*, $p < 0,001$). La ausencia de F3 en los piojos causó una pérdida de preferencia por el lado más cálido de la arena. Sin embargo, esta preferencia solo se observó si ambas antenas estaban intactas. No se observaron diferencias significativas entre los niveles de actividad de los diferentes grupos de insectos (ANOVA de 1 factor, $F = 2,384$, $gl = 3$, $p = 0,075$, Figura 5 B), lo que sugiere una vez más que la cirugía no afectó la locomoción de los insectos. Estos resultados sugieren que los termorreceptores presentes en el F3 podrían ser responsables de la preferencia térmica de los piojos y que ambas antenas son necesarias para la detección del calor.

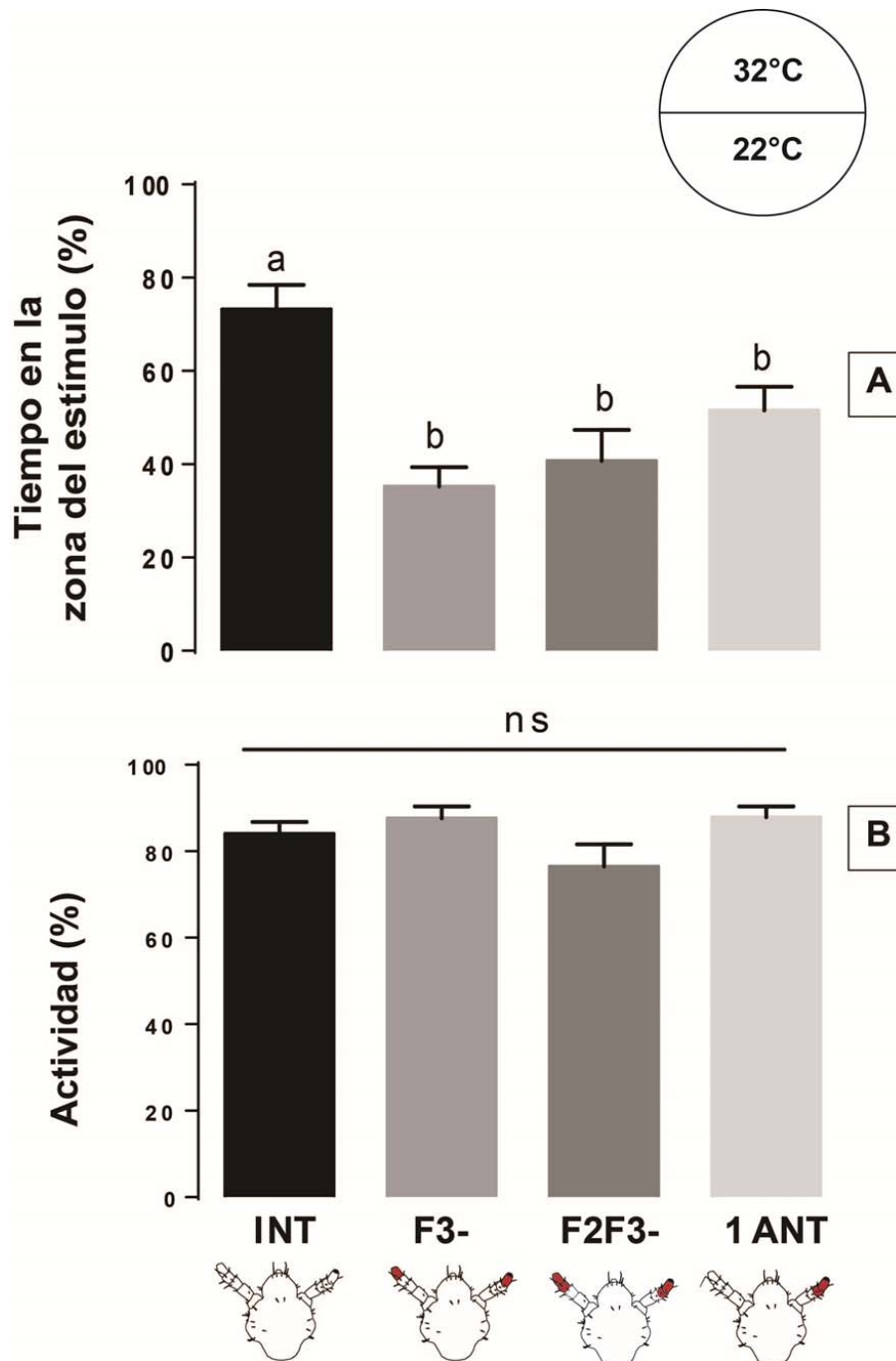


Figura 5. Respuestas comportamentales de piojos adultos a un estímulo térmico. A) Respuesta de preferencia de piojos intactos y antenectomizados en una arena de dos opciones, medida como el porcentaje del tiempo pasado en el lado del estímulo. B) Los niveles de actividad de los piojos intactos y antenectomizados, medidos como el porcentaje del tiempo que los insectos caminaron sobre la arena. Diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA de 1 factor, $p < 0,05$).

4.4. Discusión

Este trabajo representa el primer estudio funcional de la antena del piojo de la cabeza en la evaluación de estímulos químicos y físicos asociados al hospedador. Los resultados demostraron que la cirugía antenal no afectó la locomoción del insecto en nuestro diseño experimental (ver Anexo), lo que permitió evaluar como la antenectomía parcial afectaba la respuesta comportamental a estímulos de distintas modalidades. En líneas generales, la respuesta a los tres estímulos (químico, hídrico y térmico) dependió de la presencia del flagelómero 3, el segmento más distal y con más diversidad de estructuras sensoriales de la antena del piojo.

En el capítulo 2 se describió el efecto de compuestos presentes en el cuero cabelludo humano en la respuesta comportamental de piojos de la cabeza adultos en una arena de dos opciones, demostrando un efecto arrestante de dichos estímulos sobre la actividad locomotora de los piojos. Además, Galassi et al. (2018) demostró que los piojos presentan una respuesta orientada a los olores del hospedador en un olfatómetro de tubo. Los piojos con antenas intactas prefirieron las zonas con estímulos del cuero cabelludo humano, permaneciendo más tiempo que en las zonas sin estímulo (papel limpio). La eliminación del flagelómero 3 (*F3*-) de ambas antenas abolió esta preferencia, lo que sugiere que las sensilias presentes en este segmento están implicadas en dicha detección química. Hablamos de detección química, porque la muestra de cuero cabelludo puede contener no solo claves químicas volátiles u olores sino también químicos no volátiles. El piojo, durante el ensayo al

desplazarse libremente en la arena, podría detectar olores emanados de la muestra o podría contactar con sus antenas el papel cargado con el estímulo. En el primer caso, detectaría los olores emitidos por el papel a través de quimiorreceptores olfativos, en el segundo caso por quimiorreceptores de contacto o gustativos. El F3 presenta sensilias multiporosas con probable función olfativa, por un lado las basicónicas, que incluyen dos morfotipos, la sensilia “tipo dedo” y la sensilia “punta fina” y por otro lado los órganos del poro. Por lo tanto, las neuronas receptoras olfativas alojadas en estas sensilias podrían estar adaptadas a detectar olores provenientes del cuero cabelludo, entre otros. Además, en F3 se puede encontrar la sensilia basicónica uniporosa de punta redonda, que pudiera estar involucrada en la detección de moléculas no volátiles también presentes en las muestras de cuero cabelludo humano. Por lo tanto, una o ambas modalidades quimiosensoriales, olfato y/o gusto, podrían guiar el comportamiento de los piojos en nuestra configuración experimental.

Aunque los insectos con una sola antena intacta prefirieron la zona con el estímulo de cuero cabelludo, el arrestamiento en los niveles de actividad solo ocurrió cuando las dos antenas estaban intactas. Posiblemente una entrada antenal reducida, debido a la escisión de F2 y F3 de una de las antenas, no sería suficiente para desencadenar un arrestamiento significativo en los insectos. Lo cual permite especular que ambos comportamientos (i.e. preferencia y actividad) resultan de la integración de la información por mecanismos diferentes con umbrales de sensibilidad diferentes.

Los piojos con antenas intactas mostraron aversión a superficies húmedas. Sin embargo, la eliminación de F3 diluyó este comportamiento de manera

significativa. El equilibrio hídrico es una cuestión de importancia entre los insectos y, de hecho, algunos insectos terrestres son propensos a conservar y captar agua del medio ambiente bajo diferentes adaptaciones (Hadley 1994). Los piojos en general sufren desecación cuando están fuera de sus hospedadores, sobreviviendo aproximadamente 18 horas fuera de él. Cuando los piojos están sobre un hospedador, se alimentan varias veces al día. Como resultado, experimentan una gran ingesta de agua en cada toma de sangre. La elevada cantidad de agua en la sangre puede a su vez tener en los insectos consecuencias negativas, que deben ser resueltas. Algunos insectos hematófagos lo hacen produciendo y excretando una abundante orina mientras se alimentan (Wigglesworth, 1931), mientras que el piojo produce excretas secas pero pierde el agua de la ingesta a través del sistema de tráqueas del sistema respiratorio (Heukelbach, 2010). En consecuencia, si un piojo de la cabeza ha parasitado a un hospedador, el agua no sería un recurso limitante. En general, la humedad excesiva en el ambiente facilita la proliferación de hongos, a veces con efectos nocivos para los insectos. Por lo tanto, diferentes especies desarrollaron distintos límites de tolerancia para ambientes húmedos, de acuerdo con su fisiología y adaptaciones al hábitat (Guarneri et al., 2002; Rowley y Hanson, 2007). En los piojos, nuestros resultados muestran que las sensillas implicadas en la detección de la humedad se encuentran en F3. Previamente, se han propuesto a los órganos penacho como los responsables de la detección de la humedad en los piojos del cuerpo (Steinbrecht, 1994).

Finalmente, solo los piojos con ambas antenas intactas optaron por pasar más tiempo en la zona más cálida de la arena. El calor es una de las señales más relevantes utilizadas por los insectos hematófagos para encontrar a sus

hospedadores de sangre caliente (Lazzari, 2009). En el caso del piojo de la cabeza, el calor *a priori* no funcionaría como clave para la búsqueda del hospedador ya que estos insectos no hacen una búsqueda activa. Sin embargo, el calor podría ser relevante para detectar un hospedador que incidentalmente se acerca al insecto, en el movimiento del piojo dentro de la cabeza del hospedador de los cabellos al cuero cabelludo y también para detectar cambios en la temperatura de la piel del hospedador, como por ejemplo, cuando éste último tiene fiebre o cuando muere (Nuttall, 1919). Los resultados de este trabajo muestran que la respuesta al estímulo térmico depende exclusivamente de la entrada bilateral de ambas antenas, ya que la preferencia por el estímulo térmico desapareció en los insectos con solo 1 antena (1ANT). Esta respuesta también se desvaneció cuando el F3 y ambos F2 y F3 fueron eliminados. Las sensilias candidatas para evaluar la información térmica pueden ser los órganos penacho, los órganos del poro y el poro simple, los tres presentes en el F3.

Este capítulo proporciona nueva información sobre la fisiología sensorial de los piojos de la cabeza, incluidas las estructuras involucradas en la detección y el procesamiento de estímulos, así como el comportamiento mostrado en respuesta a estímulos asociados al hospedador. En conjunto, estos resultados no solo revelan la relevancia de las estructuras quimio- y termohigroreceptoras implicadas en la identificación de estímulos asociados al hospedador en la antena de los piojos, sino que también revelan la importancia del F3 en esta tarea.

Los estudios futuros deberían centrarse en la búsqueda de sensilias adicionales en otras partes de su cuerpo, como las patas y las piezas bucales y

en la verificación de la función de cada tipo de estructura sensorial mediante registros electrofisiológicos.

4.5. Anexo

Efecto de la ablación antenal en la actividad locomotora de piojos adultos en las arenas controles

Con el objetivo de estudiar si la cirugía antenal tiene un efecto en la actividad locomotora del insecto, realizamos mediciones de velocidad y tiempo de permanencia en las arenas de doble elección controles de cada serie experimental del Capítulo 4.

Para determinar si la eliminación de los flagelómeros afectaba la locomoción en las diferentes arenas, la velocidad (cm / s) y el porcentaje de tiempo transcurrido en cada zona de la arena (% s) se registraron utilizando el software de comportamiento Ethovision XT 10 (Noldus®). Ambas variables se registraron en la arena control de la arena de estímulo químico (papeles limpios en ambas zonas, arena a 30 ° C). Realizamos la misma comparación para el control de la arena de estímulo hídrico (ambas zonas secas, arena a 22 ° C) y la arena de control de estímulo térmico (ambas zonas de la arena a 20 ° C después de que cada insecto fue alimentado).

Cortes a diferentes niveles de la antena fueron llevados a cabo. Los tratamientos aplicados a cada piojo fueron los siguientes (detallados en la Figura 1):

- INT: Ambas antenas intactas
- F3-: Ambas antenas con los flagelómeros 3 removidos
- F2F3-: Ambas antenas con los flagelómeros 3 y 2 removidos

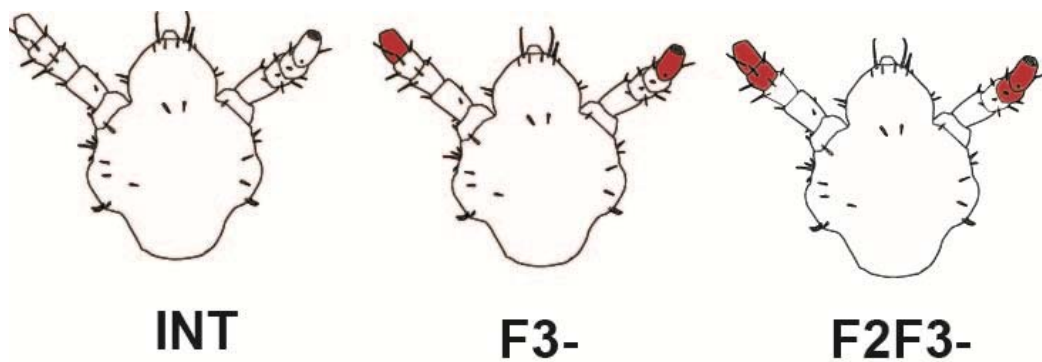


Figura 1. Esquema de los tratamientos aplicados en piojos de la cabeza adultos para evaluar el efecto de la cirugía antenal.

Resultados

En las tres series experimentales, la cirugía antenal no afectó la dispersión espacial de los piojos en la arena, distribuyéndose en promedio la mitad del tiempo en cada zona de la arena (ANOVA 1 factor, arena control olor: $F = 0,678$, $gl = 2$, $p = 0,514$; arena control agua: $F = 1,267$; $gl = 2$; $p = 0,293$; arena control calor: $F = 0,862$, $gl = 2$; $p = 0,43$) (Figura 1, 2 y 3). La actividad locomotora (medida como la velocidad) en las tres arenas tampoco varió por efecto de la antenectomía (ANOVA 1 factor, arena control olor: $F = 0,952$, $gl =$

2, $p = 0,395$; arena control agua: $F = 2,588$; $gl = 2$; $p = 0,0884$; arena control calor: $F = 0,502$; $gl = 2$: $p = 0,61$) (Figura 1, 2 y 3).

La actividad locomotora de piojos con antenas intactas que caminaron en distintas arenas controles fue significativamente diferente (ANOVA 1 factor, $F = 4,616$, $gl = 2$, $p = 0,016$) (Figura 4) .La actividad de piojos intactos fue mayor en la arena control de olor al hospedador (a 30 °C) y en la arena control de calor (piojos alimentados cinco minutos antes del ensayo, arena a 22 ° C) que la actividad en la arena control de estímulo hídrico (Tukey, arena ctrl olor vs arena ctrl agua, $p = 0,037$; arena ctrl calor vs arena ctrl agua, $p = 0,032$)

Los piojos alimentados fueron tan activos como piojos que caminaron en arenas a temperaturas parecidas a las de sus hospedadores (Tukey, arena ctrl olor vs arena ctrl calor, $p = 0,99$)

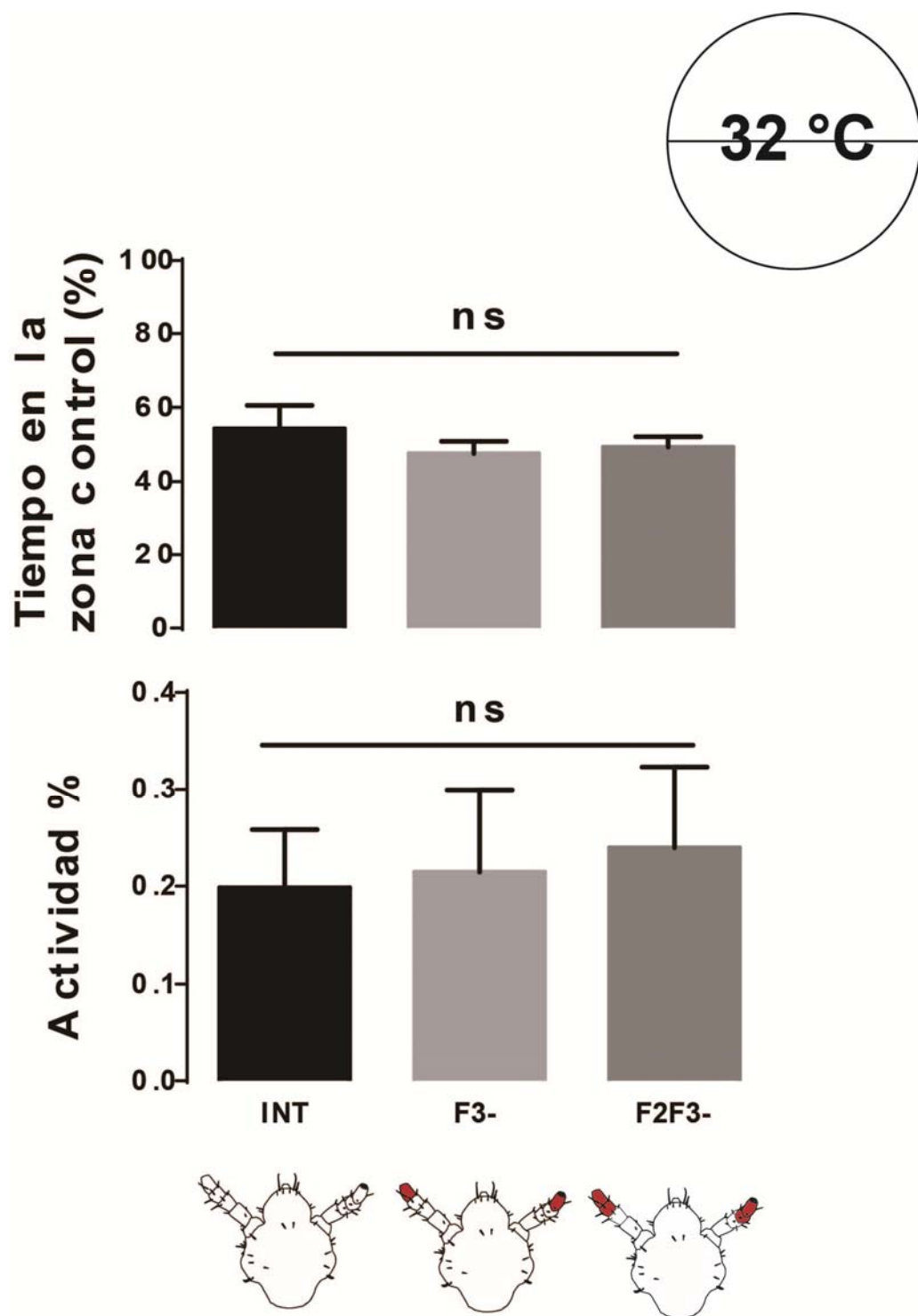


Figura 1. Tiempo de permanencia en la zona control y actividad para los piojos sometidos a tres tratamientos de antenectomía para la arena control de olores del hospedador. ns: no hay diferencias significativas debido a los tratamientos.

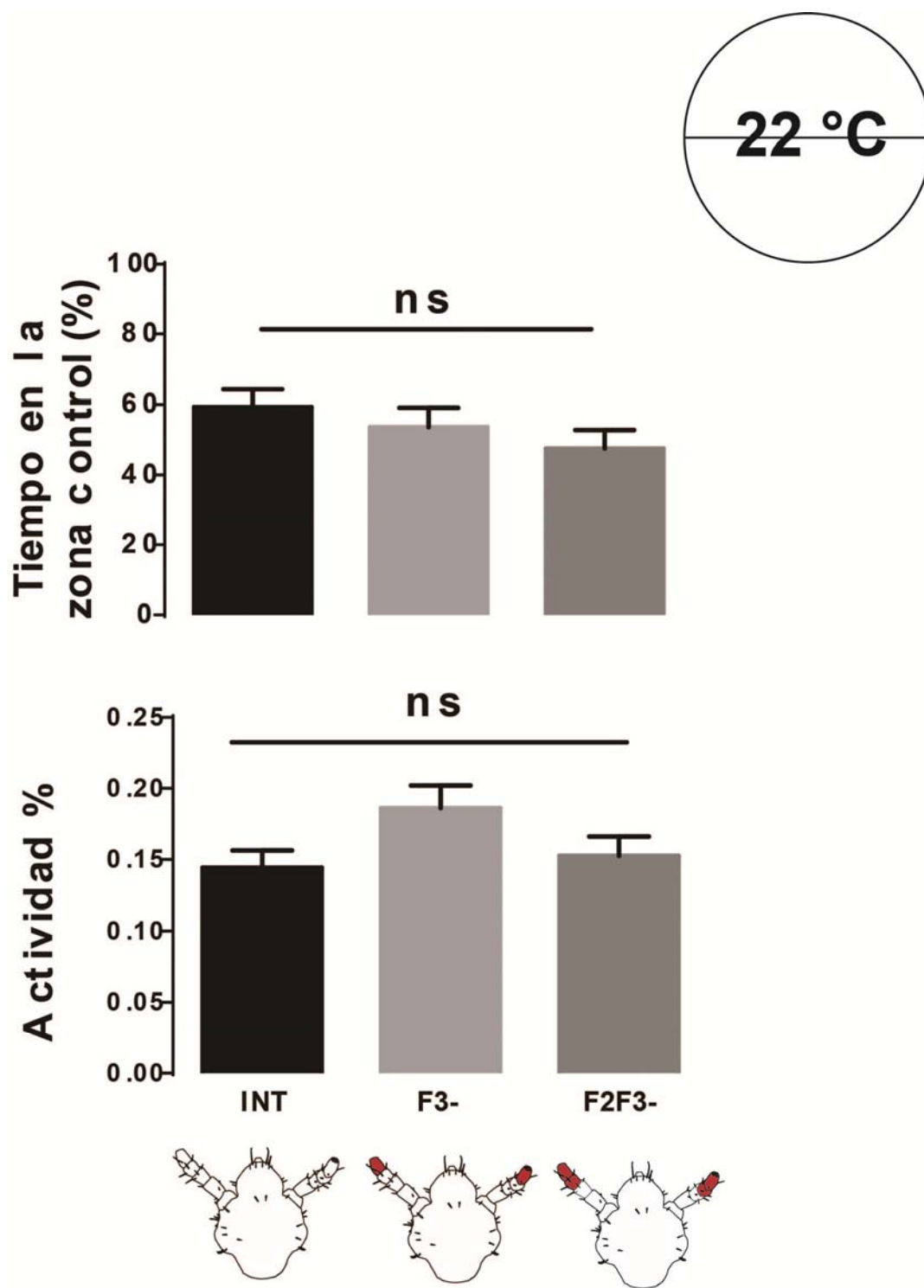


Figura 2. Tiempo de permanencia en la zona control y actividad para los piojos sometidos a tres tratamientos de antenectomía para la arena control de estímulo hídrico. ns: no hay diferencias significativas debido a los tratamientos.

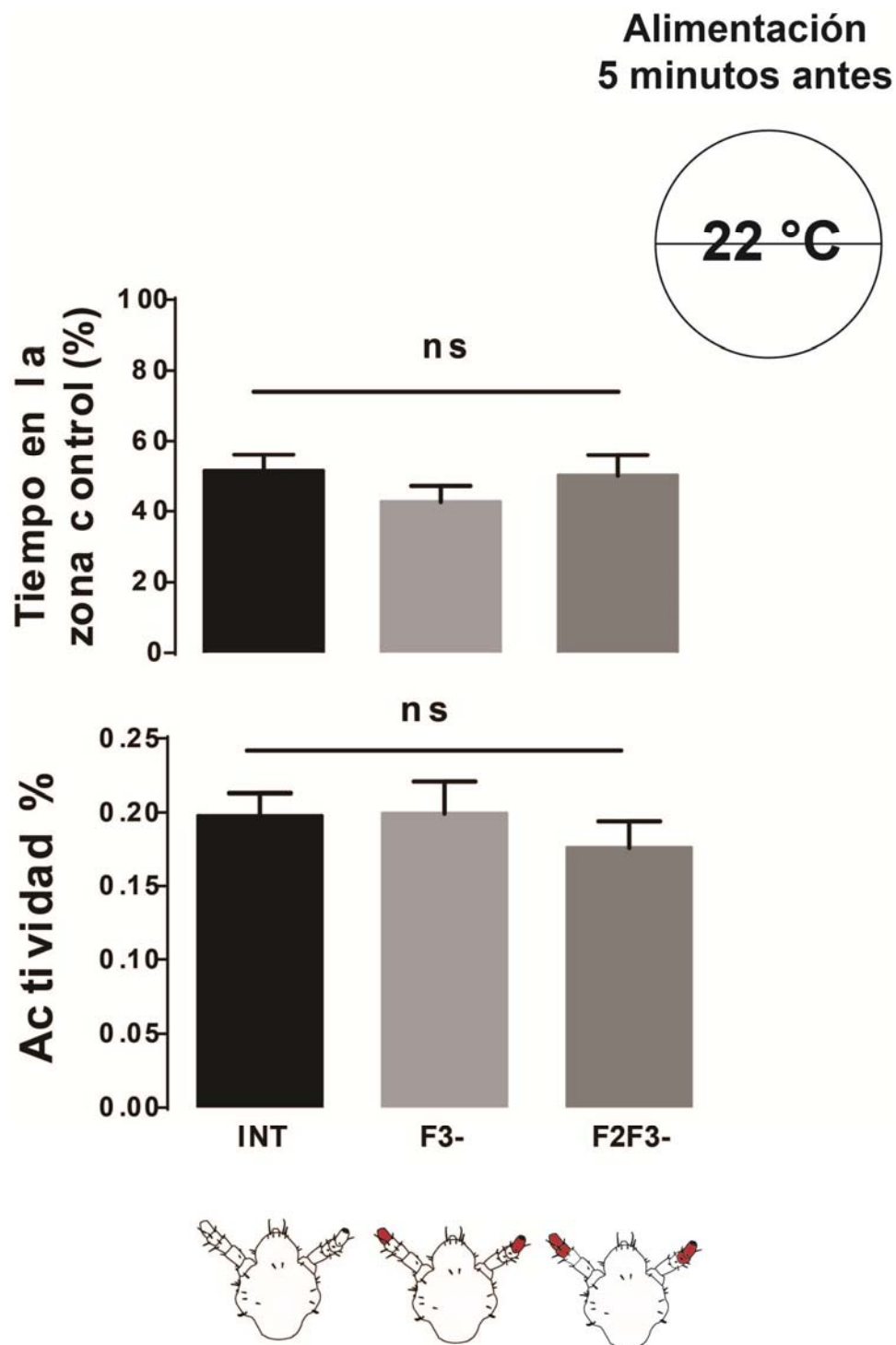


Figura 3. Tiempo de permanencia en la zona control y actividad para los piojos sometidos a tres tratamientos de antenectomía para la arena control de estímulos térmicos. ns: no hay diferencias significativas debido a los tratamientos.

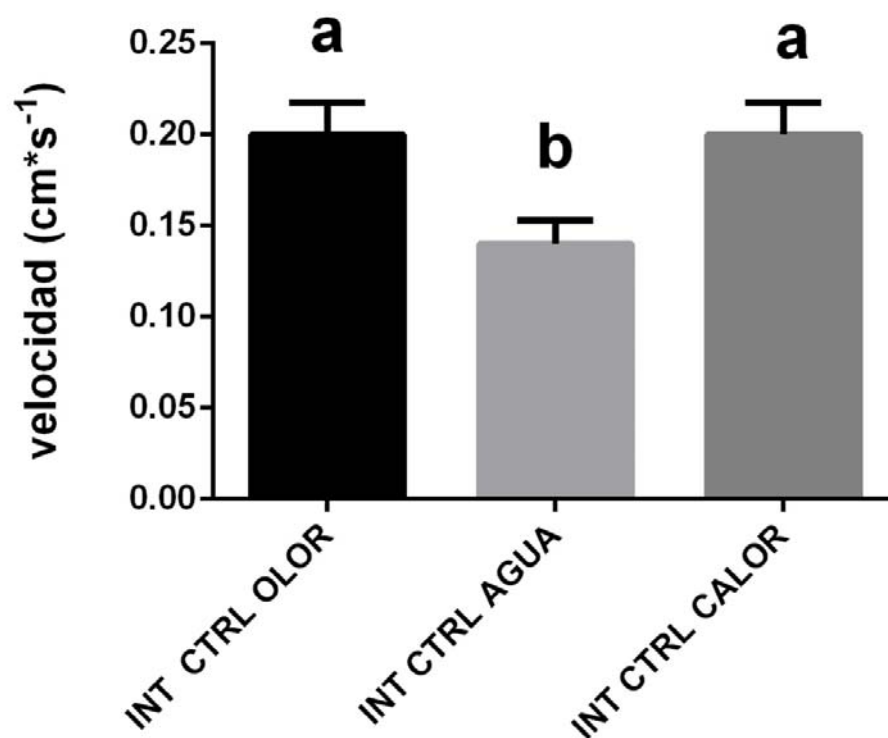


Figura 4. Velocidad promedio para piojos con antenas intactas en cada una de las tres arenas controles. Olor= estímulo químico; agua= estímulo hídrico; calor (32 °C)= estímulo térmico. Diferentes letras indican diferencias significativas $p < 0,05$.

Capítulo 5

ESTUDIO PRELIMINAR DE OTROS ÓRGANOS SENSORIALES DE *PEDICULUS HUMANUS CAPITIS* CANDIDATOS A EVALUAR AL HOSPEDADOR

5.1. Introducción

En la evolución de la hematofagia el aparato bucal de cada grupo de insectos se modificó independientemente para permitirles perforar la piel y tomar la sangre de sus hospedadores. Esto ha resultado en los diferentes tipos de aparatos bucales bien conocidos, todos capaces de obtener sangre, que caracteriza a la variedad de insectos hematófagos que conocemos en la actualidad (mosquitos, vinchucas, chinches de cama, moscas tse tse, piojos, etc.). Asimismo, las sensilias que median las respuestas a estímulos asociados al hospedador se encuentran adaptadas a su contexto particular (i.e., comportamiento, ecología, nicho) dependiendo de su insecto portador. De esto resulta una gran variedad de tipos morfológicos de sensilias en insectos en general y en hematófagos en particular.

Según McIver (1987), la aceptabilidad de una fuente de comida para un insecto hematófago comienza con el primer paso en la localización del hospedador. Un estímulo inicial desencadena la toma de sangre de manera que el insecto se prepara para un estímulo subsecuente. Si este estímulo es detectado, el insecto responderá de manera de maximizar la oportunidad de contactar el siguiente estímulo en la cadena comportamental. El resultado es una secuencia compleja de estímulos y respuestas que, si se completan, fueron desencadenados por un hospedador adecuado. Por lo tanto, la necesidad de analizar una amplia gama de estímulos en la etapa final, por ejemplo, durante el proceso de la toma de sangre, sería menor. Consecuentemente, es

esperable que existan pocos receptores quimiosensoriales en el aparato bucal de insectos hematófagos, más específicamente hematófagos obligados.

Las patas de los piojos serían otros órganos candidatos a presentar estructuras sensoriales que evaluarían al hospedador. Muchos insectos fitófagos y hematófagos facultativos (como mosquitos y tábanos), gracias a quimiorreceptores de contacto, pueden detectar sustancias no volátiles, como por ejemplo azúcares y sales, indicadoras de una fuente de alimento (Chapman 2003).

Teniendo en cuenta lo expresado, el objetivo de este capítulo es reconocer estructuras sensoriales presentes en el aparato bucal y patas de los piojos de la cabeza que estarían involucradas en la detección del hospedador.

En una primera etapa, para determinar la posible implicancia de estructuras sensoriales del aparato bucal y patas en la detección del hospedador, se evaluó si piojos antenectomizados pueden alimentarse sobre la mano de un voluntario.

En una segunda etapa, se describió la organización estructural de sensillas candidatas distribuidas en el aparato bucal externo y patas de piojos adultos mediante el análisis de imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido.

Por último, se discute la batería sensorial de los piojos involucrada en la evaluación del hospedador en comparación con otros insectos hematófagos.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Insectos

Los insectos se recolectaron como se detalla en el Capítulo 1. En todos los ensayos, se utilizaron hembras.

5.2.2. Ensayo de alimentación con piojos antenectomizados

Con el objetivo de evaluar la implicancia de estructuras adicionales a la antena en la detección del hospedador, se evaluó la decisión de piojos adultos de alimentarse sobre el brazo de voluntarios humanos bajo distintos tratamientos de antenectomización.

La cirugía de los flagelómeros antenales se realizó con un par de micro-tijeras (World Precision Instruments) en piojos inmovilizados bajo lupa. Los tratamientos aplicados a cada piojo fueron los siguientes:

- INT: Ambas antenas intactas
- F3-: Ambas antenas con los flagelómeros 3 removidos
- F2F3-: Ambas antenas con los flagelómeros 3 y 2 removidos
- F1F2F3-: Ambas antenas con los flagelómeros 3, 2 y 1 removidos

A cada piojo se le asignó un tratamiento al azar. Un individuo se apoyó sobre el brazo de un voluntario y se registró si se alimentó o no durante 5 minutos. La respuesta alimentaria positiva se tomó como tal cuando se observó por transparencia la entrada de sangre por bombeo en la cabeza de cada insecto bajo lupa.

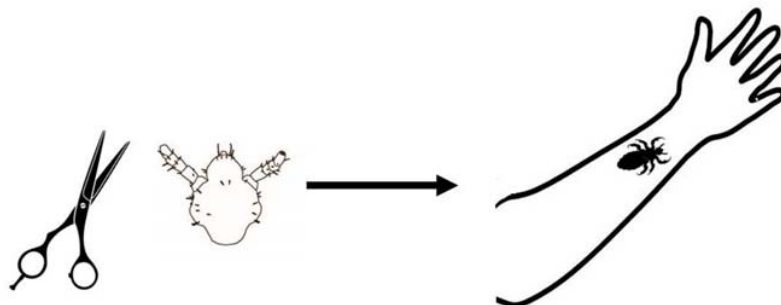


Figura 1. Esquema del ensayo de alimentación con insectos antenectomizados.

5.2.3. Análisis estadístico

La respuesta alimentaria de los piojos bajo los diferentes tratamientos de corte de flagelómeros se estudió mediante un modelo lineal generalizado binomial con $n = 1$. Dicho modelo asocia la presencia de un segmento con la probabilidad de alimentarse del piojo. Los supuestos de aleatoriedad e independencia se cumplieron. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico R (v.3.3.1) (R Core Team 2016).

5.2.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La organización externa del aparato bucal y de las patas de *P. humanus capitis* adultos se escaneó por microscopía electrónica de barrido para describir e identificar estructuras candidatas que les permitan evaluar al hospedador. Las muestras se procesaron siguiendo el protocolo experimental detallado en el Capítulo 3.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Comportamiento de alimentación en piojos antenectomizados

En promedio, la probabilidad de que un piojo se alimente sobre la mano del voluntario no varió significativamente con el corte de flagelómeros ($p=0,180$). En otras palabras, el número de flagelómeros faltantes no explica si el piojo come o no come: bajo todos los tratamientos la proporción de insectos que comió fue alta (Figura 2). Cualitativamente, no se observó que los piojos antenectomizados tuvieran dificultades para evaluar y perforar la piel para iniciar la toma de sangre. En otros insectos hematófagos, como por ejemplo en insectos triatominos, la antenectomía anula por completo la fase de muestreo, que consiste en la búsqueda de capilares a través de movimientos activos del aparato bucal en la piel del hospedador (Friend y Smith, 1977). Sin embargo, en experimentos similares con hembras de *Aedes aegypti* antenectomizadas, cuando éstas eran dispuestas sobre la piel humana podían alimentarse perfectamente (Roth, 1951).

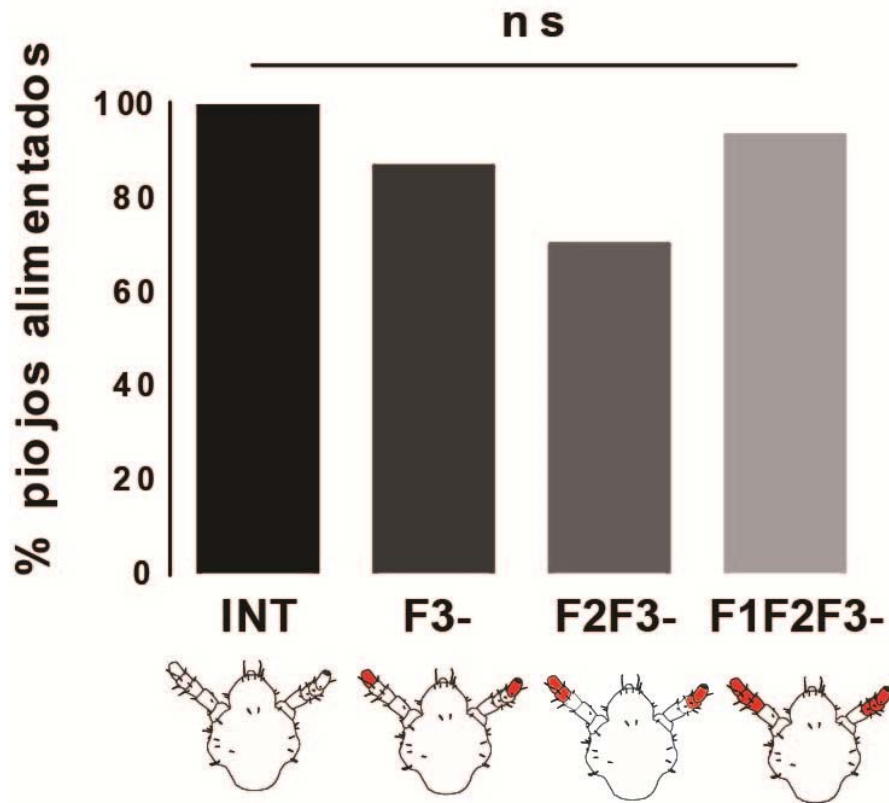


Figura 2. Porcentaje de piojos alimentados bajo los diferentes tratamientos de antenectomía. El número de piojos que se alimentaron no se modificó significativamente por la falta de flagelómeros. ns= no hay diferencias significativas.

Estos resultados sugieren que la antena no sería el órgano determinante para la completa evaluación del hospedador una vez que el piojo se encuentra sobre él. Hipotetizamos, entonces, que existirían otras estructuras sensoriales distribuidas en otros órganos del cuerpo de los piojos que podrían contribuir a informar al insecto que existen los recursos necesarios para iniciar la fase de muestreo.

En los piojos antenectomizados la presencia de termorreceptores en otras partes del cuerpo podrían brindarles la información necesaria para que el insecto inicie la fase de muestreo. Sin embargo, no creemos que el calor por sí

solo sea el estímulo que desencadene la alimentación, ya que hemos detallado en el Capítulo 1 que el piojo en una arena a una temperatura similar a la del piel del hospedador aumenta la velocidad de desplazamiento en lugar de quedarse quieto para hacer el muestreo de una superficie potencial de piel humana.

Las sustancias químicas presentes en el cuero cabelludo humano desencadenan arrestamiento de los piojos en la zona del estímulo y además inician una serie de comportamientos estereotipados similares a los que hace sobre el cuero cabelludo en el momento de la alimentación (Capítulo 2). Cuando el piojo se posa sobre la muestra de cuero cabelludo, el haustelo del piojo se mueve hacia adentro y hacia afuera, exponiendo los dentículos. Ahora bien, como vemos que los piojos antenectomizados pueden cumplir con todas las fases de alimentación y postulamos que un conjunto de sustancias químicas podría ser el disparador de este comportamiento, es posible que quimiorreceptores del aparato bucal o de las patas podrían detectar los estímulos del hospedador necesarios para desencadenar la alimentación. Hasta el momento se desconoce de la existencia de compuestos químicos fagoestimulantes presentes en la piel del hospedador que favorezcan la alimentación de los insectos hematófagos. Más trabajos son necesarios en esta dirección. Sin embargo, sabemos que distintas especies de mosquitos, *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus* y *An. gambiae* reconocen a través de quimiorreceptores de contacto de la labela (estructura del aparato bucal que contacta la piel del hospedador pero no entra en contacto con la sangre) detectan sales y azúcares (Kessler et al 2013, Sparks and Dickens 2016). En *Aedes*, la ausencia de antenas y palpos maxilares determinaron que las

hembras no pudieran alimentarse sobre el hospedador. Se sabe que los palpos maxilares presentan varios tipos de sensilias, entre ellas quimiorreceptores, detectores de CO₂, termorreceptores y mecanorreceptores (Bohbot et al., 2014).

5.3.2. Sensilias del aparato bucal del piojo de la cabeza

Por lo discutido anteriormente analizamos por MEB el aparato bucal de piojos. Las estructuras del aparato bucal del piojo son discretas ya que todo el aparato chupador se encuentra totalmente retraído dentro la cápsula de la cabeza (Figura 3). La cabeza se divide en tres zonas bien diferenciadas: el haustelo, el clípeo, el epicráneo y el occipucio. En general, se observaron sensilias similares a las cerdas descritas en la antena de los piojos, distribuidos más o menos en forma agregada en las diferentes zonas de la cabeza. Las cerdas presentaron bases articuladas en la base y afinándose hacia el extremo distal. No se observaron poros o estructuras particulares en la pared de las cerdas (Figura 4D). Estas sensilias se distribuyeron en forma agregada alrededor del haustelo en la zona anterior del clípeo; representando potenciales mecanorreceptores con la función de coordinar las acciones que se llevan a cabo durante la perforación de la piel tales como la eversión del haustelo y los estiletes (Figura 3, 4A). No descartamos que algunas de esas cerdas sean potenciales quimiorreceptores de contacto. Las cerdas que se encuentran en las zonas laterales del clípeo y en el lado ventral de la primera porción del epicráneo tendrían la función de coordinar la posición de las antenas durante la alimentación (Figura 3, 4 B, C).

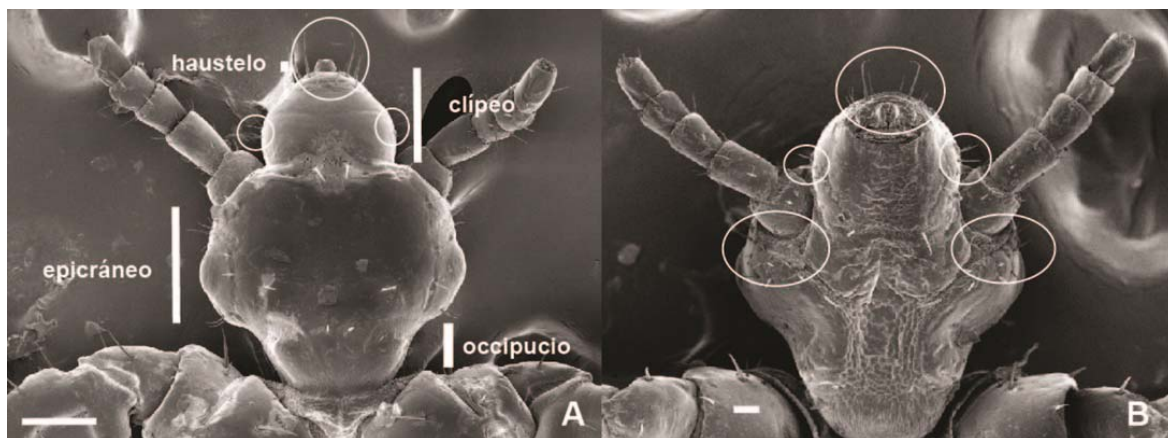


Figura 3. Proboscis y cabeza de un piojo adulto. (A) Vista dorsal, de anterior a posterior: haustelo, clípeo, epicráneo y occipucio. Barra de escala= 100 μ m. (B) Vista ventral. Barra de escala= 30 μ m. Los círculos muestran las zonas de agregación de las cerdas.

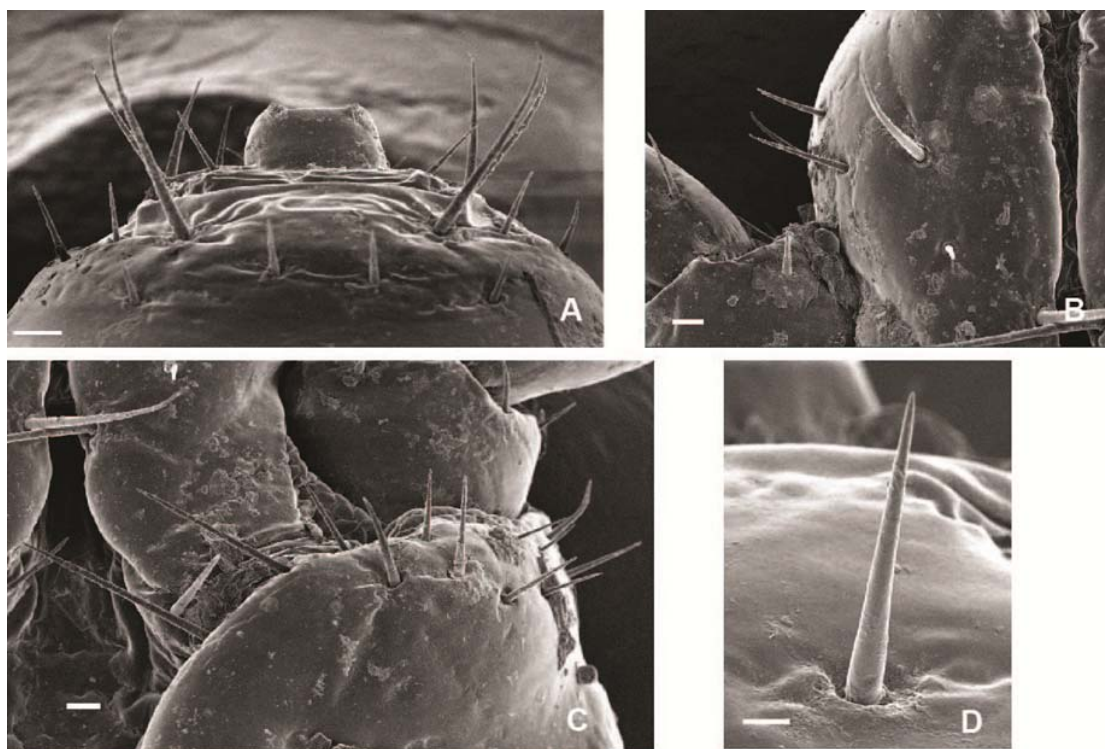


Figura 4. Distribución de cerdas en las zonas de la cabeza de un piojo adulto. (A) Cerdas y posibles quimiorreceptores de contacto de la parte anterior del clípeo. Barra de escala= 10 μ m. (B) Cerdas de la zona lateral del clípeo. Barra de escala= 10 μ m. (C) Cerdas cercanas a la base de las antenas. Barra de escala= 10 μ m. (D) Detalle de una cerda de la zona anterior del clípeo. Barra de escala= 3 μ m.

Por delante del clípeo, se extiende un rostro pequeño, corto y romo: el haustelo (Figura 3). Es incompletamente circular, y su periferia se interrumpe ventralmente formando la abertura bucal (Figura 5). En las inmediaciones de la abertura bucal, una batería de estructuras quitinosas fuertes, los dentículos, se observan distribuidos de manera uniforme (Figura 5B, C, D). En la Figura 5E se observa el haustelo con los dentículos totalmente evertidos.

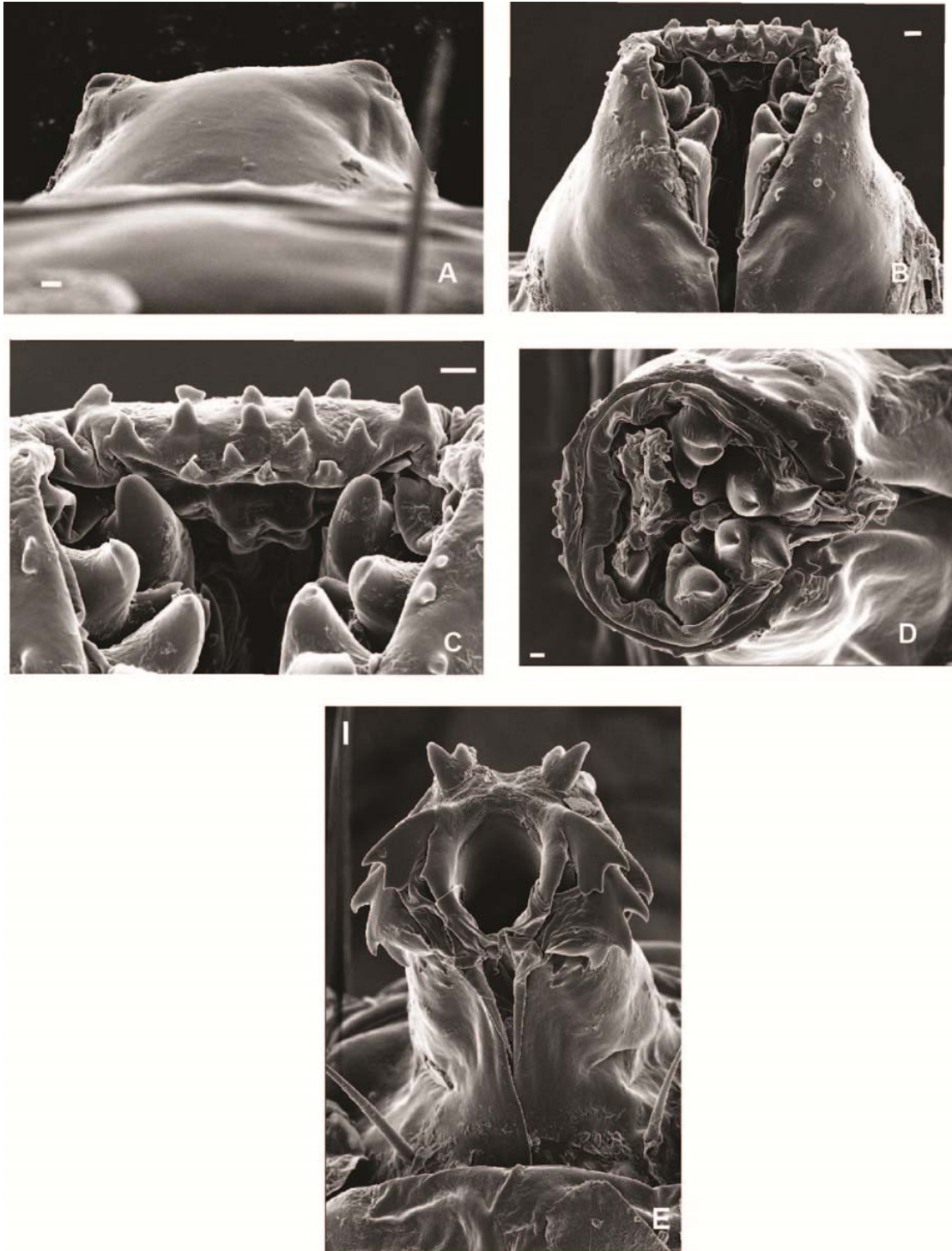


Figura 5. Haustelo de un piojo adulto. (A) Vista dorsal del haustelo. Barra de escala = 1 μm . (B) Vista ventral, se observan múltiples dentículos. Barra de escala = 10 μm . (C) Detalle de los dentículos en la zona de la abertura bucal. Barra de escala = 1 μm . (D) Vista anterior del haustelo. (E) Haustelo totalmente evertido. Barra de escala= 2 μm .

En la mayoría de los piojos chupadores (suborden Anoplura) se ha reportado sensilias del tipo cerdas o tricoideas en la región alrededor de la abertura bucal como por ejemplo en el piojo del ganado, *Solenopotes capillatus* (Miller 1970), la ladilla *Pthirus pubis* (Ubelaker et al., 1973) e inclusive en *Pediculus humanus capitis* (Hatsushika et al., 1983; las imágenes obtenidas del microscopio de barrido de distintos órganos del piojo de la cabeza de esta publicación no tienen una buena resolución por lo cual las repetimos en este trabajo). Sin embargo, en el piojo chupador del elefante *Haematomyzus elephantis* (suborden Rhynchophthirina) se describió en el rostro elongado una región palpal labial con un agrupación de seis sensilias que representaban tres morfotipos (basicónica, estilocónica y tricoidea) (Baker y Chandrapatya, 1992). Sorprendentemente, uno de los morfotipos de dicho palpo labial estaba representado por dos sensilias basicónicas que son morfológicamente muy similares a las sensilias basicónicas olfativas de tipo dedos observadas en la antena de *P. humanus capitis*. Adicionalmente, existe evidencia de estructuras quimiorreceptoras en el aparato bucal de otros insectos hematófagos como, dos especies de chinches de cama antropofílicas, *Cimex hemipterus fasciculus* y *Cimex lectularius* (Nagerh et al 1996, Mendki et al 2013), el triatomino *Rhodnius prolixus* (comunicación personal de Romina Barrozo) y en la labela de *Aedes aegypti* (Lee y Craig 2009, Sparks et al. 2013) y *Lutzomyia longipalpis* (Spiegel et al 1995).

Los resultados de este trabajo muestran sensilias con potencial función mecanorreceptora y dientes especializados en las inmediaciones de la abertura bucal del piojo de la cabeza. Sin embargo, no descartamos la presencia de

sensilias quimio y termorreceptoras para lo cual son necesarios estudios adicionales.

5.3.3. Sensilias de las patas del piojo de la cabeza

Se obtuvieron imágenes de las patas de piojos de la cabeza adultos donde se observaron cerdas (mecanorreceptores potenciales) distribuidas en la tibia y tarso (Figura 6A). Además, se observó un grupo de pelos en la base de la garra llamados “proceso de tipo dedos” por Soler y Martín Mateo (2009) cuando los observaron en las patas del piojo del cuerpo (Figura 6B). Estas estructuras informarían sobre el ángulo de apertura de la garra de la pata del piojo.

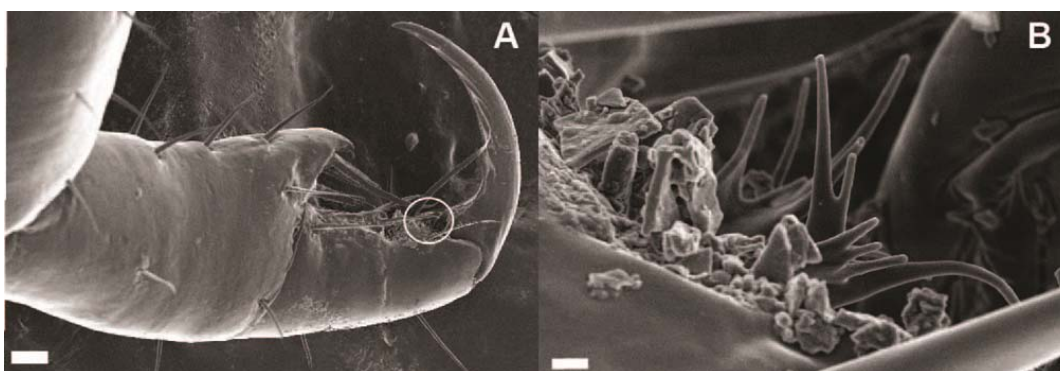


Figura 6. (A) Detalle de la porción final del primer par de patas de un piojo adulto. El círculo muestra la zona donde se encuentran los procesos de tipo dedos. Barra de escala= 20 μ m. (B) Detalle de los procesos de tipo dedos en la base de los tarsos. Barra de escala= 1 μ m.

5.3.4. Comparación de la maquinaria sensorial del piojo de la cabeza versus otros insectos hematófagos

A lo largo de esta tesis se describieron morfológicamente las estructuras sensoriales de la antena del piojo de la cabeza *P. humanus capitis* y las posibles respuestas comportamentales asociadas a cada una de ellas. Junto

con la información actualizada proveniente de la literatura de especies filogenéticamente próximas, presentamos en esta parte de la Tesis un estudio comparativo que intenta evidenciar las diferencias y las semejanzas comportamentales y morfológicas que existen entre *P. humanus capitis* y otros insectos hematófagos, centrándonos en la interacción insecto/ hospedador.

La hematofagia es una especialización alimenticia que surgió varias veces de manera independiente en grupos de insectos no necesariamente emparentados (Figura 7). Tal es el caso de los Diptera (mosquitos y flebótomos) que se encuentran muy alejados en términos filogenéticos de los Hemiptera (vinchucas y chinches de cama) y de los Phthiraptera (piojos). Si bien probablemente la aparición de la hematofagia en estos grupos se originó en diferentes términos y con distintas presiones evolutivas, en todos los casos algunos de sus respectivos ancestros deberían haber presentado características morfológicas y fisiológicas que faciliten la aparición del comportamiento de la hematofagia.

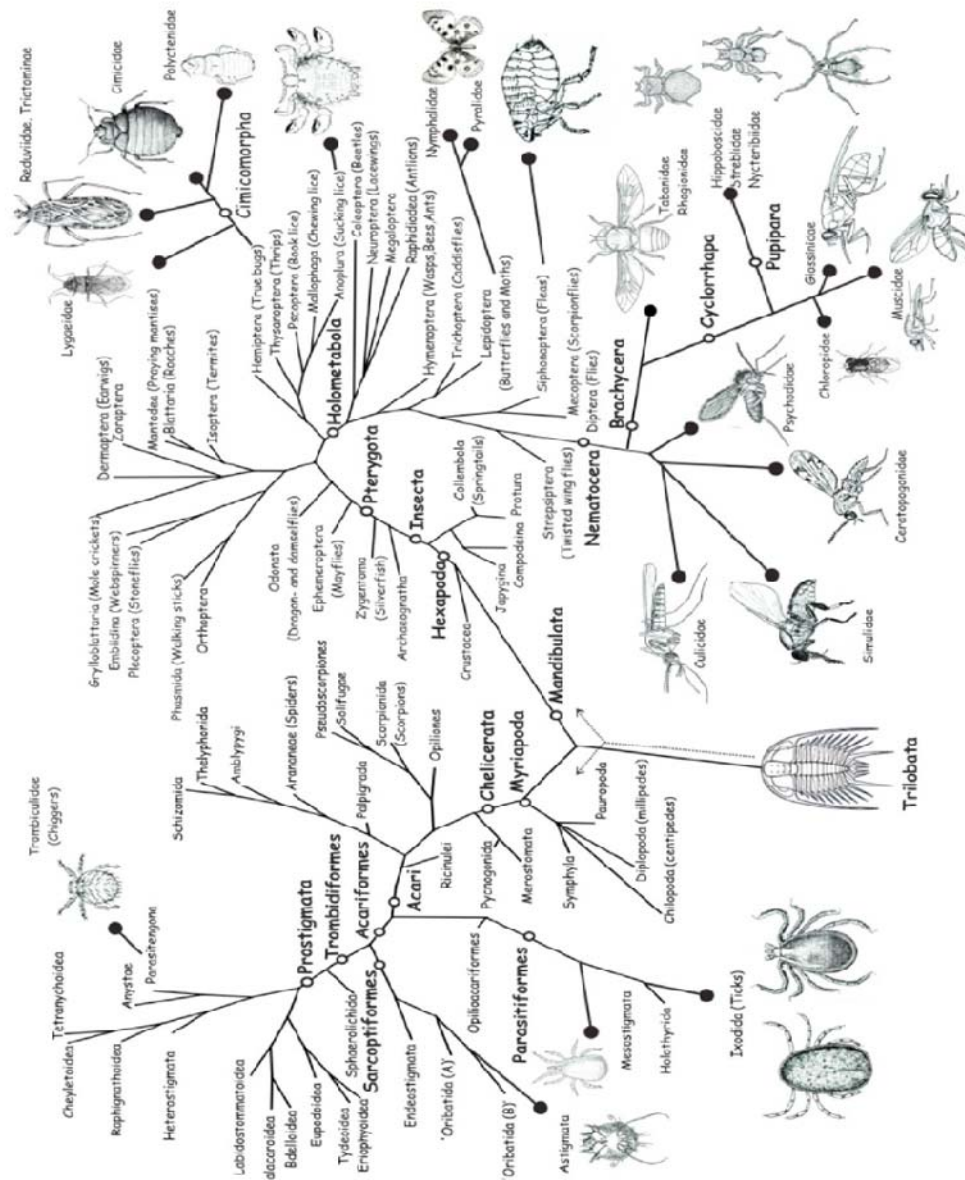


Figura 7. Evolución de la hematofagia en artrópodos, Ignell 2017.

En el caso de los mosquitos y vichucas por ejemplo se postula que el aparato picador para acceder a fluidos vegetales de un ancestro fitófago fue el punto de

partida de la aparición de la hematofagia. Originariamente, la fitofagia fue sucedida por un paso transicional de depredación y entomofagia, en la que la fuente principal de alimentación eran otros insectos que se encontraban en el nicho y explotaban los mismos recursos que los mosquitos y vinchucas ancestrales. Dichas presas alimenticias, que representaban una mejor fuente de nutrientes que los fluidos vegetales, comenzaron a ser accesibles gracias al aparato bucal picador pre-adaptado que les permitió acceder a la hemolinfa de otros insectos (Otálora-Luna et al., 2013; Lehane, 2005). El último paso hacia la hematofagia fue un cambio comportamental que se tradujo en la asociación de los mosquitos y vinchucas directamente con los animales vertebrados. Dicha asociación fue y es mayor en el caso de la vinchuca que en los mosquitos, ya que este último es hematófago facultativo (*i.e.* solo las hembras se alimentan de sangre en ciertos momentos de su vida adulta) mientras que las vinchucas son hematófagos obligados (*i.e.* todos los estadios se alimentan exclusivamente de sangre).

En los piojos, la hematofagia tiene un origen distinto. Es probable que los ancestros detritívoros de los piojos fueran atraídos a los nidos y/o refugios de ciertos vertebrados, donde el ambiente húmedo y cálido era favorable. Adicionalmente, el nido pudo haber sido fuente de recursos alimenticios como materia orgánica proveniente de restos de piel, heces, etc. (Lehane, 2005). La ingestión regular y accidental de la materia orgánica encontrada en el nido o hábitat, muy probablemente condujo a la selección de individuos con el sistema fisiológico que les permitió la explotación de dicho material. Las adaptaciones comportamentales guiaron eventualmente a la alimentación directa del huésped. Progresivamente y con el tiempo, aparecerían piezas bucales

especializadas en la alimentación de sangre derivadas de piezas masticadoras. El desarrollo de este tipo de alimentación fue paulatina primero a la hematofagia facultativa y luego en algunos insectos a la hematofagia obligada (Azar y Nel, 2012).

Independientemente de cómo el comportamiento de alimentarse de sangre fue seleccionado, muchos de los animales hematófagos que incluyen al hombre como hospedador pueden presentar importancia médica y sanitaria. La Tabla 1 resume información recolectada de la literatura y del presente trabajo acerca de la maquinaria sensorial de 5 insectos de importancia epidemiológica, incluyendo al piojo de la cabeza, *Pediculus humanus capitis*, a la chinche de cama, *Cimex lectularius*, el triatomo vector del Mal de Chagas, *Rhodnius prolixus*, al mosquito vector del dengue, Zika y chikungunya, *Aedes aegypti*, y al flebótomo vector de la Leishmaniasis, *Lutzomyia longipalpis*. De manera global se puede observar un aumento en la complejidad sensorial que va desde los piojos, pasando por la chinche de cama y el triatomo hasta llegar al máximo en el mosquito y el flebótomo. Dicha complejidad es estimada a través de la comparación de las estructuras sensoriales presentes en cada especie: *i.e.* número y tipo de sensilias, número de glomérulos, número de genes neurosensoriales y presencia de otros órganos sensoriales. Dicho gradiente correlaciona positivamente con la distancia que tiene que recorrer el insecto para encontrar al hospedador. Todos los estadios de piojos y chinches de cama desarrollan su vida en el entorno más cercano del hospedador y presentan una menor carga sensorial en comparación con los dípteros (mosquitos y flebótomos) que triplican el número de sensilias antenales, glomérulos y genes de los presentados por los insectos anteriores.

Mclver (1987) recopiló datos de sensilias y neuronas totales (estructuras que no solo evaluarían al hospedador sino que estarían involucradas en otros comportamientos como por ejemplo, la cópula, oviposición, etc) presentes en las antenas de insectos hematófagos observando la misma tendencia y barajó la hipótesis de que si la relación entre la distancia al hospedador y la carga sensorial es una relación directa podría ser el resultado de lo propuesto por Chapman (1982, también discutido en el capítulo 3) que postuló que el tamaño de la maquinaria sensorial está directamente relacionado con la concentración del estímulo disponible(Figura 8).

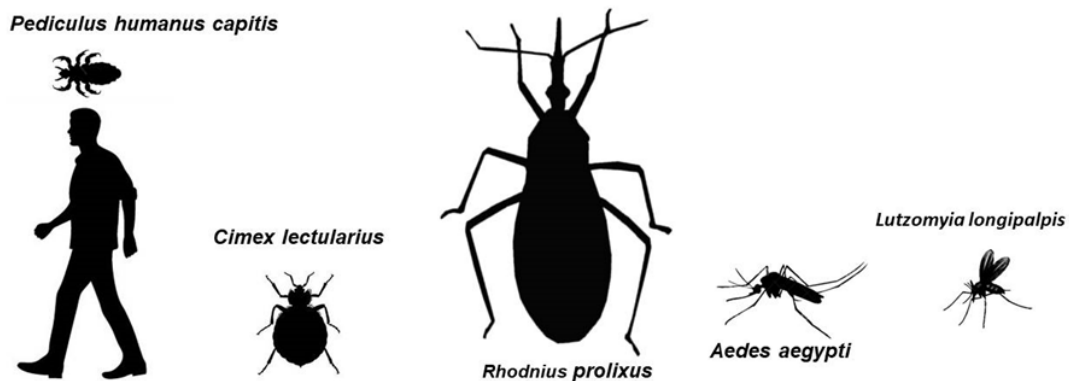


Figura 8. Distancia al hospedador y tamaño relativo de cinco insectos hematófagos.

En el caso del piojo al estar tan cerca del hospedador, el estímulo siempre está concentrado y por eso no necesitaría muchas sensilias para reconocer a su hospedador mientras que el caso opuesto sería el de un mosquito volador que enfrenta un abanico de un número mayor de estímulos y cuyas

concentraciones se diluyen con la distancia en la búsqueda de su hospedador (esto también se discute en el capítulo 3) (Figura 9). Además, la Tabla 1 muestra menor evidencia de estructuras quimiosensoriales en el aparato bucal y genes sensoriales (en especial gustativos, GRs) en insectos que demuestran hematofagia obligada (piojos y chinches de cama) en comparación con los insectos hematófagos facultativos (mosquito y flebótomos).

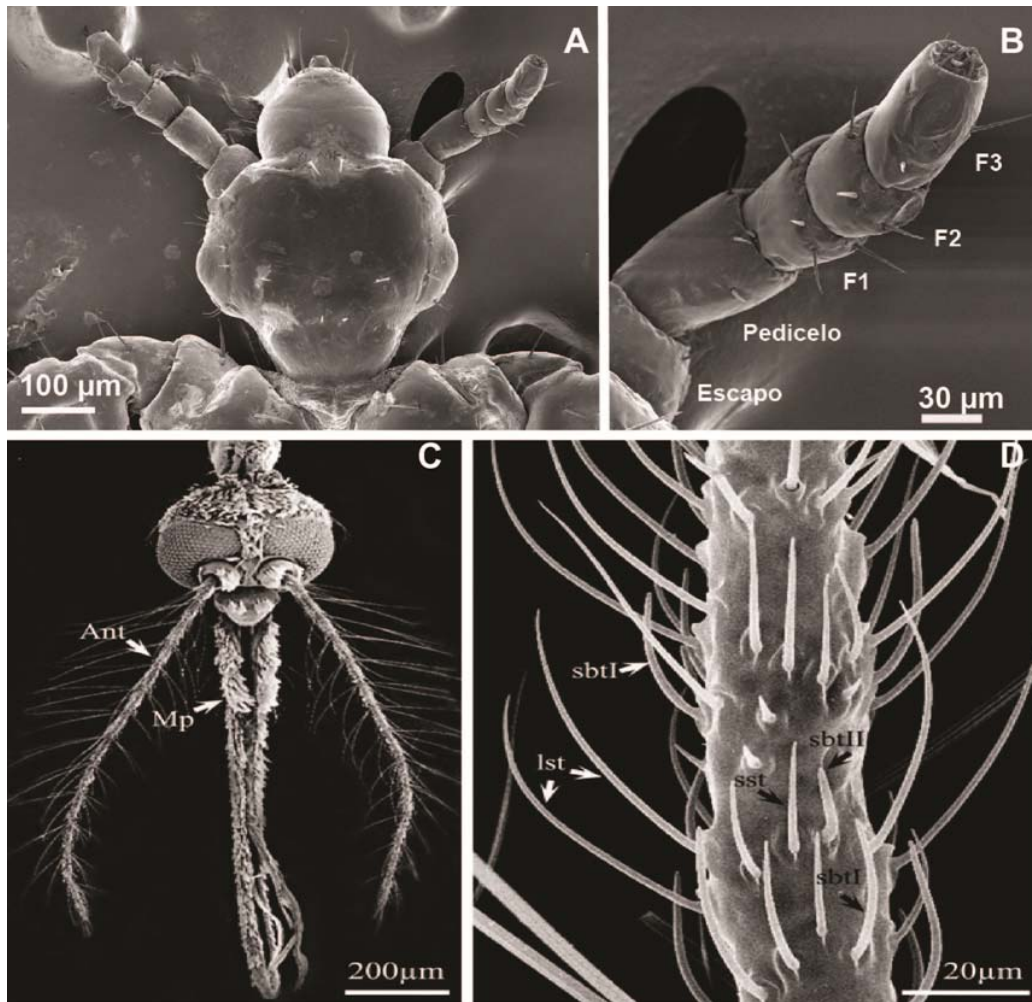


Figura 9. Comparación de estructuras sensoriales de la antena del piojo de la cabeza versus la antena del mosquito *Aedes aegypti*. (A) Vista general de la cabeza del piojo. (B) Antena del piojo. (C) Vista general de la cabeza del mosquito *Aedes aegypti*. (D) Detalle de la antena del mosquito *Aedes aegypti*.

Otra observación de McIver (1987) mostró que la carga sensorial de los órganos del aparato bucal también depende de la complejidad comportamental asociada a la alimentación del insecto. En la Figura 10 se muestran las estructuras sensoriales de la labela de un *Aedes aegypti* (hematófago facultativo) y del haustelo del piojo de la cabeza (hematófago obligado). Los estadios adultos de mosquitos y flebótomos se alimentan de sangre pero también de néctar de flores (hematófagos facultativos). Consecuentemente la dualidad de la dieta implica un mayor número de estímulos a evaluar tanto en la etapa de búsqueda (olores, CO₂, temperatura) como en la etapa de evaluación del alimento (fagoestimulantes, sustancias disuasivas). Esta última etapa sería más compleja cuando el insecto consume fuentes de alimentos no animales ya que en el caso de la hematofagia, la evaluación de estímulos cuando el insecto llega a la piel del hospedador dependería exclusivamente de la búsqueda previa asociada a otros estímulos como por ejemplo, olores a distancia, calor y CO₂ (McIver, 1987). No obstante, la información sobre la evaluación de la piel y sangre del hospedador en insectos hematófagos obligados es escasa y más estudios son necesarios para aceptar esta hipótesis (Pontes et al. 2014, Benton 2017).

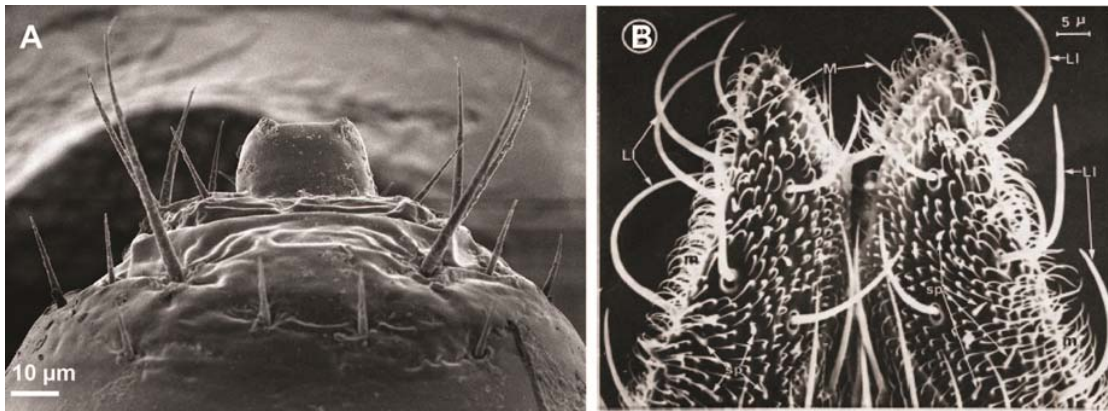


Figura 10. Comparación de estructuras sensoriales de la porción final del aparato bucal de dos insectos hematófagos. (A) Haustelo del piojo de la cabeza. (B) Labela del mosquito *Aedes aegypti* (Lee y Craig, 2009).

Lo resumido en esta sección demuestra que la hematofagia es el resultado de un sinfín de factores que dependieron del contexto de cada insecto ancestro y que fue todo menos un evento sencillo. De hecho, la morfología de las sensilias de distintos insectos hematófagos es más propensa a reflejar relaciones taxonómicas independientes del nicho de alimentación, que comportamientos alimenticios similares. Consecuentemente los insectos chupadores de sangre presentan sensilias más similares en estructura a las de sus parientes fitófagos y saprófagos más cercanos que a otras especies hematófagas más distantes filogenéticamente (Figura 11).

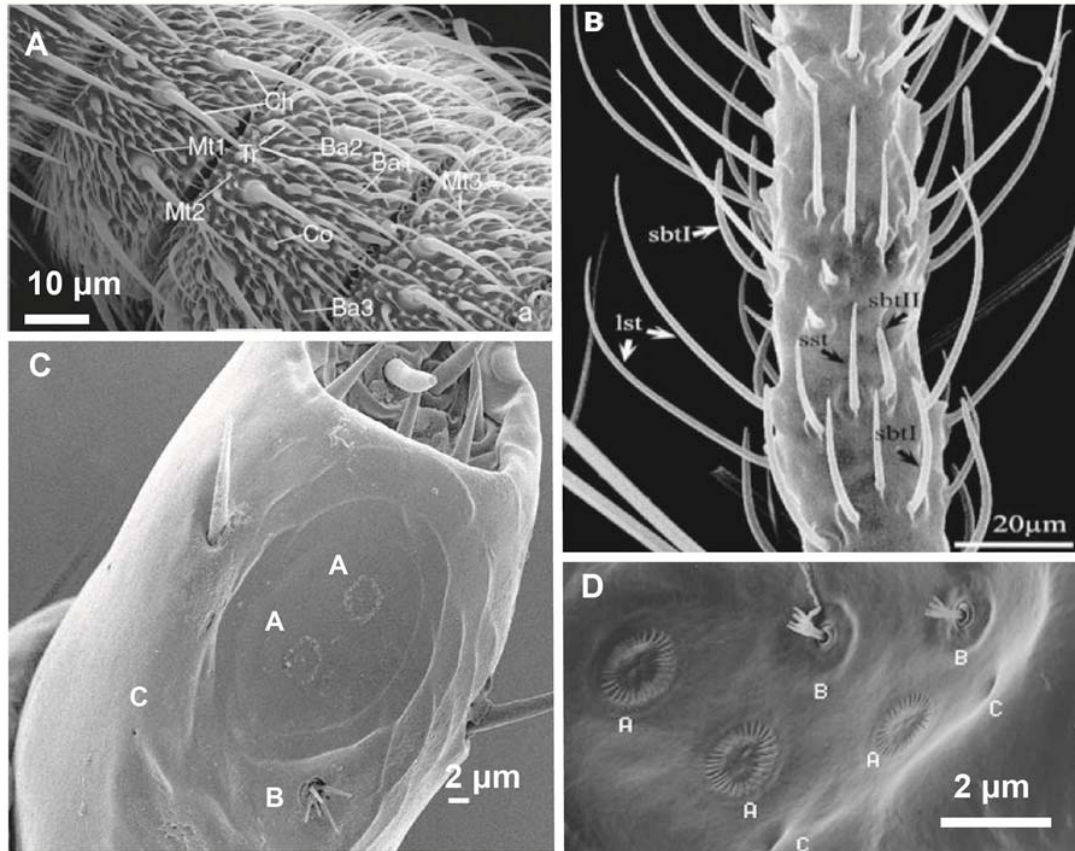


Figura 11. (A) Sensilias de la antena de la mosca plaga de las gírgolas, *Coboldia fuscipes*. (Mt= microtriquia, Ba= basicónica, Co= celocónica, Ch= quética) (Zhang et al. 2015). (B) Cuatro subtipos de sensilias olfativas tricoides de la antena de *Aedes aegypti* (Ghaninia et al. 2008). (C) Órganos del poro, órgano del penacho y poro de *Pediculus humanus capitis*. (D) Órganos del poro, órganos del penacho y poro del piojo masticador del ganado, *Damalinia martingalia* (Soler Cruz y Martín Mateo, 1998). A= órgano del poro, B= órgano del penacho, C= poro.

Por otro lado, si bien el conocimiento de la biología de los insectos hematófagos ha avanzado enormemente en los últimos años, en particular en el campo de la genética y molecular, muchas preguntas quedan por responder para terminar de entender como éstos interactúan con sus hospedadores y de

esta manera desarrollar herramientas para evitar la expansión de las enfermedades que propagan en el mundo entero. Uno de los pasos clave consiste en asignar a las estructuras sensoriales ya conocidas y los genes neurosensoriales asociados su función específica, ya sea de manera directa sobre el insecto o mediante su expresión en sistemas heterólogos sometiéndolos a un panel de moléculas y combinación de moléculas ecológicamente relevantes.

Tabla 1. Cuadro comparativo de estructuras sensoriales, genes neurosensoriales y comportamiento asociado al hospedador en los principales insectos hematófagos que afectan al humano.

| | <i>Pediculus humanus Capitis</i> | <i>Cimex lectularius</i> | <i>Rhodnius prolixus</i> | <i>Aedes aegypti</i> | <i>Lutzomya longipalpis</i> |
|-------------------------------------|---|---|--|---|---|
| IMPORTANCIA MÉDICA SANITARIA | Pediculosis | No se conoce | Vector de Mal de Chagas | Vector de dengue, Zika y chikungunya | Vector de Leishmaniasis |
| CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA | O: Phthiraptera sO: Anoplura F: Pediculidae | O: Hemiptera sO: Heteroptera F: Cimicidae | O: Hemiptera sO: Heteroptera F: Reduviidae | O: Diptera sO: Nematocera F: Culicidae | O: Diptera sO: Nematocera F: Psychodidae |
| TAMAÑO CORPORAL ADULTO | 2-3 mm | 5 mm | 34 mm | 7 mm | 3 mm |
| ANTENA | ESCAPO, PEDICELO, 1 FLAGELO: 3 flagelómeros. No hay dimorfismo sexual | ESCAPO, PEDICELO, 1 FLAGELO: 2 flagelómeros. No hay dimorfismo sexual | ESCAPO, PEDICELO, 1 FLAGELO: 2 flagelómeros. No hay dimorfismo sexual. | ESCAPO, PEDICELO, 1 FLAGELO: 13 flagelómeros. Dimorfismo sexual | ESCAPO, PEDICELO, 1 FLAGELO: 13 flagelómeros. Dimorfismo sexual |

| | | | | | |
|--|---|--|---|--|---|
| TIPO DE SENSILIAS ANTENALES Y SU FUNCIÓN (APROXIMACIÓN MORFOLÓGICA) | 10 clavijas: 8 R olfativos y 2 gustativos; 2 órganos del poro: R termo-olfativos; 2 órganos del penacho: termo-higroR; 1 poro: termoR; 22 cerdas: mecanoR | 9 clavijas estriadas: R olfativos; 6 clavijas lisas: R olfativos; 29 tricoideas: R olfativos | 16 tipos de sensilias; 8 tipos de mecanoR, 1 tipo de sensilia gustativa; 5 tipos de sensilias olfativas; 1 tipo de celocónica: termo-higroR; órgano cueva: termoR | 112 caéticas: mecanoR; 573 tricoideas: R olfativos; 6 celocónicas: R olfativos y de temperatura; 9 ampulaceas: termoR; 105 clavijas estriadas: R olfativos | Tricoideas: mecanoR; celocónicas: termoR; campaniformes: propioR; caéticas: R olfativos |
| NÚMERO TOTAL DE SENSILIAS EN LA ANTENA* | Aproximadamente 37 | Alrededor de 200 | Más de 200 | Aproximadamente 800 | Cientos |
| LÓBULO ANTENAL | 8 glomérulos, sin dimorfismo sexual | No se conoce aún | 22 glomérulos sin dimorfismo sexual | 50 glomérulos en hembras; 51 glomérulos en machos | No se conoce aún |
| GENES NEUROSENSORIALES TOTALES * | 10 ORs; 6 GRs; 5 OBPs; 7 CSPs | 48 ORs; 11 OBPs; 30 IRs; 24 GRs; 14 CSPs | 116 ORs; 33 IRs GRs: 28; OBPs: 27; CSPs: 19; TRPs: 9 | 131 ORs; 40 IRs; 63 OBPs; 79 GRs | 75 ORs; 20 IRs; 44 GRs; 2 TRPs |
| OTROS ÓRGANOS SENSORIALES CANDIDATOS A EVALUAR AL H | Aparato bucal: mecanoR?; Patatas: mecanoR? | R. olfativos y gustativos en el rostro. Pelos gustativos en la tibia de las patas. | Rostro: mecanoR Patatas: mecanoR No se documentaron otro tipo de receptores hasta la fecha | R gustativos en la labela. R térmicos y olfativos en los palpos maxilares. R gustativos en los tarsos. | R gustativos en la labela. R olfativos en los palpos maxilares. Patatas: ¿? |

| | | | | | |
|--|---|---|---|---|---|
| INTERACCIÓN CON EL HOSPEDADOR (H) | <p>Hematófago obligado específico</p> <p>Todos los estadios se alimentan y viven sobre el H</p> <p>Vive en el H</p> <p>No hay búsqueda activa del H</p> <p>Diurno? Crepuscular? Nocturno?</p> | <p>Hematófago obligado</p> <p>Todos los estadios se alimentan del H</p> <p>Se alimenta de distintos vertebrados pero antropofílico</p> <p>Vive cerca del H</p> <p>Búsqueda activa a corta distancia</p> <p>Crepuscular/Nocturno</p> | <p>Hematófago obligado</p> <p>Todos los estadios se alimentan del H</p> <p>Se alimenta de distintos vertebrados</p> <p>Hábitat selvático y doméstico</p> <p>Búsqueda activa del H</p> <p>Crepuscular/Nocturno</p> | <p>Hematófago facultativo</p> <p>Solo las hembras se alimentan del H</p> <p>Antropofílico</p> <p>Vive en el peridomicilio</p> <p>Búsqueda activa del H</p> <p>Crepuscular</p> | <p>Hematófago facultativo</p> <p>Solo las hembras se alimentan del H</p> <p>Se alimenta de distintos vertebrados</p> <p>Hábitat forestal y peridomicilio</p> <p>Búsqueda activa del H</p> <p>Nocturno</p> |
| REFERENCIAS | <p>VectorBase; Wigglesworth 1941; Slifer y Sekhon 1980; Steinbrecht 1994; Heukelbach 2001; Kirkness et al. 2010; Observaciones personales</p> | <p>VectorBase; Steinbrecht and Muller 1976; Naresh Singh et al. 1996; Harraca et al. 2009; Harraca et al. 2012; Mendki et al. 2013; Salazar et al. 2015; Benoit et al. 2016</p> | <p>VectorBase; Atlas of Chagas disease vectors in America, Vol I, III; Barrozo et al. 2009; Pontes et al. 2014; Barrozo et al. 2017</p> | <p>VectorBase; Ignell et al. 2005; Bohbot et al. 2007; McIver 1982; Ghaninia et al. 2007; Slifer 1962</p> | <p>VectorBase; Freitas Fernandes et al. 2008; Spiegel et al. 2005</p> |

*No necesariamente todos están involucrados en la detección del H

Abreviaturas:

R: receptor

H: hospedador

Ors: Receptores olfativos

OBPs: Proteínas de unión odorante

Grs: Receptores gustativos

CSPs: proteínas quimiosensoriales

TRPs: proteína de potencial receptor transitorio

IRs: Receptores ionotrópicos

CONCLUSIONES FINALES

El piojo de la cabeza es un insecto único en términos de cómo se relaciona con su hospedador. El pelo, la piel y la sangre de la cabeza del humano son los sustratos donde los huevos eclosionan y las ninfas y adultos caminan, se alimentan, se aparean y oviponen durante toda su vida. Si un piojo cae de su hospedador o es removido, no tiene los recursos necesarios para moverse activamente hacia su hospedador original o a uno nuevo. Sus patas no están especializadas para saltar (como una pulga) o volar (como un mosquito) o caminar sobre superficies que no sean pelos humanos, por lo tanto el piojo es lento y torpe sobre el piso u otra superficie lisa. Su estrategia es una búsqueda pasiva donde espera reconocer la llegada de un nuevo hospedador y así acceder a su cabeza. Este es el contexto de transmisión resumido de un piojo de la cabeza y es el mismo contexto que probablemente haya modelado y seleccionado la batería sensorial del insecto en términos de maximizar su supervivencia y éxito reproductivo. Debido a este especial tipo de transmisión, uno tendería a pensar a priori que las estructuras sensoriales para detectar al hospedador estarían reducidas.

Los resultados de esta tesis comprueban dicha hipótesis, encontrando escasas sensillas distribuidas en las antenas del piojo. La morfología del lóbulo antenal del cerebro del piojo, encargado de recibir la información que entra a través de las antenas, también fue simple en nuestros resultados experimentales, presentando pocas unidades funcionales (los glomérulos). Sin embargo, el piojo demostró ser sensible a estímulos asociados al hospedador como los olores del cuero cabelludo, la humedad y el calor en arenas de doble elección bajo condiciones ambientales controladas. Los piojos se arrestaron y desplegaron comportamientos asociados al momento de alimentación en

presencia de olores del cuero cabelludo. Cuando se les presentó superficies húmedas, los piojos mostraron una respuesta aversiva y cuando se les presentó un sustrato estabilizado a la temperatura de la piel del hospedador, los piojos la prefirieron y su actividad locomotora aumentó. Las respuestas fueron conspicuas y poco variables en piojos intactos pero se perdieron cuando el tercer flagelómero de ambas antenas estaba ausente. Dicho segmento presentó la mayor diversidad de estructuras sensoriales incluyendo quimiorreceptores olfativos, de contacto o gustativos, termo-higroreceptores y mecanorreceptores (función estimada en base su morfología). Cuando se evaluó la alimentación de piojos antenectomizados, éstos se alimentaron en igual proporción que aquellos con antenas intactas. La búsqueda de estructuras sensoriales en otros órganos del cuerpo del piojo no demostró (morfológicamente) más que estructuras mecanorreceptoras. No obstante, no descartamos que éstas u otro tipo de sensilias en otras zonas del cuerpo del piojo cumplan la función de, adicionalmente a la antena, detectar al hospedador.

En el tramo final de esta tesis, también mostramos un trabajo comparativo de la carga sensorial involucrada en la interacción con el hospedador de insectos hematófagos de importancia médica y sanitaria. En general, se observó un aumento en la complejidad sensorial que incluyó número y tipo de sensilias, número de glomérulos, sensilias en otros órganos del cuerpo, número y tipo de genes neurosensoriales, etc. que fue desde los piojos, pasando por la chinche de cama y triatominos hasta llegar al máximo en el mosquito y el flebótomo. Dicho gradiente correlacionó positivamente con la distancia que tiene que recorrer el insecto para encontrar al hospedador y también se observó una

correlación con el hábito alimentario, siendo los hematófagos obligados los menos complejos en términos sensoriales.

La mayoría de los estudios fisiológicos y comportamentales en piojos humanos, se realizaron en el piojo del cuerpo por su importancia como vector de una de las epidemias más importantes del siglo XX. En la actualidad, si bien el piojo de la cabeza no representa una enfermedad tan grave como es el tifus, su presencia constituye una problemática mundial principalmente en niños de edad escolar. No obstante, es poco estudiado en términos de su interacción con su hospedador en gran medida por la dificultad para obtener ejemplares y asegurar su supervivencia fuera de la cabeza del hospedador. Sin embargo, sobrellevando estas desventajas, los piojos mostraron poca variabilidad en las respuestas comportamentales a los estímulos cuando se estandarizaron las condiciones ambientales adecuadas y tienen la potencialidad de ser un modelo óptimo para estudios futuros de abordaje fisiológico debido a la reducción sensorial observada en esta tesis. El conocimiento de las funciones de las estructuras sensoriales y las señales que éstas detectarían en el contexto de la interacción piojo-hospedador son el punto clave para buscar métodos alternativos de control para evitar la infestación y reinfestación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbot, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J.Econ.Entomol.* 18:265-267.

Altner, H., & Loftus, R. (1985). Ultrastructure and function of insect thermo- and hygroreceptors. *Annual review of entomology*, 30(1), 273-295.

Alzogaray, R.A., Fontán, A., Zerba, E.N., 1997. Evaluation of hyperactivity produced by pyrethroid treatment on third instar nymphs of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 35:323-333.

Alzogaray, R.A., Zerba, E.N., 2001. Third instar nymphs of *Rhodnius prolixus* exposed to α -cyanopyrethroids: From hyperactivity to death. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 46:119-126.

Arya, S., Singh, S.K., 2012. Antennal sensilla of head of poultry shaft louse, *Menopon gallinae* (Phthiraptera, Amblycera, Menoponidae). *Journal of Applied and Natural Science*, 4, 196-199.

Atlas of Chagas disease vectors in America, Vol I y III. Editora FioCruz, 1997.

Azar, D. y Nel, A., 2012. Evolution of hematophagy in “non-biting midges” (Diptera: Chironomidae). *Terrestrial Arthropod Reviews* 5, 1.

Baatrup, E., Bayley, M., 1992. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on the locomotor activity of the wolf spider *Pardosa amentata*: quantitative analysis employing computer-automated video tracking. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 26:138-152.

Bacot, A.W., 1917. The louse problem. *Proceedings of the Royal Society of Medicine. Section of epidemiology and state medicine.*

Baker, G.T. and Chandrapatya, A. (1992). Sensilla on the mouthparts and antennae of the elephant louse, *Haematomyzus elephantispiaget* (Phthiraptera: Haematomyzidae) *J. Morph.* 214, 333-340. doi: <https://doi.org/10.1002/jmor.1052140308>

Barrozo, R.B., Manrique, G., Lazzari, C.R., 2003. The role of water vapour in the orientation behaviour of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J.Ins. Phys.* 49:315-321.

- Barrozo, R.B., Couton, L., Lazzari, C.R., Insausti, T.C., Minoli, S., Fresquet, N., Rospars, J.P., Anton, S. (2009). Antennal pathways in the central nervous system of a blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Arthropod Struct. Dev.* 38, 101-110.
- Barrozo, R.B., Reisenman, C.E., Guerenstein, P., Lazzari, C.R. and Lorenzo, M. (2017). An inside look at the sensory biology of triatomines. 97, 3-17. *J. Insect Physiol.* 97, 3-19.
- Bar-Zeev, M., 1960. The location of hygroreceptors and moisture receptors of *Aedes aegypti*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 3, 251-256.
- Baumslag, 2005. Murderous medicine: Nazi doctors, human experimentation, and Typhus. Praeger Publishers. Westport, Connecticut, USA.
- Bechah, Y., Capo, C., Mege, J. L., & Raoult, D. (2008). Epidemic typhus. *The Lancet infectious diseases*, 8(7), 417-426.
- Bell, W.J. 1990. Searching behaviour patterns in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 35, 447-467.
- Benoit, M., Bruneau P., Meinard, C., 1985. Comparative activity of tralomethrin and deltamethrin on *Periplaneta americana*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 26: 284-291.
- Benoit, J.B., Adelman, Z.N., Reinhardt, K., 2016. Unique features of a global human ectoparasite identified through sequencing of the bed bug genome. *Nature communications*
- Benton, R., 2017. The neurobiology of gustation in insect disease vectors: progress and potential. *Curr Opin Insect Sci* 20:19-27.
- Berger, D., Walters, R., Gotthard, K., 2008. What limits insect fecundity? Body size- and temperature-dependent egg maturation and oviposition in a butterfly. *Funct Ecol.* 22, 523-529.
- Bernard, J. (1974). Étude électrophysiologique de récepteurs impliqués dans l'orientation vers l'hôte et dans l'acte hématophage chez un Hémiptère: *Triatoma infestans*. Ph.D. Thesis. University of Rennes, France.
- Bohbot, J., Pitts, R.J., Kwon, H.W., Rutzel, M., Robertson, H.M., Zwiebel, L.J., 2007. Molecular characterization of the *Aedes aegypti* odorant receptor gene family. *Insect Molecular Biology*, 16, 525-537.

- Bohbot, J., Sparks, J. T., Dickens, J.C. , 2014. The maxillary palp of *Aedes aegypti*, a model of multisensory integration. *Insect biochemistry and molecular biology*, 48, 29-39.
- Bruyne, M., Warr, C.G., 2005. Molecular and cellular organization of insect chemosensory neurons. *Bioessays*, 28, 23-34.
- Burgess, I. F., Brown, C. M., Peock, S., & Kaufman, J. (1995). Head lice resistant to pyrethroid insecticides in Britain. *BMJ: British Medical Journal*, 311(7007), 752.
- Burgess, I. F. (2004). Human lice and their control. *Annual Review of Entomology*, 49.
- Burgess, I. F. (2009). The mode of action of dimeticone 4% lotion against head lice, *Pediculus capitis*. *BMC pharmacology*, 9(1), 3.
- Burkhart, C. N., & Burkhart, C. G. (2005). Head lice: scientific assessment of the nit sheath with clinical ramifications and therapeutic options. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(1), 129-133.
- Buxton, P.A., 1946. The louse: an account of the lice which infest man, their medical importance and control. Edward Arnold & Co., London, UK.
- Canyon, D.V, Speare, R., Muller R., 2002. Spatial and kinetic factors for the transfer of head lice (*Pediculus capitis*) between hairs. *J. Invest. Dermatol.* 119:629-631.
- Carrol, J.F, Klun, J.A., and E.T. Schmidtman. 1995. Evidence for kairomonal influence on selection of host-ambushing sites by adult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 32, 119-125.
- Catalá, S. y Schofield, C. (1994). Antennal sensilla of *Rhodnius*. *J. Morphol.* 219, 193-203.
- Chapman, R.F., 1982. Chemoreception: the significance of receptor numbers. *Advances in insect physiology*, 16, 247-356.
- Chapman, R.F., 1988. Sensory aspects of host-plant recognition by Acridoidea: questions associated with the multiplicity of receptors and variability of response. *Journal of Insect physiology*, 34, 167-174.
- Chapman, R. F. (2003). Contact chemoreception in feeding by phytophagous insects. *Annual review of entomology*, 48(1), 455-484.

Couton, L., Minoli, S., Kiêu, K., Anton, S., y Rospars, J. P. (2009). Constancy and variability of identified glomeruli in antennal lobes: Computational approach in *Spodoptera littoralis*. *Cell Tissue Res.* 337, 491–511. doi: 10.1007/s00441-009-0831-9.

Crespo, J. G., and Vickers, N.J. (2012). Antennal lobe organization in the slender pigeon louse, *Columbicola columbae* (Phthiraptera: Ischnocera). *Arthropod Struct. Dev.* 41, 227-230.

Crespo, J. G., and N.J. Vickers. 2012. Antennal lobe organization in the slender pigeon louse, *Columbicola columbae* (Phthiraptera: Ischnocera). *Arthropod Struct. Dev.* 41, 227-230.

Debboun, M., Frances, S.P., Strickman, D., 2007. Insect repellents: Principles, methods, and uses. CRC Press. Taylor & Francis Group.

Downing, D.T. 1992. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J. Lip. Res.* 33, 301-313.

Feir, D., Lengy, JI, Owen, WB, 1961. Contact chemoreception in the mosquito, *Culiseta inornata*; sensitivity of the tarsi and labella to sucrose and glucose. *Jour Insect Physiol.* 6, 13-20.

Fernando de Freitas Fernandes, Ana Cristina Bahia-Nascimento, Luciana Conceição Pinto, Cynthia de Sousa Leal, Nágila Francinete Costa Secundino, Paulo Filemon Paolucci Pimenta; Fine Structure and Distribution Pattern of Antennal Sensilla of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) Sand Flies , *Journal of Medical Entomology*, Volume 45, Issue 6, 1 November 2008, Pages 982–990

Friend, W.G., J.J.B., Smith, 1977. Factors affecting feeding by bloodsucking insects. *Annual Review of Entomology*, 22, 303-331.

Flores, G.B. and Lazzari, C.R., 1996. The role of the antennae of *Triatoma infestans*: orientation towards thermal sources. *J. Ins. Phys.* 42:433-440.

Gallardo, A., Mougabure-Cueto, G.A., Picollo, M.I., 2009. *Pediculus humanus capitis* (head lice) and *Pediculus humanus humanus* (body lice): response to laboratory temperature and humidity and susceptibility to monoterpenoids. *Parasitol. Res.* 105:163-167.

- Gammon, D.W., 1978. Neural effects of allethrin on the free walking cockroach *Periplaneta americana*: an investigation using defined doses at 15 and 32°C. *Pestic. Sci.* 9: 79-91.
- Galassi, F.G., Fronza, G., Toloza, A.C., Picollo, M.I. y Gonzalez Audino, P.(2018), Response of *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) to volatiles of whole and individual components of the human scalp. *J.Med. Entomol.* 55, 527-533.
- Galizia, C. G., McIlwrath, S. L., y Menzel, R. (1999). A digital three-dimensional atlas of the honeybee antennal lobe based on optical sections acquired by confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 295, 383–94.
- Ghaninia, M., Hansson, B.S. & Ignell, R. 2007. The antennal lobe of African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: innervation and three-dimensional reconstruction. *Arthropod Structure and Development* 36, 23-39. III.
- Ghaninia, M., Ignell, R. & Hansson B.S. 2007. Functional classification and central nervous projections of olfactory receptor neurons housed in antennal trichoid sensilla of female yellow fever mosquitoes, *Aedes aegypti*. *European Journal of Neuroscience* doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05786.x.
- Ghaninia, M, Mattias Larsson, Bill S. Hansson, Rickard Ignell, 2008. Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. *Journal of Experimental Biology* 2008 211: 3020-3027; doi: 10.1242/jeb.016360
- Gross, L. (1996). How Charles Nicolle of the Pasteur Institute discovered that epidemic typhus is transmitted by lice: reminiscences from my years at the Pasteur Institute in Paris. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10539.
- Guarneri, A. A., Lazzari, C., Diotaiuti, L., y Lorenzo, M. (2002). The effect of relative humidity on the behaviour and development of *Triatoma brasiliensis*. *Physiol. Entomol.* 27, 142–147.
- Georghiou, G.P., 1972. The evolution of resistance to pesticides. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 38:133-168.

Guidobaldi, F., May-Concha, I.J., and P.G. Guerenstein. 2014. Morphology and physiology of the olfactory system of blood-feeding insects. *J. Physiol.* 108 (2-3), 96-111.

Grasswitz, T.R. 1998. Contact kairomones mediating the foraging behaviour of the aphid hyperparasitoid *Alloxysta victrix* (Westwood) (Hymenoptera: Charipidae). *J. Ins. Behav.* 11, 539-548.

Hadley, N.F. (1994). *Water Relations of Terrestrial Arthropods*, Academic Press, San Diego.

Harraca, V., Rickard Ignell, Christer Löfstedt, Camilla Ryne; Characterization of the Antennal Olfactory System of the Bed Bug (*Cimex lectularius*), *Chemical Senses*, Volume 35, Issue 3, 1 March 2010, Pages 195–204.

Harraca V., C. Ryne, G. Birgersson, R. Ignell, 2012. Smelling your way to food: can bed bugs use our odours? *Journal of Experimental Biology* 2012 215: 623-629; doi: 10.1242/jeb.065748

Hase, A., 1915. Beiträge zu einer Biologie der Kleiderlaus (*Pediculus corporis* de Geer= *vestimenti* Nitzsch.) *Z. angew.Ent.*, 2, 265-359.

Haynes, K.F., 1988. Sublethal effects of insecticides on the behavioral responses of insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 33:149-168.

Hatsushika R, S Naramoto, K Miyoshi, 1983. Scanning electron microscope studies on head louse, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae), *Kawasaki Med J.*

Heukelbach, J., 2010. Epidemiology pp.34-41. Management and control of head lice infestations. UNI-MED, London.

Ignell, R., Dekker, T., Ghaninia, M. and Hansson, B. S. (2005), Neuronal architecture of the mosquito deutocerebrum. *J. Comp. Neurol.*, 493: 207-240.

Ignell, 2017. Insect Chemical Ecology Course, Penn State, Pensilvania, USA.

Keil, T. A. (1997). Functional morphology of insect mechanoreceptors. *Microscopy research and technique*, 39(6), 506-531.

- Keil, T.(1999).Morphology and Development of the peripheral olfactory organs. Insect Olfaction, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Keilin, D.y Nuttall, G.H.F. (1930). Iconographic studies of *Pediculus humanus*. Parasitol. 22, 1-10.
- Kennedy, J.S. 1978. The concepts of olfactory “arrestment” and “attraction”. Physiol. Entomol. 3, 91-98.
- Kittler, R., Kayser, M., and M. Stoneking. 2003. Molecular evolution of *Pediculus humanus* and the origin of clothing. Curr. Biol. 13, 1414-1417.
- Kirkness, E.F., Haaas, B.J., Sun, W., Braig, H.R., Perotti, M.A., Clark, et al. (2010). Genome sequences of the human body louse and its primary endosymbiont provide insights into the permanent parasitic lifestyle. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 12168-12173.
- Kristoffersen, L., Hansson, B.S., Anderbrant, O. and Larsson, M.C. (2008). Agglomerular hemipteran antennal lobes- basic neuroanatomy of a small nose.Chem.Senses. 33, 771-778.
- Kollman, M., Schmidt, R., Heuer, C.M., Schachtner, J. (2016). Variations on a theme: Antennal lobe architecture across Coleoptera. PLoS ONE 11(12): e0166253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166253>
- Laissue, P. P., Reiter, C., Hiesinger, P. R., Halter, S., Fischbach, K. F., and Stocker, R. F. (1999).Three-dimensional reconstruction of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*.J.Comp. Neurol. 405, 543–52.
- Lazzari, C. R. (2009). Orientation towards hosts in haematophagous insects: an integrative perspective. 1st ed. Elsevier Ltd. doi:10.1016/S0065-2806(09)37001-0.
- Litchfield, J.T., and F.Wilcoxon, 1949.A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J.Exp.Ther. 96:99-110.
- Lee,RMKW, Craig, DA, 2009. Fine structure of the sense organs on the labella and labium of the mosquito *Aedes aegypti*.The open entomology journal 3, 7-17.
- Lehane, M.J., 1991. Biology of blood-sucking insects. Harper Collins Academic, London.

- Li W, Ortiz G, Fournier P-E, Gimenez G, Reed DL, Pittendrigh B, et al. (2010) Genotyping of Human Lice Suggests Multiple Emergences of Body Lice from Local Head Louse Populations. PLoS Negl Trop Dis 4(3): e641. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000641>
- Light, J.E., Toups, M.A., Reed, D.L., 2008. What's in a name: The taxonomic status of human head and body lice. Molecular Phylogenetics and Evolution, 47, 1203-1216
- Matthews, R.W. and Matthews, J.R., 1978. Spatial adjustment pp. 72-109. In John Wiley and sons (eds.), Insect behavior. Wiley.
- Matthews, R.W. and Matthews, J.R., 2009. Programming and integrating behavior. In John Wiley and sons (eds.), Insect behavior. Wiley.
- Mclver, S.B. (1982). Sensilla of mosquitoes (Diptera: Culicidae). J. Med. Entomol. 19, 489-535.
- Mclver, S.B. and Siemicki, R. (1985). Fine structure of antennal/putative thermo/hygrosensilla of adult *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). J. Morphol. 183, 15-23.
- Mclver, S.B. (1987). Sensilla of haematophagous insects sensitive to vertebrate host-associated stimuli. Insect Sci. Applic. 8, 627-635.
- Mendki, M. J., Prakash, S., Parashar, B. D. and Agarwal, O. P. (2013), Distribution of sensilla on antenna and rostrum in nymphs and adults of *Cimex hemipterus* Fabricius (Hemiptera, Cimicidae). Dtsch. Entomol. Z., 60: 213-219.
- Miller, J.F. (1969). Antennal tuft organs of *Pediculus humanus* Linn. and *Phthirus pubis* (Linn.) (Anoplura: Pediculidae). J. New York Entomol. Soc. 77, 85-89.
- Miller, FH, 1970. Scanning electron microscopy of the antennal structures of *Polyplox serrata* (Burmeister) (Anoplura, Hoplopleuridae). Journal of the New York Entomological Society 78, 33-37.
- Miller, T.A., Adams, M.E., 1982. Mode of action of pyrethroids pp. 3-27. In: Coats JR (eds). Insecticide Mode of action. New York: Academic Press.
- Mougabure-Cueto, G.A., Picollo, M.I., Lazzari, C.R., 2011. Human lice show photopositive behaviour to white light. J. Ins. Phys. 57:1450-1452

- Mumcuoglu, K.Y., Galun, R., and R. Ikan. 1986. The aggregation response of human body louse (*Pediculus humanus*) (Insecta, Anoplura) to its excretory products. *Insect Sci. Appl.* 7, 629-632.
- Mumcuoglu, K.Y., Gilead, L., Ingber, A. (2009). New insights in pediculosis and scabies. *Expert Rev. Dermatol.* 4(3), 285–302
- Naresh Singh R, Kusum Singh, Shri Prakash, M.J. Mendki, K.M. Rao, 1996. Sensory organs on the body parts of the bed-bug *Cimex hemipterus fabricius* (Hemiptera : Cimicidae) and the anatomy of its central nervous system, *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, Volume 25, Issues 1–2,
- Nuttall, G.H.F., 1917. The biology of *Pediculus humanus*. *Parasitology*, 10, pp 80-185.
- Nuttall, G.H.F. (1919). The biology of *Pediculus humanus*. *Parasitology* 11, 201-220.
- Olds, B.P., Coates, B.S., Steele, B.D., Sun, W., Agunbiade, T.A., Yoon, K.S., et al. (2012). Comparison of the transcriptional profiles of head and body lice. *Insect Mol. Biol.* 21,257-268.
- Olson J.F., R.D. Moon, S.A. Kells, 2009. Off-host aggregation behavior and sensory basis of arrestment by *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae), *Journal of Insect Physiology*, Volume 55, Issue 6, Pages 580-587
- Ortega-Insaurrealde, I., Toloza, A.C., Gonzalez-Audino, P., Mougabure-Cueto, G.A., Alvarez-Costa, A., Roca-Acevedo, G., and M.I. Picollo. 2015. Effect of environmental conditions and toxic compounds on the locomotor activity of *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 52, 1036-1042.
- Ortega Insaurrealde, I., Toloza, A.C., Gonzalez Audino, P. and Picollo, M.I. (2017). Arrestant effect of human scalp components in *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) behavior. *J. Med. Entomol.* 54, 258-263.
- Otalora-Luna F., Perez Sanchez, A.J., Sandoval, C., Aldana, E., 2013. La evolución del hábito hematofágico de los triatominos. *Revista Chilena de Historia Natural*, 8, 4.
- Peacock, L. (1918). The Structure of the Mouthparts and Mechanism of Feeding in *Pediculus humanus*. *Parasitology*, 11(1), 98-117. doi:10.1017/S0031182000004121
- Pelletier, J., Xu, P., Yoon, K.S., Clark, J.M., and W.S. Leal. 2015. Odorant receptor-based discovery of natural repellents of human lice. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 66, 103-109.

Picollo, M.I., Vassena, C.V., Casadio A.A., Massimo, J., Zerba, E.N., 1998. Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura; Pediculidae). J. Med. Entomol. 35 (5): 814-817.

Pontes, G., Minoli, S., Insaurrealde, I. O., de Brito Sanchez, M. G., & Barrozo, R. B. (2014). Bitter stimuli modulates the feeding decision of a blood-sucking insect via two sensory inputs. *Journal of Experimental Biology*, jeb-107722.

Rakshpal, R. 1959. On the behaviour of pigeon louse, *Columbicola columbae* Linn.(Mallophaga). Parasitology 49, 232-241.

Rebora, M., Dell Otto, A., Rybak, J., Piersanti, S., Gaino, E. and Hansson, B. (2013). The antennal lobe of *Libellula depressa* (Odonata, Libellulidae). Zool. 116, 205-214.

Reed D.L., Smith V.S., Hammond S.L., Rogers A.R., and D.H. Clayton. 2004. Genetic analysis of lice supports direct contact between modern and archaic humans. PLoS Biol 2(11): e340. doi:10.1371/journal.pbio.0020340

Roth, L.M., (1951). Loci of sensory end-organs used by mosquitoes (*Aedes aegypti*) and *Anopheles quadrimaculatus* in receiving host stimuli. Annals of entomological society.

Rozsa, L., and P. Apari. 2012. Why infest the loved ones-inherent human behaviour indicates former mutualism with head lice. Parasitology 139 (6), 696-700.

Rowley, M., and Hanson, F. (2007).Humidity detection and hygropreference behavior in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.J.Insect Sci. 7, 1536–2442. doi:10.1673/031.007.3901.

Salazar, R., Castillo-Neyra, R., Tustin, A. W., Borrini-Mayorí, K., Náquira, C., & Levy, M. Z. (2015). Bed bugs (*Cimex lectularius*) as vectors of *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 92(2), 331-335.

Schneider, D.,1964. Insect antennae.Annu. Rev. Entomol. 9, 103-122.

Sfara, V., Mougabure-cueto, G.A., Zerba, E.N., Alzogaray, R.A., 2013. Locomotor behaviour of *Blattella germanica* modified by DEET. PLoS ONE 8:e83433.

Shaw, D.J, and A.P. Dobson. 1995. Patterns of macroparasite abundance and aggregation in wildlife populations: a quantitative review. Parasitology 111, 111-127.

Slifer, E. H., & Sekhon, S. S. (1962). The fine structure of the sense organs on the antennal flagellum of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus). *Journal of morphology*, 111(1), 49-67.

Slifer, E. and Sekhon, S.S. (1980). Sense organs on the antennal flagellum of the human louse, *Pediculus humanus* (Anoplura). *J.Morphol.* 164, 161-166.

Soler Cruz, M.D. and Martín Mateo, M.P. (1998). Sensory equipment of the antennal flagellum of several species of Damalinia (Phthiraptera: Trichodectidae). *Micron*. 29, 431-438.

Soler Cruz, M.D. and Martin Mateo, M.P. (2009). Scanning electron microscopy of legs of two species of sucking louse (Anoplura: Phthiraptera). *Micron* 40, 401-408.

Sparks, J. T., Vinyard, B. T., & Dickens, J. C. (2013). Gustatory receptor expression in the labella and tarsi of *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(12), 1161-1171.

Speare, R., Thomas, G., Cahill, C., 2002. Head lice are not found on floors in primary school classrooms. *Aust NZ J Public Health*. 26:208-211

Spiegel, C. N., Oliveira, S. M., Brazil, R. P., & Soares, M. J. (2005). Structure and distribution of sensilla on maxillary palps and labella of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies. *Microscopy research and technique*, 66(6), 321-330.

Spiegel, C. N., Oliveira, S. M., Brazil, R. P., & Soares, M. J. (2005). Structure and distribution of sensilla on maxillary palps and labella of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sand flies. *Microscopy research and technique*, 66(6), 321-330.

Steinbrecht, R.A. and Muller, B. (1976). Fine structure of the antennal receptors of the bed bug, *Cimex lectularis* L. *Tissue Cell* 8, 615-636.

Steinbrecht, R. A., & Müller, B. (1991). The thermo-/hygrosensitive sensilla of the silkworm, *Bombyx mori*: morphological changes after dry-and moist-adaptation. *Cell and Tissue Research*, 266(3), 441-456.

Steinbrecht, R.A. (1994). The tuft organs of the human body louse *Pediculus humanus corporis* – Cryofixation study of a thermo-hygrosensitive sensillum. *Tissue Cell* 26, 259-275.

Takano-Lee, M., Yoon, K. S., Edman, J. D., Mullens, B. A., & Clark, J. M. (2003). In vivo and in vitro rearing of *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of medical entomology*, 40(5), 628-635.

Takken, W., and Verhulst, N. O. (2013). Host Preferences of Blood-Feeding Mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 433–453. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153618.

Ubelaker, J.E., Payne, E., Allison, V.F. and Moore, D. V. (1973). Scanning electron microscopy of the human pubic louse, *Phthirus pubis* (Linnaeus, 1758). *J. Parasitol.* 59, 913-919.

Tolozza, A.C., Zyglado, J., Mougabure Cueto, G., Biurrun, F., Zerba, E. and Picollo, M.I. (2006). Fumigant and repellent properties of essential oils and component compounds against permethrin-resistant *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) from Argentina. *J. Med. Entomol.* 43, 889-895.

Tovar-Corona, J. M., Castillo-Morales, A., Chen, L., Olds, B.P., Clark, J.M., Reynolds, S.E. et al. (2015). Alternative splice in alternative lice. *Mol.Biol.Evol.* 32, 2749-2759.

Ubelaker, J. E., Payne, E., Allison, V. F., & Moore, D. V. (1973). Scanning electron microscopy of the human pubic louse, *Phthirus pubis* (Linnaeus, 1758). *The Journal of parasitology*, 913-919.

Vassena, C. V., Mougabure-Cueto, G.A., González-Audino, P., Alzoragay, R.A., Zerba, E. N., Picollo, M.I., 2003. Prevalence and levels of permethrin resistance in *Pediculus humanus capitis* De Geer (Anoplura: Pediculidae) from Buenos Aires, Argentina. *J. Med. Entomol.* 40 (4): 447-450.

Veracx, A. and Raoult, D. (2012). Biology and genetics of human head and body lice. *Trends Parasitol.* 28, 563-571.

Verhulst, N.O., Qui, Y.T., Beijleveld, H., Maliepaard, C.A., Knights, D., Schulz, S., Berg-Lyons, D., Lauber, C.L., Verduijn, W., Haasnoot, G.W., Mumm, R., Bouwmeester, H.J., Claas, F.H.J., Dicke, M., Van Loon, J.J.A., Takken, W., Knight, R., and R.C. Smallegange. 2011. Composition of human skin microbiota affects attractiveness to malaria mosquitoes. *PLoS One* 6 (12), e28991.

Wigglesworth, V., 1941. The sensory physiology of the human louse *Pediculus humanus corporis* De Geer (Anoplura). *Parasitology* 32, 67-109.

Zacharuk, R. Y. (1980). Ultrastructure and function of insect chemosensilla. *Annual review of entomology*, 25(1), 27-47.

Zhang, Z., Li, X., Chen, L., Wang, L., & Lei, C. (2016). Morphology, distribution and abundance of antennal sensilla of the oyster mushroom fly, *Coboldia fuscipes* (Meigen)(Diptera: Scatopsidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, 60(1), 8-14.

Zube, C., and Rössler, W. (2008). Caste- and sex-specific adaptations within the olfactory pathway in the brain of the ant *Camponotus floridanus*. *Arthropod Struct. Dev.* 37, 469–479. doi:10.1016/j.asd.2008.05.004.

www.wikipedia.org

www.who.int

www.pinterest.com

www.cronodon.com

www.cdc.gov

www.vectorbase.org

web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2012/

www.lwow.home.pl/Weigl

PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTE TRABAJO DE TESIS

Effect of environmental conditions and toxic compounds on the locomotor activity of *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). Ortega-Insaurralde, I., Toloza, A.C., Gonzalez-Audino, P., Mougabure-Cueto, G.A., Alvarez-Costa, A., Roca-Acevedo, G., and M.I. Picollo. 2015. J. Med. Entomol. 52, 1036-1042.

Arrestant effect of human scalp components in *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae) behavior. Ortega Insaurralde, I., Toloza, A.C., Gonzalez Audino, P. and Picollo, M.I. (2017). J. Med. Entomol. 54, 258-263.

The sensory machinery of the head louse *Pediculus humanus capitis*: from the antenna to the brain. Ortega Insaurralde I, Minoli S, Toloza AC, Picollo MI, Barrozo RB. Enviado a Frontiers in invertebrate physiology, 2018.