



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Sustancias involucradas en la comunicación química de  
*Pediculus humanus capitis* con su hospedador y sus congéneres:  
identificación y rol ecológico**

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

**Lic. Federico Gabriel Galassi**

Directora de Tesis: Dra. González Audino Paola

Directora Adjunta: Dra. Picollo María Ines

Consejero de Estudio: Dr. Manrique Gabriel

Lugar de trabajo: Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas  
(CIPEIN-UNIDEF-CONICET)

Buenos Aires, 2019

# **Sustancias involucradas en la comunicación química de *Pediculus humanus capitis* con su hospedador y con sus congéneres: identificación y rol ecológico**

## **Resumen**

El piojo de la cabeza *Pediculus humanus capitis* (De Geer) (Phthiraptera: Pediculidae) es un ectoparásito humano cosmopolita causante de la pediculosis. La transmisión de estos parásitos se da por dos vías directa e indirecta, sin embargo los mecanismos químicos involucrados en el reconocimiento del huésped y la comunicación intra especie todavía se desconocen. En esta tesis evaluamos la respuesta de los piojos frente a diferentes estímulos químicos para dilucidar las claves de la comunicación intra e inter especie.

Se evaluó la respuesta de los piojos de la cabeza frente a los volátiles del cuero cabelludo humano y se observó que eran atraídos en bioensayos de comportamiento. Posteriormente, los volátiles de la cabeza se colectaron sobre una fibra adsorbente y se analizaron por CG-EM. Se identificaron veinticuatro compuestos, siendo los mayoritarios nonanal, sulcatona, geranilacetona y ácido palmítico. Los componentes mayoritarios se evaluaron comportamentalmente en forma individual. Se encontró que el nonanal tuvo una actividad significativa de atracción a dosis bajas y repelencia a dosis altas.

También se estudió el perfil químico de los volátiles del cuero cabelludo en sujetos infestados y no infestados con el propósito de detectar posibles diferencias en los compuestos emanados que justificaran la distinta susceptibilidad a la infestación. Sin embargo, resultados no mostraron diferencias en sendos perfiles. Por otro lado, en bioensayo comportamental tampoco se encontró una respuesta diferencial de los piojos hacia ambos grupos de individuos evaluados.

Se evaluó si los piojos prefieren el olor de la cabeza por sobre el olor de otras partes del cuerpo humano (pie y brazo). Los resultados mostraron que los piojos de la cabeza no prefieren los volátiles de la cabeza en comparación con los volátiles de otras partes del

cuerpo. Sin embargo, cuando los insectos se expusieron al olor humano total de diferentes partes del cuerpo, mostraron una respuesta preferencial hacia la cabeza en comparación con el pie o el antebrazo. El análisis químico del olor total mostró una mayor cantidad de compuestos ácidos en cabeza comparado con pie y brazo.

Con respecto a la comunicación intraespecífica, evaluamos la respuesta comportamental de los piojos a compuestos volátiles y a extractos en solvente de sus heces. Ambas fracciones fueron analizadas por diferentes técnicas de química analítica. En el bioensayo, los piojos se vieron significativamente atraídos por la mezcla de volátiles emitidas por las heces. Los compuestos mayoritarios detectados por CG-EM fueron decanal, nonanal, hexanal y ácido acético, representando juntos aproximadamente el 60% de los compuestos identificados. En referencia al bioensayo de los piojos frente a los extractos de heces estos fueron atraídos sólo por el extracto en metanol. El resultado del análisis químico mediante HPLC-UV-MS del extracto metanólico mostró la presencia de ácido úrico, hipoxantina y guanina o iso-guanina.

En conclusión, esta tesis demostró que existen señales químicas emanadas por su hospedero y por sus congéneres que generan una respuesta comportamental en los piojos de la cabeza.

**Palabras claves:** *Pediculus humanus capitis*, volátiles cuerpo humano, heces, análisis químico.

# **Substances involved in the chemical communication of *Pediculus humanus capitis* with its host and its congeners: identification and ecological role**

## **Abstract**

The head louse *Pediculus humanus capitis* (De Geer) (Phthiraptera: Pediculidae) is a cosmopolitan human ectoparasite that causes pediculosis. The transmission of these parasites has two ways (indirect and direct), however the chemical mechanisms involved in the recognition of the host by lice and how they communicate with each other are still unknown. In this thesis, we investigated the response of lice towards different chemical stimuli to study the intra and inter species chemical communication.

The response of head lice towards volatile human scalp was evaluated in behavioural bioassays. In addition, volatiles were collected on a solid fiber and analysed by GC-MS. Twenty-four components were detected, the majority were nonanal, sulcatone, geranylacetone and palmitic acid. The Main compounds were individually tested in bioassay. It was found that nonanal shared a significant attraction activity at low doses and repellency at high doses.

The chemical profile of volatile scalp in infested and non-infested subjects was studied in order to detect possible differences that would explain the differential susceptibility to infestation. The results did not show differences. On the other hand, in the behavioral bioassay there was not differential response of lice towards both groups of individuals evaluated.

It was also evaluated whether lice prefer the odour of the head over that of other parts of the human body (foot and arm). The results showed that head lice have no preference for volatiles emanated from head compared to volatile from other body parts. Conversely, when insects were exposed to the total human odour (volatile and non volatiles) from different body parts, they showed a preferential response towards the

head compared to foot or forearm. The chemical analysis of the total odour showed greater amounts of acid compounds in the scalp compared to foot and arm.

To get insight into intraspecific communication, we evaluated the behavioral response of lice towards volatile compounds and solvent extracts from their feces. Both fractions were analysed by different analytical chemistry techniques. In the bioassay, lice were affected by the mixture of volatiles emitted by feces. The major compounds detected by CG-MS were decanal, nonanal, hexanal and acetic acid, all together representing approximately 60% of the identified compounds. In reference to the bioassay of lice towards feces extracts, they were attracted only by methanol extract. The result of the chemical analysis by HPLC-UV-MS of the methanol extract showed the presence of uric acid, hypoxanthine and guanine or iso-guanine.

In conclusion, this thesis showed that there are chemical cues generated from its host and its congeners that evoke behavioral responses in head lice.

**Keywords:** *Pediculus humanus capitis*, volatile human body, feces, chemical analysis.

# AGRADECIMIENTOS

- ✓ Primero agradecer a mis directoras, las Doctoras Paola Gonzalez Audino y Maria Ines Picollo que confiaron en mi para llevar este proyecto adelante. Gracias por enseñarme, acompañarme y formarme a lo largo de estos 5 años. Sin Ustedes todo esto sería imposible.
- ✓ Quiero agradecer a mi familia (mama Carmela, papa Sergio, mis 3 bellas hermanas y mis 3 sobrinitos) que siempre me apoyaron en este camino con su paciencia y corazón.
- ✓ A mis amigos y amigas de la vida y los que me dio la ciencia (soy afortunado que la lista es muy grande para nombrarlos a todos), ellos siempre tuvieron conmigo las palabras correctas en los momentos correctos, los quiero.
- ✓ Al CIPEIN y su gente, ese maravilloso laboratorio que fue mi segunda casa y donde conocí gente hermosa.
- ✓ A CITEDEF por ofrecerme un espacio para formarme.
- ✓ A los chicos y autoridades de escuelas que me permitieron obtener el material biológico para realizar la tesis.
- ✓ A los Doctores Gaston Mougabure Cueto y Patricia Fernandez por ser parte del comité de seguimiento de mi tesis.
- ✓ Al Doctor Gabriel Manrique por ser mi consejero de estudio.
- ✓ A las instituciones que financiaron este trabajo de tesis:
  - Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnologicas (CONICET)
  - Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica
  - Laboratorios ELEA Phoenix

**Hacer una mención a la educación pública citando a Nelson Mandela “La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo.”**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	02
<b>ABSTRACT</b>	04
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	06
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	12
Relación entre piojo y humano (historia de infestación)	13
Morfología y desarrollo del <i>P. humanus capitis</i>	18
Epidemiología (transmisión y factores de riesgo)	27
Comunicación química de insectos hematófagos	30
Objetivo general de la Tesis Doctoral	35
Hipótesis de trabajo	36
<b>PARTE 1: COMUNICACIÓN QUÍMICA DEL <i>PEDICULUS HUMANUS</i></b>	37
<b><i>CAPITIS</i> CON SU HOSPEDADOR</b>	
<b>1.1. Identificación química de los componentes volátiles del cuero cabelludo humano y bioactividad sobre piojos de la cabeza</b>	38
<b>1.1.1. Introducción</b>	38
<b>1.1.2 Materiales y Métodos</b>	38
Insectos	40
Sustancias químicas	41
Colecta de compuestos del cuero cabelludo humano para bioensayo de comportamiento	42

Construcción del olfatómetro	42
Dispositivo experimental	43
Bioensayo de comportamiento para evaluar los volátiles del cuero cabelludo	45
Colecta de volátiles del cuero cabelludo para análisis químico	46
Análisis químico de los compuestos volátiles de la cabeza	47
Bioensayo de comportamiento con los compuestos volátiles individuales mayoritarios	49
Análisis estadístico de los datos	51
<b>1.1.3 Resultados</b>	51
Respuesta de piojos a los volátiles del cuero cabelludo humano	51
Análisis químico de los volátiles del cuero cabelludo humano	52
Bioensayo con los compuestos mayoritarios individuales	55
<b>1.1.4 Discusión</b>	57
<b>1.2. Análisis comparativo de la composición química y bioactividad de los volátiles de individuos infestados y no infestados.</b>	62
<b>1.2.1 Introducción</b>	62
<b>1.2.2 Materiales y Métodos</b>	63
Insectos	63
Sustancias Químicas	63
Colecta de volátiles en diferentes individuos: análisis químico y respuesta comportamental	64
Análisis comparativo de los volátiles del cuero cabelludo entre individuos infestados y no infestados	64
Respuesta comportamental a los volátiles del cuero cabelludo de individuos infestados y no infestados	65

Análisis estadístico	65
<b>1.2.3 Resultados</b>	66
Análisis comparativo de los volátiles del cuero cabelludo entre individuos infestados y no infestados	66
Respuesta comportamental de los piojos a volátiles de individuos infestados y no infestados.	68
<b>1.2.4 Discusión</b>	69
Análisis comparativo de los volátiles del cuero cabelludo de individuos infestados y no infestados	69
Respuesta comportamental de los piojos a volátiles de individuos infestados y no infestados	70
<b>1.3. Bio-actividad comparada y caracterización química de muestras de distintas partes del cuerpo</b>	71
<b>1.3.1 Introducción</b>	71
<b>1.3.2 Materiales y Métodos</b>	72
Insectos	72
Sustancias químicas	72
Toma de compuestos volátiles de diferentes partes del cuerpo (pie, brazo y cabeza)	73
Respuesta comportamental de los piojos a volátiles de las diferentes partes del cuerpo	73
Análisis estadístico	74
Diseño experimental para evaluar bioactividad de los componentes totales de las distintas partes del cuerpo	75
Toma de muestra de compuestos totales de las diferentes partes del cuerpo para bioensayo	75
Obtención de los extractos para el análisis químico de los compuestos de distintas partes del cuerpo	76

Análisis químico de los extractos de diferentes partes del cuerpo	79
Análisis estadístico	79
<b>1.3.3 Resultados</b>	<b>80</b>
Respuesta comportamental a volátiles de las diferentes partes del cuerpo	80
Respuesta comportamental a muestras totales de distintas partes del cuerpo	81
Análisis químico de los extractos totales de diferentes partes del cuerpo	83
<b>1.3.3 Discusión</b>	<b>85</b>
<b>PARTE 2: COMUNICACIÓN QUÍMICA DEL <i>PEDICULUS HUMANUS CAPITIS</i></b>	<b>89</b>
<b>CON SUS CONGÉNERES</b>	
<b>2.1 Introducción</b>	<b>90</b>
<b>2.2 Materiales y Métodos</b>	<b>93</b>
Insectos	93
Sustancias Químicas	93
Recolección de las heces	94
Bioensayo comportamental de los volátiles de heces	96
Colección de los volátiles de heces para análisis químico	98
Análisis químico de los volátiles de las heces	99
Análisis estadístico del bioensayo de los volátiles de heces	100
Colección de las muestras de heces en distintos solventes	101
Bioensayo comportamental para evaluar actividad de los piojos a los extractos de heces	101
Análisis químico de los extractos de heces de piojos	102

Análisis estadístico del bioensayo comportamental de los extractos de heces	105
<b>2.3 Resultados</b>	<b>105</b>
Respuesta comportamental de los piojos a volátiles de las heces	105
Análisis químico de los volátiles de las heces	106
Respuesta comportamental de los piojos a los extractos de las heces	109
Análisis químico de los extractos de heces de piojos	111
<b>2.4 Discusión</b>	<b>113</b>
<b>CUADRO RESUMEN DE LA TESIS</b>	<b>118</b>
<b>CONCLUSIONES FINALES</b>	<b>120</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>124</b>
<b>PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS</b>	<b>140</b>

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## Relación piojo-humano (historia de la infestación)

Los piojos succionadores pertenecen al suborden Anoplura del orden Phthiraptera. Son ectoparásitos obligados de mamíferos, muy especializados en sus respectivos hospederos ya que pasan toda su vida sobre ellos. El humano (a diferencia de los otros mamíferos) puede ser parasitado por más de una especie de piojo, evidenciando una co-evolución humano-piojo que dio origen a los distintos piojos que lo infestan.

En los humanos existen tres especies de piojos: *Pediculus humanus capitis*, *Pediculus humanus corporis* y *Pthirus pubis*. Los piojos del género *Pediculus* también se conocen como piojo de la cabeza y piojo del cuerpo respectivamente, distinguiéndose entre ellos la zona en donde habitan. Los parásitos del género *Pthirus* que se encuentran en la parte la genitalia. Ambos géneros pertenecen al grupo de piojos chupadores, uno compartido con los chimpancés y el otro compartido con los gorilas.

Los piojos humanos de la cabeza y del cuerpo, al igual que los piojos de los chimpancés, pertenecen al género *Pediculus* (*Pediculus humanus* y *Pediculus schaeffi*, respectivamente). No hay especie de *Pediculus* que parasite a los gorilas. Ambos *Pediculus* poseen un ancestro común, pero se diferenciaron hace seis millones de años cuando surgió una divergencia contemporánea con sus hospederos (Figura 1).

El piojo humano púbico (ladilla) y el piojo de los gorilas pertenecen al género *Pthirus* con sus dos representantes (*Pthirus pubis* y *Pthirus gorillae*, respectivamente). No hay piojos de este género que parasiten chimpancés. Las 2 especies del género *Pthirus* comparten un ancestro común de 3 ó 4 millones de años, pero su divergencia no concuerda con la de sus huéspedes (gorila y humano) que fue hace 7 millones de años (Reed et al 2004).

Esto ha llevado a la teoría más aceptada actualmente que establece que *P. pubis* no co-evolució con el hombre, sino que pasó de gorila a humano (Figura 1).

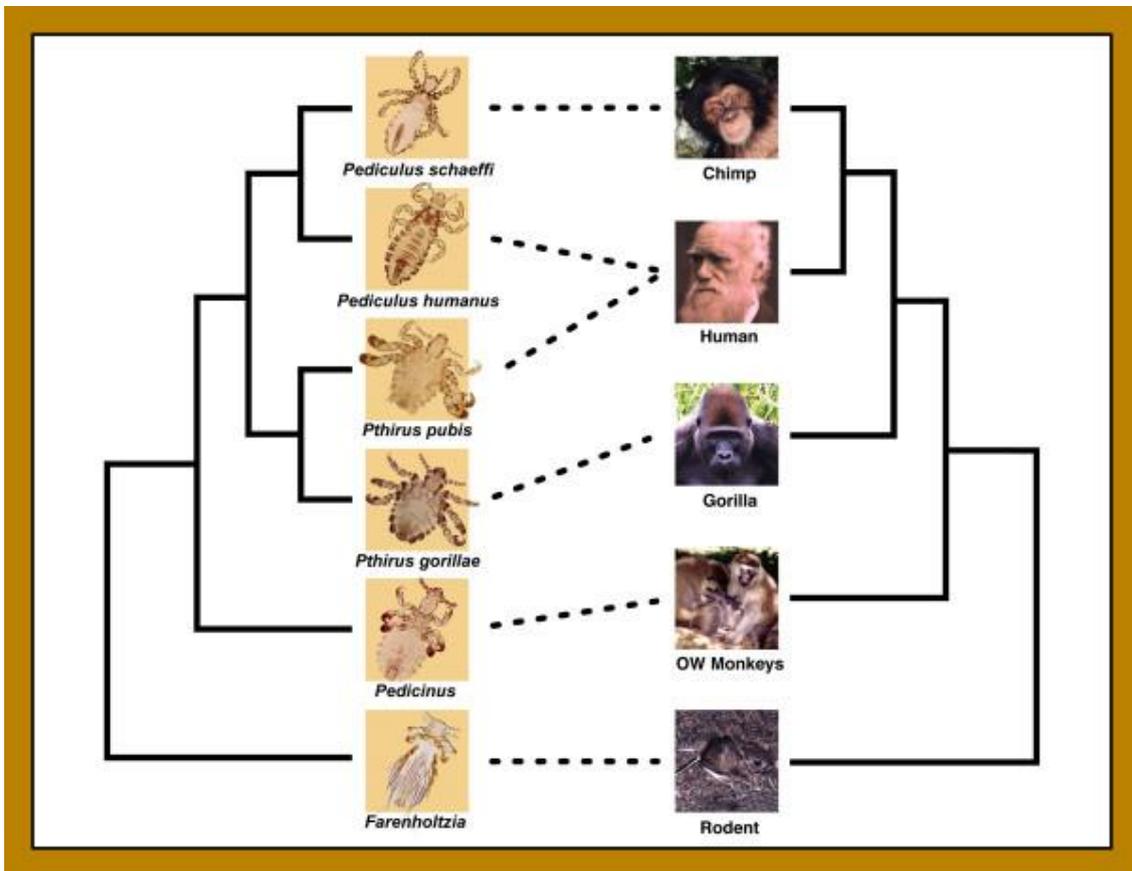


Figura 1. Evolución de los piojos de los primates y las especies hospedadoras. Las divergencias fueron estimadas a partir de análisis de ADN mitocondrial (Reed et al 2004).

La presencia de piojos en humanos data de épocas remotas, y está evidenciada en el descubrimiento de restos de piojos y liendres en momias egipcias y americanas. Se han identificado estos parásitos en personas de distinto nivel social, tanto en nobles de Egipto con una antigüedad de 3.000 años, como en indios nómades de América. En las momias prehistóricas del sur de Perú, la prevalencia de infestación con piojos varió entre el 18% y 71%, siendo mayor en hombres que en mujeres, probablemente debido a que los hombres presentaban trenzas que hacían dificultosa la extracción de los parásitos.

En esa época, se utilizaban peines contruidos con materiales naturales con cerdas adaptadas para remover los parásitos y sus huevos, con un diseño que facilitaba desenredar el cabello y tener fácil acceso a los insectos. Los materiales utilizados más comúnmente fueron marfiles, madera y hueso (Mumcuoglu 2008) (Figura 2).

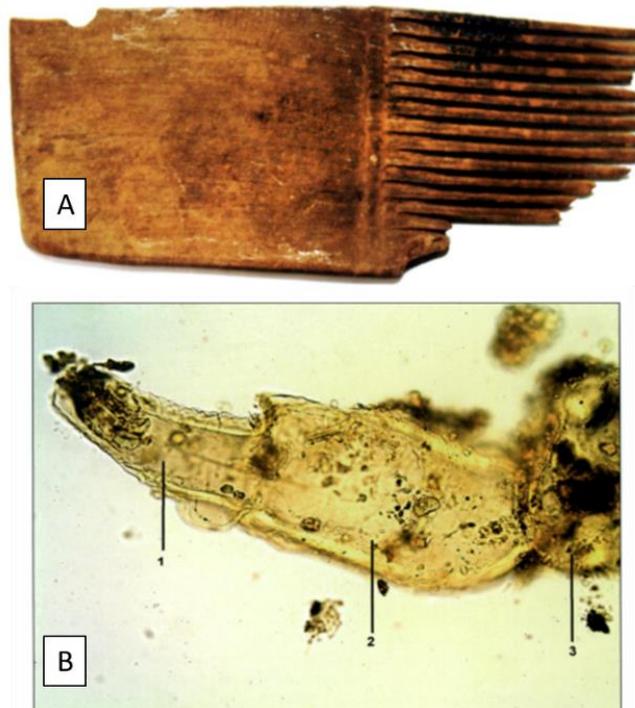


Figura 2. (A) Peine de madera encontrado en excavaciones. (B) Parte apical de la pata de una ninfa I de *Pediculus humanus capitis* encontrada el peine de madera: tarso (1), tibia (2) y fémur (3) (Mumcuoglu et al. 2008)

En los últimos siglos, los piojos humanos del cuerpo causaron pandemias por ser vectores de la fiebre de las trincheras y del tifus, enfermedades relacionadas con situaciones de hambruna y guerra. Efectivamente, durante la primera guerra mundial las infestaciones con piojos eran frecuentes en las trincheras (por ello la enfermedad que lleva este nombre), estimándose infestaciones del 97% entre los hombres que trabajaban y vivían en ellas. Éste fue claramente un fenómeno debido al hacinamiento,

ya que las personas que regresaban a sus casas no fueron afectadas y al finalizar la guerra también finalizó el problema de la infestación.

La enfermedad del tifus (también transmitida por el piojo del cuerpo) es causada por la bacteria *Rickettsia prowazekii*. El primer brote epidémico apareció en noviembre de 1914 en refugiados y prisioneros de la primera guerra mundial y se extendió rápidamente entre las tropas: al cabo de 1 año había provocado la mortalidad de 150.000 personas en Europa. La tasa de mortalidad del tifus alcanzó un pico epidémico de 60- 70% entre los enfermos, y por eso fue necesario tomar medidas drásticas como la cuarentena de personas con los primeros signos clínicos de la enfermedad y la aplicación de estándares de higiene entre las tropas para prevenir las infestaciones de piojos (Figura 3). Estos sucesos dramáticos generaron conciencia sobre la necesidad de conocer la biología del piojo del cuerpo humano, instaurando su importancia como modelo de estudio.



Figura 3. Diario de la época mostrando los controles para erradicar al piojo del cuerpo humano portador de la enfermedad del tifus (Foto extraída de un diario italiano).

<https://www.weh.ox.ac.uk/research/typhus-in-naples-1943-44-a-study-in-vector-control>

En la actualidad todavía existen rebrotes de esta enfermedad en áreas de alta densidad poblacional e higiene deficiente (condiciones que promueven la infestación por piojos), por ejemplo, en las migraciones masivas de refugiados (Figura 4).



Figura 4. Foto extraída de un periódico que muestra el hacinamiento de refugiados de las migraciones, en donde se detectaron brotes activos de tifus (fuente BBC, <https://abcnews.go.com/Health/typhus-fever-outbreak-la-prompts-question/story?id=58306414>)

### **Morfología y desarrollo del *P. humanus capitis***

Los piojos de la cabeza humana son insectos pequeños, ápteros y con cuerpo aplanado dorso ventralmente. El tamaño varía desde 0,5 a 8 mm durante su desarrollo. La cabeza es cónica, y las antenas son pequeñas y filiformes. Poseen patas robustas y tarsos adaptados para moverse sobre el cabello humano (Figura 5).

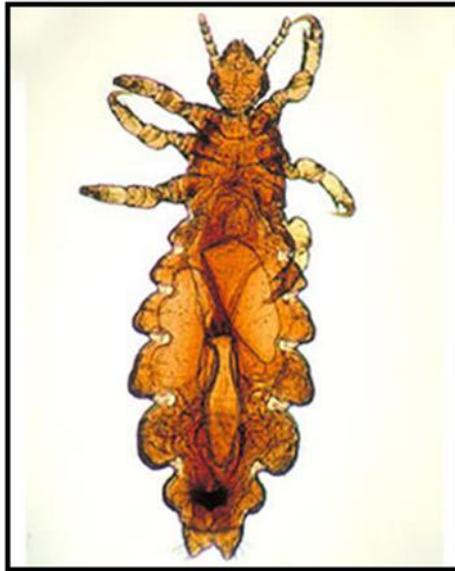


Figura 5: Adulto hembra del piojo de la cabeza (*Pediculus humanus capitis*) (imagen extraída del <https://www.alamy.com/this-image-depicts-a-dorsal-view-of-a-female-head-louse-pediculus-image155846133.html>).

Las hembras adhieren fuertemente los huevos (liendres) al cabello humano. Los huevos eclosionan luego de 5-10 días y las ninfas recién nacidas comienzan a alimentarse inmediatamente. Los piojos pasan por 3 estadios (ninfas) y alcanzan la adultez en 16- 17 días (Figura 6).

Los piojos viven en la cabeza de su hospedador aproximadamente 30 días, requieren alimentación frecuente (4-5 veces diarias tanto de día como de noche) y condiciones de temperatura y humedad casi constantes para evitar deshidratarse. Es por ello que no sobreviven más de 24 h fuera de la cabeza de su hospedador, ya que se encuentran fuera de sus condiciones esenciales para la supervivencia.

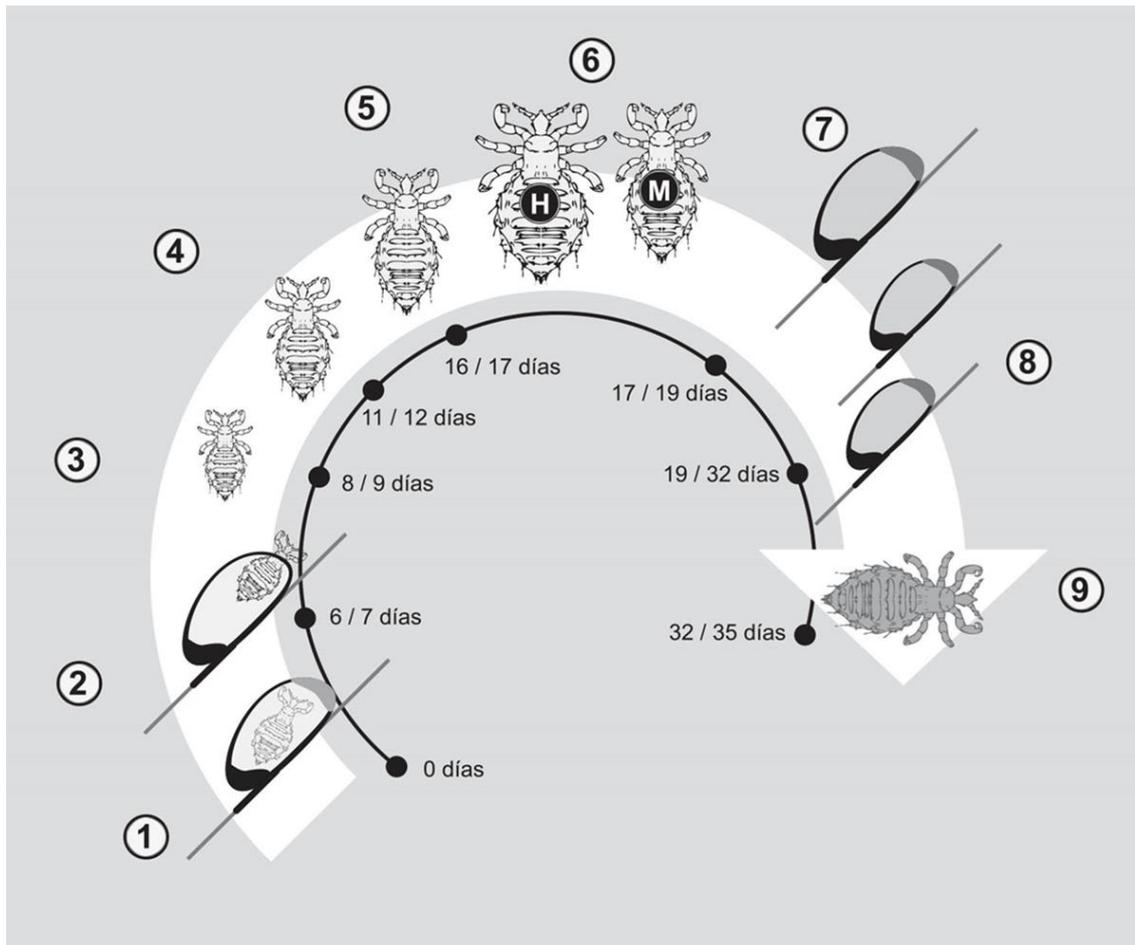


Figura 6: Desarrollo del piojo mostrando los diferentes estadios y la duración de los mismos en el hospedador (adaptado de [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov))

La primera descripción de la morfología de los piojos de la cabeza la realizó Buxton en el año 1947. En la cabeza poseen 1 par de antenas con 5 segmentos cada una, y un par de ojos denominados ocelos (Figura 7 a). Como todo insecto chupador, su aparato bucal está modificado en forma de estilete. En reposo, este estilete está retraído dentro de la cabeza, pero al alimentarse se introduce a través de la piel del hospedador. Durante la alimentación, el insecto mantiene fija su posición en la piel por medio de un anillo de dientes (haustelo) expulsado con los estiletos (Figura 7b-d)

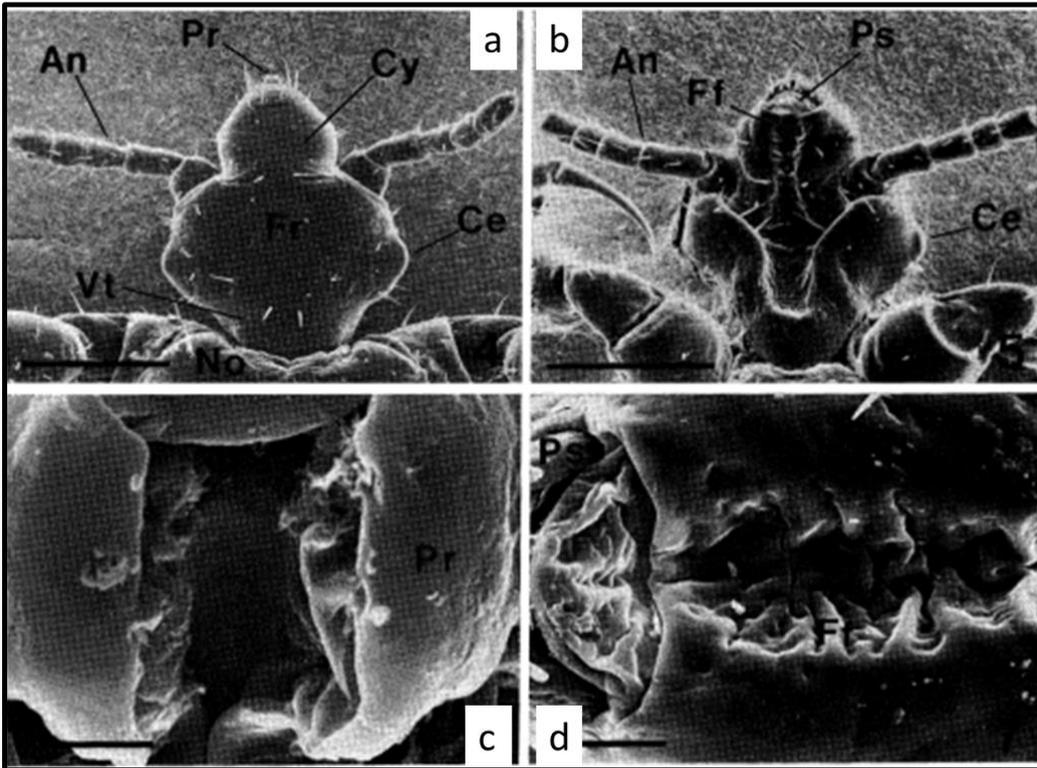


Figura 7. Microscopía de barrido de distintas partes del cuerpo del piojo de la cabeza. (A) vista dorsal de la cabeza. (B) vista ventral de la cabeza. (C) vista ventral de la boca donde se puede observar el haustelo. (D) foto de la parte ventral de la cabeza (Hatsushika et al. 1983).

El tórax está muy esclerotizado y fusionado al abdomen, y en él se insertan una serie de músculos responsables de la movilidad de las patas. Las patas son cortas y robustas. La característica más distintiva está en la tibia, que muestra una espina que se articula con el vértice del único tarso. Esta conformación le permite al piojo aferrarse y deslizarse a lo largo del cabello humano (Figura 8).



Figura 8. Foto del extremo de la pata de un piojo mostrando la espina de la tibia y la garra del tarso (extraída de <https://www.npr.org/sections/health-shots/2019/03/26/706616008/video-head-lice-up-close-and-all-too-personal>).

En el pronoto del tórax se observan los espiráculos que conectan con las tráqueas y las traqueolas para permitir la respiración de los insectos. Estos espiráculos se encuentran esclerotizados y poseen una estructura interna compleja.

En la mitad del tórax comienza el intestino medio que abarca casi todo el largo del abdomen. El intestino está en movimiento cuasi permanente debido a los movimientos peristálticos que movilizan el alimento. La sangre ingerida pasa del intestino medio al posterior y rápidamente al ano para ser excretada en forma sólida, ya que el contenido líquido es asimilado por el tubo digestivo para evitar la deshidratación (Buxton 1947).

El abdomen está cubierto por una cutícula semi transparente que permite ver las distintas estructuras internas del insecto (como los intestinos, oviductos y huevos) y diferentes pigmentos que corresponden a células llamadas micetoma (órgano que contiene microorganismos simbiotes).

El extremo del abdomen presenta dimorfismo sexual. En el macho es redondeado, con el pene de color castaño visible a través de la cutícula que llega a la abertura genital. En la hembra, el extremo del abdomen es alargado con lóbulos que permiten alinear el huevo durante la puesta (Figura 9).

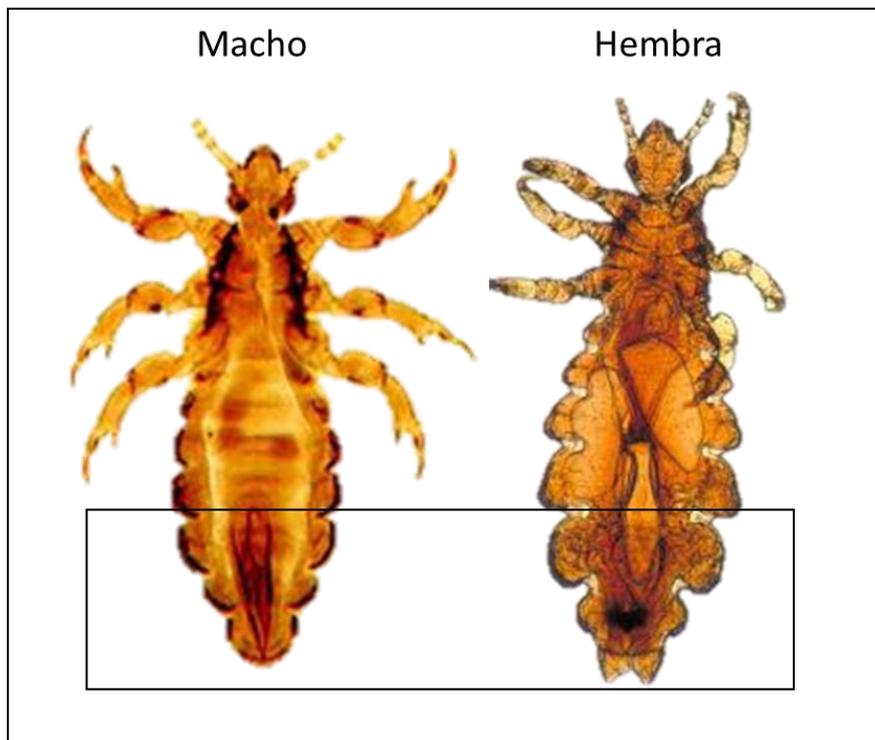


Figura 9. Piojo macho y hembra, mostrando las diferencias morfológicas del último segmento del abdomen (genitalia).

Las ninfas son morfológicamente similares a los adultos, pero de menor tamaño. El abdomen posee segmentación menos definida y no presenta diferenciación sexual (Figura 6). En las ninfas del tercer estadio, los microorganismos simbióticos de los micetomas migran a las paredes esponjosas del oviducto para entrar en contacto con el huevo en desarrollo de la hembra adulta.

Los huevos son ovales de color blanco amarillento, grandes en relación con el tamaño corporal de los adultos (0,8 mm de largo y de 0,3 mm de ancho), y con el corion transparente que permite visualizar el embrión. En la parte anterior posee una tapa de forma circular angulada que se abre al eclosionar el embrión. Esta tapa posee dos capas con células de aire entre ellas, que permiten el intercambio de aire atmosférico entre el exterior y el interior del huevo (figura 10).



Figura 10. Liendres adheridas al cabello mediante un cemento que excreta la hembra junto al huevo. En la imagen del centro se pueden observar los orificios de la parte superior que permite la respiración del embrión.

En los insectos, las antenas son las estructuras críticas para la interacción con el ambiente. Las antenas del piojo de la cabeza poseen 5 segmentos: escapo, pedicelo y 3 flagelos (Ortega-Insaurralde et al 2019) (Figura 11 A).

Los piojos de la cabeza poseen cinco tipos de estructuras sensoriales: cerdas, órganos del penacho, órganos de poros, poros simples y sensilias basicónicas (Figura 11 A-I). Todos los segmentos poseen pelos mecano-receptores y órganos poros

correspondientes a higo-receptores y termo-receptores. Se describieron dos órganos poros denominados órganos de penacho ubicados en el lado dorso-lateral de los subsegmentos F2 y F3 del flagelo (Figuras 11 B, C). En el lado dorso-lateral distal de F3 existen dos órganos de poros centrados en una depresión ovalada y poco profunda (Figuras 11 B, C). En el extremo distal de F3 se observaron diferentes tipos de sensilas basicónicas (Figura 11 F) con poros muy probablemente asociadas a la percepción del gusto, ya que su morfología es semejante a otros insectos hematófagos. Además, en el lado dorso-medial de F3 y al lado de los órganos de penacho y poro, se observó una estructura de poro único (Figura 11 E).

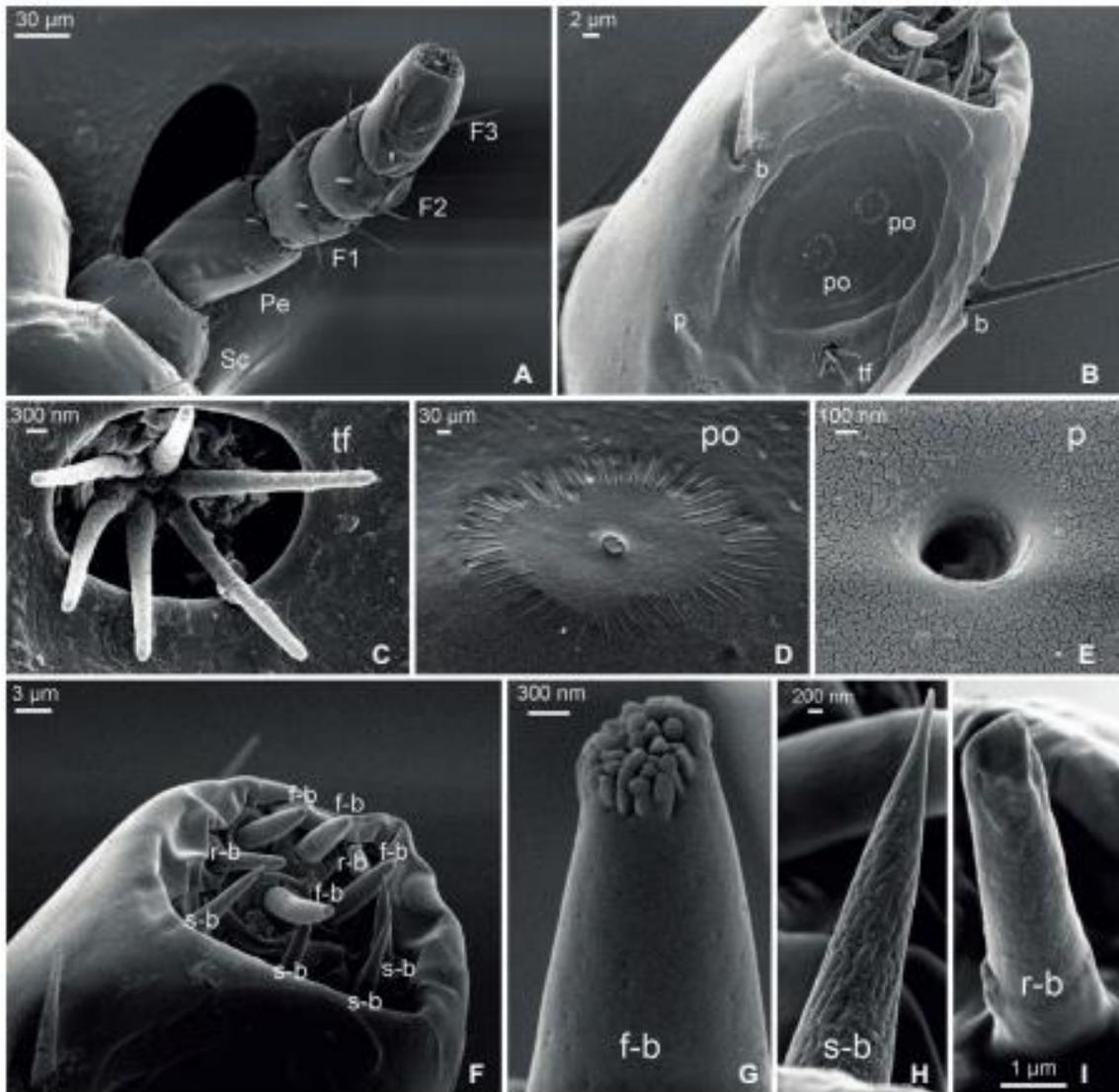


Figura 11: Fotos de microscopio de barrido de la antena de piojos. (A) Vista general de toda la antena constituida por escapo (Sc), pedicelo (Pe) y los 3 flagelos (F1, F2 y F3). (B) Detalle de F3 con el órgano de penacho (tf), dos órganos de poros (po), dos cerdas (b) y un solo poro (p). (C) Detalle de un órgano de penacho. (D) Detalle de un órgano de poro. (E) Detalle de un solo poro. (F) Magnificación del extremo distal de F3 con tres tipos de sensilias basiconicas: tipo dedo (f-b), punta fina (s-b), y punta redondeada (r-b). (G) Detalle de una sensilia basicónica de tipo dedo. (H) Detalle de un sensilia basicónica de punta fina. (I) Detalle de una sensilia basonica de punta redondeada. (extraído de Ortega-Insaurralde et al 2019)

## **Epidemiología (transmisión y factores de riesgo)**

Está aceptado que en sistemas huésped-parasito la población de parásitos está distribuida dentro de la población de manera tal que la mayoría de los hospederos transportan bajas cargas parasitarias mientras que un pequeño número de individuos altamente infestados cargan con la mayoría de la población parasitaria (Wall R. 2007).

La pediculosis capitis es una de las infestaciones por ectoparásitos más comunes tanto en países desarrollados como en desarrollo. Todos los individuos son afectados por esta enfermedad, pero indudablemente la mayor incidencia corresponde a niños en edad escolar (5-13 años). La pediculosis provoca malestares importantes en los niños afectados, ya que causa picazón y pérdida de sueño. La picazón puede conducir a un rascado excesivo y a una infección secundaria de la piel.

Los niveles de infestación establecidos en distintos países dependen en gran medida de la población estudiada y del método de evaluación utilizado. Se determinaron niveles de infestación del 40% en escuelas primarias de Bristol (UK), del 43% en un barrio bajo de Brasil y 49% en Ghana (África) (Heukelbach J. 2010).

Actualmente se acepta que la principal fuente de contagio es la directa, es decir el contacto de cabeza a cabeza, pero también hay evidencias de una transmisión indirecta a través de fómites (un fómite es cualquier objeto inanimado, capaz de transferir un patógeno de un individuo a otro). A continuación, haremos referencia a estas dos vías de contagio del piojo de la cabeza.

### Contagio indirecto

Acciones que pueden derivar en un contagio indirecto o mediante fómites:

- Pérdida de cabellos con piojos de una persona infestada que se depositan en la cabeza o el cuerpo de una persona no infestada.
- Los piojos pasan de una cabeza a otra mediante una carga estática que los moviliza involuntariamente.
- El uso de diferentes objetos (toallas, peines, gorras, etc.) que se utilizan como vehículo para pasar de un hospedero a otro (Takano- Lee et al 2005) (Figura 12)



Figura 12. Fómites que transmiten de manera indirecta los piojos entre distintos hospederos.

La transmisión indirecta es posible por la capacidad de los piojos de sobrevivir un periodo corto de tiempo fuera de huésped. Este tiempo varía de acuerdo al estado fisiológico del insecto y a las condiciones ambientales, pero en general se estima que pueden sobrevivir hasta 44 horas cuando las condiciones de humedad son altas y temperaturas bajas (Nuttall 1917; Payot 1920).

La capacidad de transmisión de piojos vía fómites fue cuestionada en algunos experimentos realizados en escuelas primarias. El resultado de un estudio encontró que no había relación entre el número de piojos en la cabeza y sus fómites, expresando al contagio directo como la única fuente de contagio. (Speare et al 1999). Años más tarde se demostró la importancia del fómite como fuente de dispersión del parásito, mostrando que los piojos tienen la capacidad de esparcirse involuntariamente mediante objetos inanimados (Takano- Lee et al 2005). Estos datos son congruentes con la hipótesis de que los piojos, a pesar de estar en permanente contacto con su hospedero, tienen la capacidad de dispersarse de manera accidental.

#### Contagio directo:

Se trata de una vía de contagio difícil de cuantificar fuera de las condiciones de laboratorio (Buczek et al 2004, Mimouini et al 2002). Un estudio realizado en laboratorio demostró la facilidad de los insectos (especialmente adultos) de pasar de un cabello a otro cabello (Canyon et al 2002) sugiriendo así el contagio directo. Otro estudio realizado en escuelas primarias demostró alta tasa de infestación de niños, pero ausencia de parásitos en los fómites, sugiriendo que el contacto cercano es la primera vía de transmisión (Canyon et al 2010).

En conclusión, existen dos posibles tipos de contagio con distintas evidencias que no permiten todavía llegar a una conclusión concreta sobre la importancia relativa de las vías de infestación. No obstante, el contagio de la pediculosis es una realidad que indica que el fenómeno de transmisión de piojos entre individuos ocurre, y que lleva a la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la biología de los piojos para poder entender las bases del comportamiento de estos insectos.

## **Comunicación química de insectos hematófagos**

### **Introducción sobre comunicación química**

La comunicación química es el modo más importante de transferencia de información en los insectos. La información química puede ser adquirida por los animales a través del olfato o el gusto, o a través de una combinación de ambos. En términos generales, el olfato consiste en la detección de señales disueltas en medios como el aire y el agua lejos de su fuente original (Mustaparta, 1984), mientras que el gusto es la adquisición de señales por contacto directo con la fuente o con un producto disuelto (Städler, 1984). A continuación, vamos a referirnos a la comunicación química de los insectos hematófagos, tanto para la selección de su hospedero como para la comunicación intra-especie.

### **Selección del huésped**

El nivel de dificultad de un insecto hematófago para encontrar la fuente de alimento depende de la cercanía y de la asociación entre ambos. Un extremo en esta asociación corresponde a los ectoparásitos permanentes como los piojos, que están en constante contacto con su hospedador. En el otro extremo se encuentran los insectos de vida libre que son temporariamente ectoparásitos como las garrapatas, mosquitos o chinches (Chapman 1998). Ambos extremos poseen la facultad de reconocer su fuente de alimento mediante la interacción de sus receptores (fundamentalmente en las antenas) con las señales químicas y físicas emanadas por sus hospederos (Figura 11)

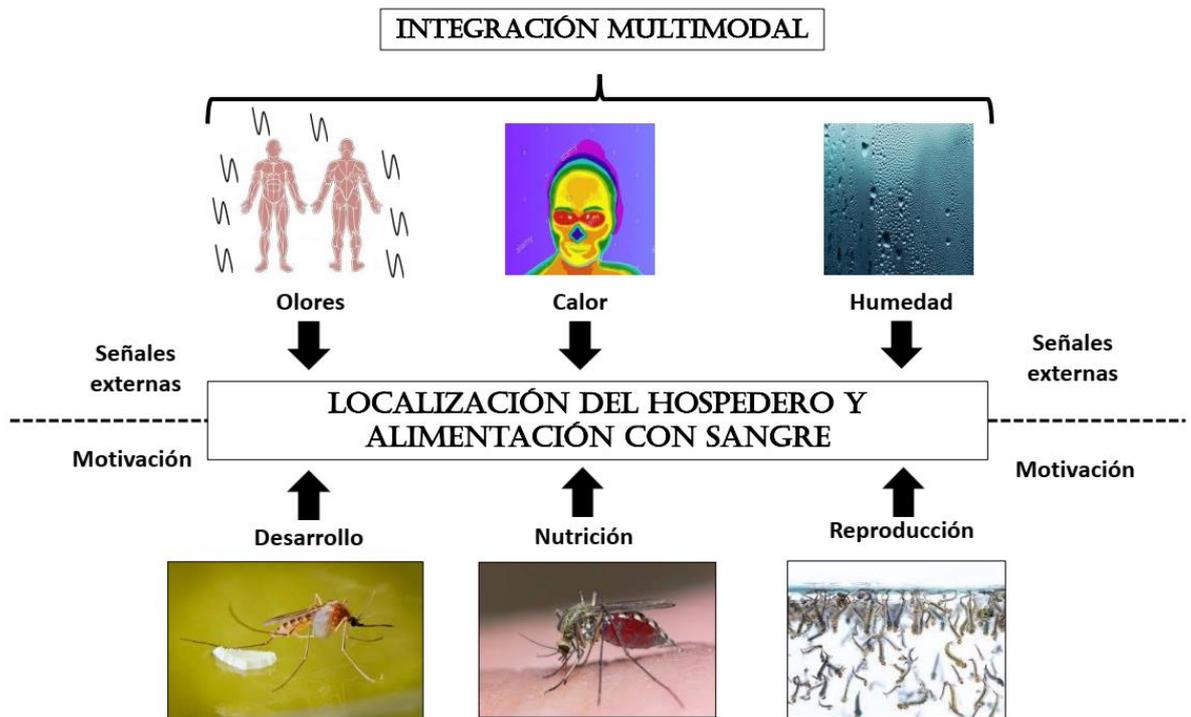


Figura 11. Factores exógenos y endógenos que influyen en la búsqueda del hospedero y en el comportamiento de alimentación de insectos hematófagos.

Las claves químicas estudiadas en insectos hematófagos como los mosquitos, establecen distinta susceptibilidad de los individuos a la picadura de este insecto. Leal et al 2017 demostraron que ciertas sustancias del olor humano dependiendo de su concentración actuaban como claves químicas de atracción o de repelencia para los mosquitos, y que estas diferencias se secretan de manera natural en diferentes hospedadores.

Otros estudios sobre especies hematófagas como hemípteros u otros dípteros, mostraron que estos insectos de hecho poseen la capacidad de detectar moléculas emitidas por sus hospederos potenciales, tales como dióxido de carbono, ácido láctico

y 1-octen -3ol. Estos compuestos son productos de excreción del metabolismo de los mamíferos (Gibson y Torr 1999, Cruz-López et al 2001).

Oliveira-Filho et al (2017) estudiaron la infestación diferencial de distintas razas de perro con otro ectoparásito hematófago, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Estos autores demostraron que los perros Beagle no eran susceptibles a la infestación por las garrapatas debido a la presencia en su olor de los compuestos volátiles 2-hexanona y benzaldehído en su olor. También demostraron que existía una proporción óptima de estos dos componentes que producía una mayor repelencia a la infestación por *R. sanguineus*. Estos resultados representaron una base racional para el desarrollo de repelentes capaces de proteger a otras razas de perros del ataque de estos ectoparásitos.

En el humano, la piel representa el órgano más extenso responsable del 12-15% del peso corporal. La piel humana emana distintos compuestos que contribuyen a la formación de los diferentes perfiles de olores de las personas. Estos perfiles transmiten información importante sobre los procesos metabólicos. Los compuestos de la piel proceden de diferentes glándulas (ecrinas, sebáceas y apocrinas). Cada glándula secreta determinados compuestos y las interacciones de estos compuestos con la microbiota de la piel genera un perfil químico determinado (Labows et al 1982, Nicolaides 1974). En consecuencia, cada persona posee un perfil químico distintivo y una susceptibilidad diferenciada para ser elegido por los insectos hematófagos. Es decir, que se le atribuye la susceptibilidad a la picadura de un insecto a la composición química del sujeto.

## Comunicación intraespecífica

Law y Regnier (1971) propusieron el término semioquímicos para las señales químicas que transmiten información entre individuos, sean de la misma o diferente especie. La liberación de estos compuestos al ambiente transmite un tipo de información, evocando una respuesta fisiológica o comportamental adaptativa para uno o ambos individuos.

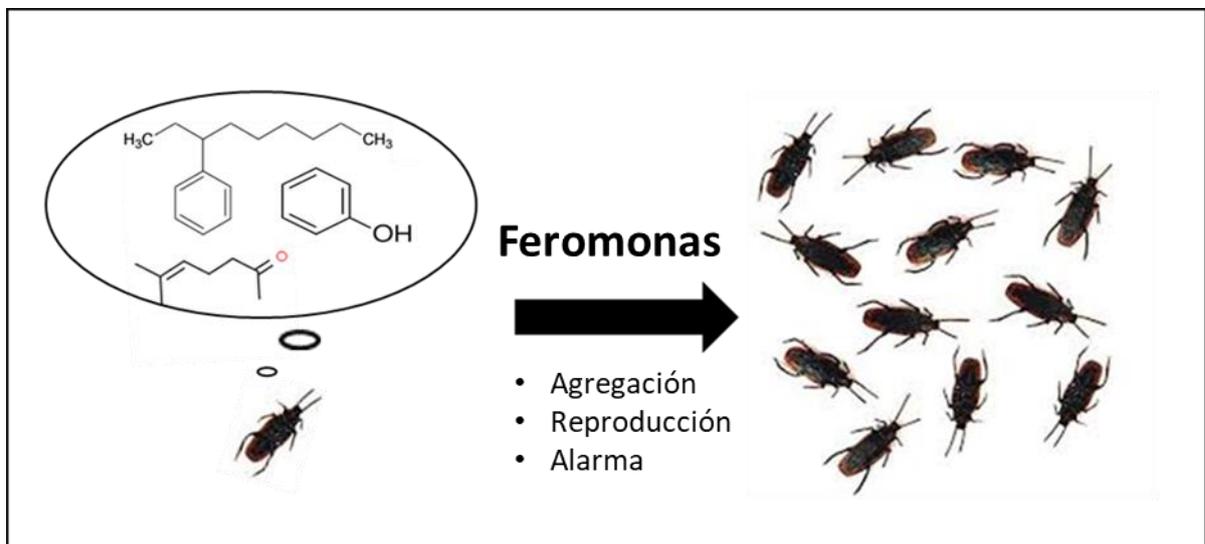


Figura 12. Esquema de la comunicación química entre insectos. En este ejemplo se trata de un compuesto que genera un efecto de agregación.

Las feromonas son señales químicas producidas por un organismo que pueden promover una respuesta fisiológica o comportamental en otro individuo de la misma especie (Karlson y Luscher et al 1959). Existen distintos tipos de feromonas que suelen ser clasificadas según la respuesta biológica que evocan, p.e., sexuales, de agregación, de marcado, de alarma, entre otras (Figura 12)

Estos compuestos pueden ser secretados por glándulas o ser productos de excreción a partir del metabolismo de los insectos. En su mayoría, las feromonas son producidas por células glandulares epidérmicas concentradas en áreas discretas por debajo de la cutícula formando glándulas exocrinas. Como en algunas especies las células glandulares están dispersas a lo largo de la epidermis, las glándulas exocrinas de los insectos pueden ser encontradas en diferentes regiones del cuerpo, variando su posición de acuerdo al sexo, al estado de desarrollo e incluso dependiendo de la función de los volátiles liberados (Chapman, 1998).

Las heces representan otra vía de generación de compuestos con importancia en la comunicación química. Los insectos hematófagos pueden producir sustancias a partir de la sangre de mamíferos. Schofield y Patterson (1977) demostraron la existencia de una feromona de agregación juvenil (JAP) en heces de ninfas de *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus*. Posteriormente se demostró que los desechos de excreción emulaban distintos tipos de comportamiento asociados al estado fisiológico de los insectos. Por ejemplo, insectos parásitos alimentados sobre un hospedero viable, secretan señales químicas para convocar a sus conespecíficos. De esta manera va aumentando el número de individuos que se acercan al hospedero logrando un efecto de agregación vinculado a la fuente de alimento, y a la posible formación de la colonia. Las hembras de mosquito localizan a su hospedero principalmente por las sustancias volátiles que emite y convocan a otras hembras emitiendo semioquímicos que cumplen la función de feromonas de agregación atrayendo a los mosquitos a comer de la misma fuente (Ahmadi & McClland, 1985).

## Objetivo general de la Tesis Doctoral

Avanzar en el conocimiento de la comunicación química del ectoparásito *Pediculus humanus capitis* involucrada en su selección del hospedador humano y en la comunicación intra-especie.

### Objetivos específicos de la tesis doctoral

- 1) Diseñar y desarrollar un sistema de evaluación y cuantificación de la respuesta comportamental de *P. humanus capitis* a compuestos volátiles.
- 2) Determinar la respuesta de *P. humanus capitis* a volátiles del cuero cabelludo humano, e identificar químicamente los componentes.
- 3) Establecer la atracción y/o repelencia de los piojos a los componentes volátiles mayoritarios identificados.
- 4) Identificar las sustancias volátiles del cuero cabelludo de individuos infestados y no infestados por piojos, con el fin de identificar diferencias cuali/cuantitativas entre ellos.
- 5) Determinar la preferencia de los piojos del cuerpo hacia las muestras obtenidas de distintas partes cuerpo humano tanto para los compuestos volátiles como componentes menos volátiles.
- 6) Determinar la respuesta comportamental de *P. humanus capitis* a los volátiles de heces otros piojos, e identificar químicamente sus componentes.
- 7) Evaluar la respuesta comportamental de *P. humanus capitis* a los extractos de heces de piojos, e identificar químicamente los componentes de los extractos activos.

## **Hipótesis de trabajo**

- 1) Los piojos de la cabeza son atraídos por volátiles del cuero cabelludo humano que representan una señal de un hospedador.
- 2) Los componentes volátiles mayoritarios del cuero cabelludo humano evaluados individualmente provocan respuestas de atracción y/o repelencia de los piojos de acuerdo a la concentración de los mismos.
- 3) Los piojos de la cabeza prefieren los compuestos secretados por el cuero cabelludo frente a los de otras partes del cuerpo, ya que estos insectos pasan todo su ciclo de vida en la cabeza.
- 4) Existe diferencia química entre los volátiles generados en el cuero cabelludo de sujetos no infestados y los infestados por los piojos de la cabeza, que genera una respuesta de atracción hacia los sujetos parasitados por los insectos.
- 5) Los piojos de la cabeza responden a los componentes volátiles de las heces de otros piojos, como señal de la fuente de alimentación o nidificación adecuada.
- 6) Los piojos de la cabeza responden a compuestos menos volátiles de las heces como señal de acercamiento al hospedero, indicando una adecuada o posible fuente de alimento.

**PARTE 1: COMUNICACIÓN**  
**QUÍMICA DEL *PEDICULUS***  
***HUMANUS CAPITIS* CON SU**  
**HOSPEDADOR**

## **1.1. Identificación química de los componentes volátiles del cuero cabelludo humano y bioactividad sobre piojos de la cabeza**

### **1.1.1. Introducción**

La transmisión de los piojos de la cabeza se produce principalmente por contacto directo entre hospederos. Otra vía de contagio es la indirecta, mediante objetos inanimados llamados fómites.

La tasa de contagio de la pediculosis ha aumentado en el mundo como resultado de la falla de los controles debido a factores como la generación de resistencia a los insecticidas, los cambios de formulaciones y los diagnósticos erróneos (Burgess et al., 2009).

En trabajos de nuestro laboratorio demostramos que la tasa de infestación variaba con la edad de los niños, y que la población más susceptible correspondía a los niños en etapas tempranas de escolaridad (Tolozá et al., 2009).

Los piojos desarrollan su vida en el cuerpo humano, estando en permanente contacto con las secreciones corporales del hospedador.

Los compuestos presentes en la piel provienen de glándulas exocrinas (ecrinas, sebáceas y apocrinas) y de la interacción de las bacterias con estas excreciones, generando aproximadamente 400 compuestos químicos (Penn et al., 2007; Gallagher et al., 2008). Dentro de estas sustancias se encuentran varios grupos funcionales, como alcanos, alquenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos y 3-lactonas (Nicolaidis et al., 1974; Goetz et al., 1987).

En cuanto a la comunicación química entre insectos hematófagos y sus hospederos, se sabe que el 1-octen-3-ol, el ácido L-láctico y los ácidos carboxílicos C3-C5 están presentes en la piel y son componentes necesarios para la atracción de mosquitos, vinchucas y moscas tsetse (Lehane et al. 2005), y que la producción de estos compuestos en los seres humanos está asociada con una susceptibilidad diferencial a la infestación por estos insectos. Se detectaron altos niveles de sulcatona y aldehídos en individuos susceptibles a las picaduras de mosquitos en comparación a los no susceptibles (Logan et al., 2008). Además, en chinches de cama se demostró una respuesta de atracción/repelencia (dependiendo de la dosis) a compuestos presentes en extractos humanos, siendo destacable la atracción producida por aldehídos de cadena corta y por sulcatona (Harraca et al., 2012). En el vector de la enfermedad de Chagas, *Triatoma infestans*, los aldehídos octanal, nonanal y decanal, produjeron una respuesta dosis-dependiente mostrando atracción a bajas concentraciones y repelencia a altas dosis (Fontán et al., 2002; Barroso et al., 2004).

En relación con los piojos humanos, Wigglesworth (1941) utilizó una arena experimental para exponer piojos del cuerpo a papeles frotados sobre piel humana versus papeles limpios, y observó una clara preferencia por el papel frotado. Recientemente, Ortega-Insaurralde et al. (2016) demostraron que la exposición de piojos de la cabeza a papeles de filtro con muestras con compuestos del cuero cabelludo generó una disminución de la actividad locomotora y la detención completa del insecto sobre el papel tratado. Además, demostró que esa respuesta era similar para olores humanos de diferentes sexos y edades.

Más allá de los pocos antecedentes citados, el fenómeno de la selección del huésped por parte de los piojos y los compuestos involucrados en dicha respuesta son poco conocidos.

En esta sección se describe el estudio de la respuesta comportamental de los piojos frente a los compuestos volátiles del cuero cabelludo humano, y la identificación de sus componentes mediante técnicas de química analítica. Además, se evaluó la respuesta comportamental de los piojos hacia los compuestos mayoritarios identificados evaluados de manera individual y en relación con la concentración de los mismos.

### **1.1.2 Materiales y método.**

#### **Insectos**

Los piojos fueron recolectados de las cabezas de niños infestados de escuelas primarias de Buenos Aires, Argentina. Sólo se examinaron los alumnos cuyos padres habían dado su consentimiento para participar en el proyecto y la colecta fue realizada utilizando un peine metálico de dientes finos (ASSY). El protocolo para la recolección de piojos fue aprobado por el comité ad hoc del Centro de Investigaciones de Plagas e Insecticidas (CIPEIN-UNIDEF, Buenos Aires, Argentina), archivado en nuestro laboratorio (# BA20061995ARG, junio de 1995) (Picollo et al., 1998).

En cada caso, se inspeccionó cuidadosamente toda la cabeza, y se prestó especial atención a la nuca y detrás de las orejas, ya que son sitios donde se encuentra alta cantidad de estos insectos. Una vez recolectados, los piojos fueron transportados al laboratorio dentro de un recipiente plástico para su posterior clasificación y separación

por estadio. Se descartaron los insectos dañados o no vitales. Los piojos adultos se mantuvieron en bandejas plásticas dentro de una cámara ambiental con humedad (60-70%) y temperatura ( $17 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controladas, hasta su utilización en los ensayos. Estas condiciones son las informadas como óptimas para la supervivencia de estos insectos en el laboratorio (Picollo et al., 1998). Se utilizaron machos y hembras para los bioensayos.

### **Sustancias Químicas**

Se utilizó acetona como solvente (>99.8% de Merck Darmstadt, Alemania) tanto para los bioensayos como para dilución de los patrones estándares en el análisis químico. Se utilizaron nonanal (>99%), sulcatona (>99%), ácido hexadecanoico (>99%), geranilacetona (>99%), octanal (>99%), decanal (>99%) , 2,6-dimetil 7-octen-2-ol (Mircenol) (>98%), ácido propanoico (>98%), ácido 3-metil butanoico (ácido isovalérico) (>99%) , 2-ácido etilhexanoico (>99%) , ácido octanoico (>99%) , ácido nonanoico (>99%), ácido decanoico (>99%), ácido dodecanoico (>99%), ácido tetradecanoico (>99%), ácido pentadecanoico (>99%), ácido hexadecanoico (>99%), y los estándares de alcanos (C5-C30) (>99%) (Sigma-Aldrich. St. Louis. MO. USA).

Los alcoholes primarios 1-dodecanol (>95%), 1-tetradecanol (>95%), 1-hexadecanol (>95%), 1-octadecanol (>95%) fueron adquiridos en Polysciences Corp (Valley Road Warrington, Pennsylvania, USA),

## **Colecta de compuestos del cuero cabelludo humano para bioensayo de comportamiento**

Las muestras de cuero cabelludo se obtuvieron de un voluntario adulto-joven quien lavó el cabello 48 horas antes del estudio, con champú de pH neutro libre de fragancias (Biferdil®, Argentina), para evitar posibles fuentes de contaminación exógenas.

Se utilizó un solo voluntario ya que el objetivo de esta sección era evaluar la atracción de los piojos hacia los volátiles del cuero cabelludo y no si existían diferencias de respuestas hacia distintos perfiles de cabeza. También se tuvo en cuenta lo estudiado por Ortega-Insaurralde et al 2016, sugiriendo que no existía preferencia diferencial entre diferentes sexos y edades.

Para coleccionar las muestras se utilizaron papeles de filtro cuadrados Whatman N° 1 (1,5 cm lado) (Buckinghamshire, Reino Unido), que fueron frotados suavemente durante 30 segundos sobre la superficie del cuero cabelludo del voluntario. Estos papeles se utilizaron en el bioensayo inmediatamente luego de su colecta. Por cada ensayo se utilizó un papel tratado, que luego fue descartado.

## **Construcción del olfatómetro**

Para evaluar la respuesta comportamental de los piojos a sustancias volátiles se construyó un olfatómetro de doble opción, de 20 mm de diámetro interno y 240 mm de longitud. En el centro del largo del dispositivo se realizó una abertura circular (por donde se introduce el insecto) generando dos brazos de 120 mm cada uno. En los extremos de

cada brazo del olfatómetro se realizó un orificio para permitir la circulación del aire proveniente del aireador (Figura 13).

En la base del olfatómetro se colocó una tira de papel de filtro de 3 mm de ancho por 220 mm de largo, para facilitar el desplazamiento de los piojos por el tubo.

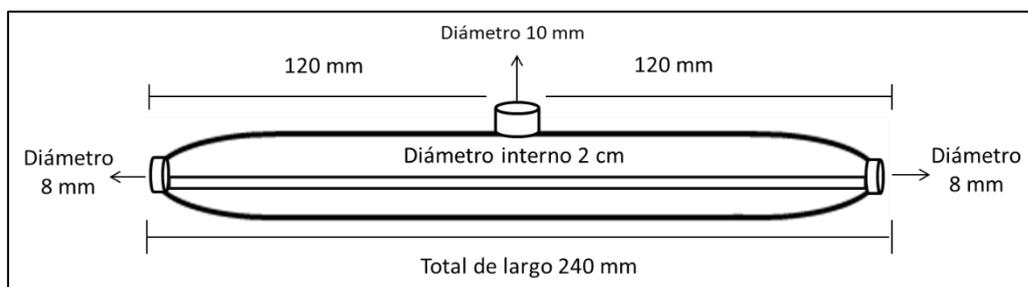


Figura 13. Olfatómetro de doble opción para evaluar la bio-actividad de las sustancias volátiles en piojos.

### Dispositivo experimental

El olfatómetro descrito se utilizó para evaluar la respuesta comportamental de los piojos a los compuestos volátiles del cuero cabelludo humano, y a los componentes mayoritarios de manera individual. El dispositivo se colocó dentro de un gabinete con condiciones ambientales controladas de luz y temperatura ( $21 \pm 0,1$  lux,  $30 \pm 1$  C°) (Ortega-Insaurralde et al. 2015). La humedad se controló mediante un humidificador.

Por ambos extremos del tubo de vidrio se introdujo una corriente de aire producida por una bomba y regulada por un robinete a un flujo de 5 cm/s, medida por un anemómetro. El aire fue filtrado a través de carbón activado y humidificado a través de un frasco lavador. Antes de comenzar los ensayos se aseguró que el flujo de aire se mantuviera continuo.

El comportamiento de los insectos se registró con una cámara infrarroja resistente a la intemperie (KIR-J639CE20, Sony, China) conectada a un monitor (LG, China) y una grabadora de video digital (DVR5104HE, Dajua Technology Co. Ltd, Hangzhou, China) (Figura 14).

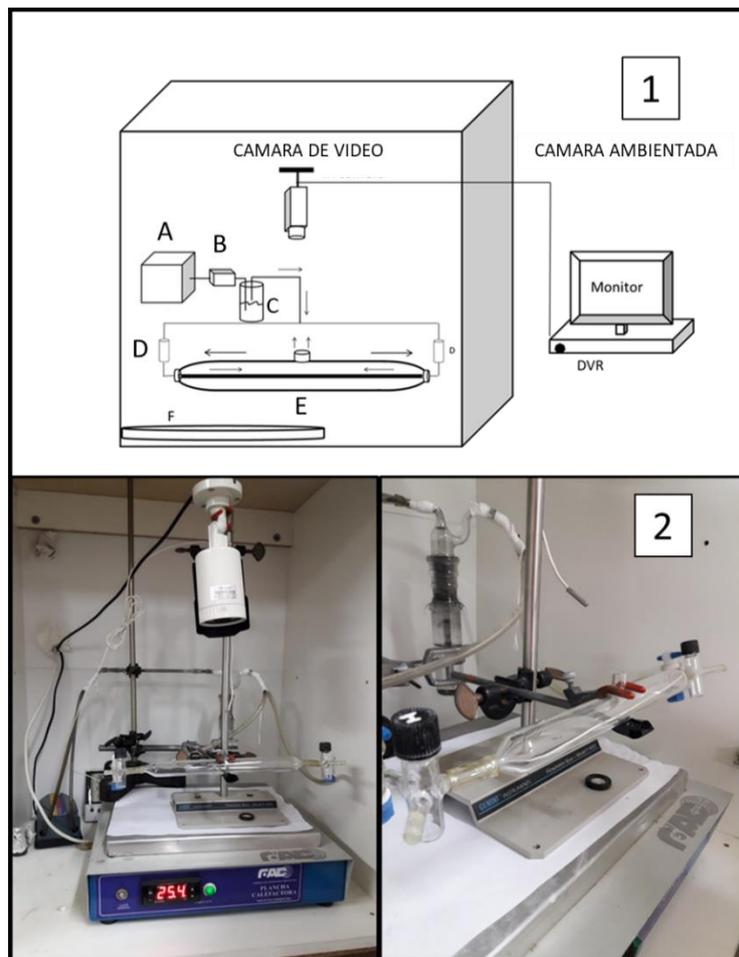


Figura 14. 1) Esquema del olfatómetro de opción dual utilizado para evaluar el efecto de sustancias volátiles en el comportamiento de *Pediculus humanus capitis*. A: Bomba de aire, B: Filtro de carbón activado, C: Humidificador, D: viales herméticos de vidrio de 2 ml, E: punto de decisión, F: placa caliente. Las flechas indican las direcciones del flujo de aire. 2) Fotos del dispositivo.

### **Bioensayo de comportamiento para evaluar los volátiles del cuero cabelludo**

Para la evaluación de la respuesta comportamental de los piojos a los compuestos volátiles del cuero cabelludo humano, se colocó el trozo de papel con la muestra (ver colecta de compuestos) dentro de un vial de 2 ml conectado a uno de los brazos del olfatómetro. En el otro brazo se colocó un trozo de papel similar pero sin tratar (sin muestra) (Figura 15).

Cada piojo se introdujo individualmente en el olfatómetro a través de la abertura central y se le permitió moverse libremente durante 180 segundos (tiempo del ensayo). En ese momento, se registró el brazo del olfatómetro seleccionado por el insecto (control o tratado). Una vez utilizado el insecto en un ensayo, éste fue descartado para futuros experimentos.

El ensayo de control se realizó con dos trozos de papeles de filtro limpios colocados en los viales situados a los extremos de cada brazo del olfatómetro (n= 64). Para evitar posibles contaminaciones, los viales se limpiaron con etanol 96% entre ensayos consecutivos y todo el dispositivo se limpió con etanol 96% antes de comenzar la sesión experimental y después de 4 ensayos.

Las muestras eran intercambiadas de lado entre cada réplica, para evitar un sesgo de direccionalidad.

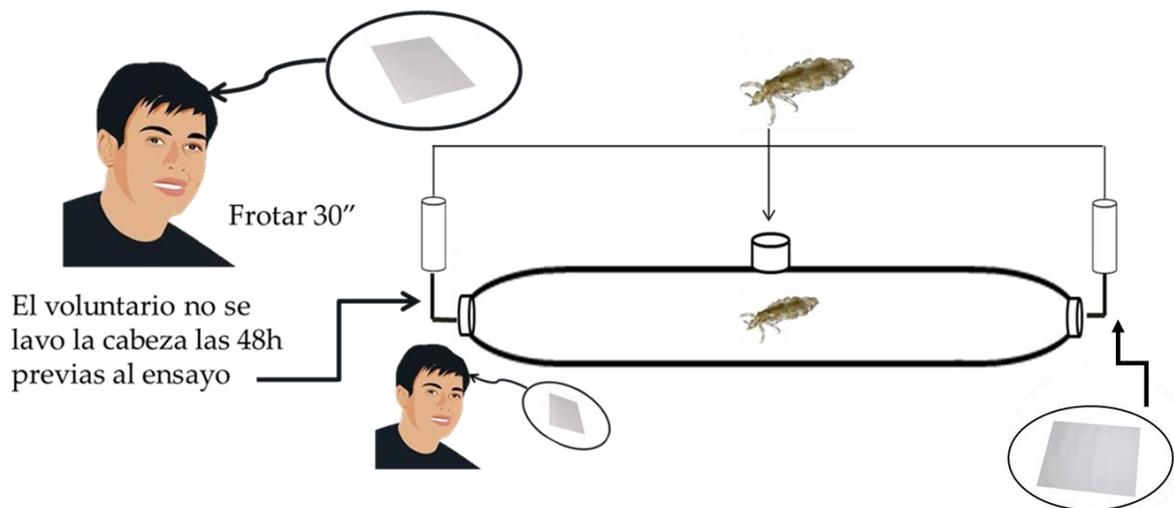


Figura 15. Esquema simplificado de la evaluación de la respuesta de *P. humanus capitis* a los componentes volátiles del cuero cabelludo humano.

#### Colecta de volátiles del cuero cabelludo para análisis químico

La colecta de los componentes volátiles del cuero cabelludo humano para el análisis químico, se realizó sobre el mismo individuo (joven adulto masculino) que se evaluó la respuesta comportamental de los piojos. Para ello, se cubrió la parte superior de la cabeza con una bolsa de horno (30 cm x 45 cm. B.P Premium, Argentina) previamente acondicionada a 180 °C. La bolsa se fijó con bandas elásticas sobre la superficie de la cabeza y se mantuvo así durante una hora. El voluntario realizó actividad física moderada durante 10 minutos para estimular la generación de los compuestos volátiles. Posteriormente, y en una habitación acondicionada a temperatura constante (30°C), se insertó una fibra adsorbente SPME de tres componentes (DVB / CAR / PDMS, Supelco, Bellofonte, PA, USA) y se expuso la fase activa dentro de la bolsa y se mantuvo durante 15 minutos. La fibra se fijó a una base para mantenerla en posición con la cabeza (Figura 16). La colecta de volátiles se realizó por duplicado.



Figura 16. 1) Dispositivo SPME (DVB / CAR / PDMS, Supelco, Bellefonte, PA, USA) utilizado para coleccionar los volátiles generados por el cuero cabelludo. 2) metodología utilizada para la recolección de los compuestos volátiles.

### **Análisis químico de los compuestos volátiles de la cabeza**

Los volátiles coleccionados se analizaron mediante un cromatógrafo gaseoso con detector de masas Shimadzu QP2010-Ultra (CG-EM) (Figura 17). El CG estaba equipado con una columna capilar DB-WAX polar (30 m; 0,32 mm i.d; d.f 0,25  $\mu$ m, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) con Helio como fase móvil (flujo total 4,82 ml/min). La fibra se insertó en el inyector CG en modo Splitless a 240 °C. La temperatura del horno GC se programó desde 50 °C (4 min de espera), seguido de una rampa de 8 °C por minuto hasta 230 °C, condición en que se mantuvo isotérmica durante 5 min.

El detector fue fijado a 70 eV, el escaneando del detector en el rango de 40 m/z a 350 m/z, y la temperatura de interfaz a 245 °C. La caracterización química de los compuestos volátiles individuales se realizó por al menos dos de los siguientes métodos:

- 1) Utilizando una muestra de referencia estándar.
- 2) Comparando su índice de retención (IR) con datos de la literatura
- 3) Comparando el análisis del espectro de masas (EM) frente a la biblioteca de espectros de masas de Wiley (Mc Lafferty et al., 2005).

Los métodos utilizados en cada caso están aclarados en la tabla de resultados.



Figura 17. Esquema de obtención de los componentes volátiles del cuero cabelludo y posterior análisis mediante CG-EM.



Figura 18. Equipo de cromatografía gaseosa asociada a un detector de masas, marca Shimadzu QP-2010-ULTRA

En cada cromatograma se eliminaron los picos correspondientes a posibles contaminantes: siloxano de columnas, septas, productos cosméticos y productos de aire ambiente (por ejemplo, 2-butoxietanol). Las intensidades de los picos restantes se normalizaron, dividiéndolos por la suma de todas las intensidades de los picos.

### **Bioensayo de comportamiento con los compuestos volátiles individuales mayoritarios**

Para evaluar la respuesta de los piojos a los componentes individuales mayoritarios detectados en el análisis químico, se prepararon soluciones de cada uno de ellos en acetona en concentraciones 0,001- 0,01- 0,1 y 1 mg/ml. Volúmenes de 10  $\mu$ l de cada dilución se distribuyeron uniformemente en cuadrados de papeles de filtro (Whatman

N°1; 1,5 cm de lado) para obtener masas finales de 0,01- 0,1- 1 y 10 µg respectivamente del compuesto activo en el papel de filtro.

La preferencia de los piojos hacia cada masa de compuesto en el papel de filtro, se determinó en el olfatómetro frente a papeles de filtro sólo con acetona (sin compuesto activo). En el ensayo control, se colocaron papeles de filtro tratados con acetona en ambos brazos del olfatómetro (Figura 19).

Con los datos de la preferencia de los piojos a las distintas masas de los componentes, se realizaron curvas dosis-respuesta para determinar el efecto de la masa en la probabilidad de elección del piojo.

Se realizaron 12 réplicas para cada masa evaluada de los compuestos puros.

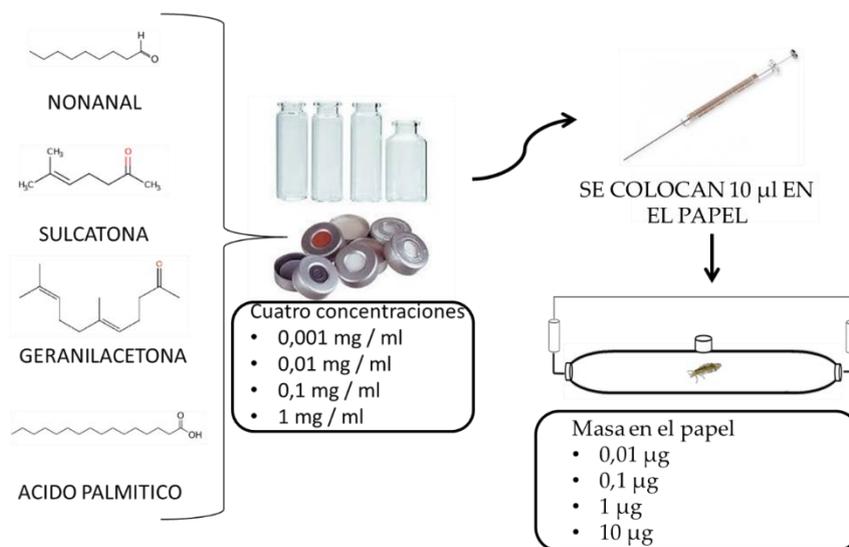


Figura 19. Esquema de evaluación individual de los componentes mayoritarios del cuero cabelludo en el olfatómetro.

## **Análisis estadístico de los datos**

Los datos binarios (preferencia o no preferencia) obtenidos mediante el olfatómetro, se analizaron utilizando un modelo lineal generalizado (GLM) con una estructura de error binomial (distribución de Bernoulli) y función de enlace logit (Zuur et al., 2009). Todos los análisis se realizaron utilizando lme4: efectos mixtos lineales (Bates et al. 2013) y paquetes MASS (Venables y Ripley 2002) del software R (R Core Team 2013).

Los supuestos de aleatoriedad y observaciones independientes se garantizaron con el diseño experimental (cada piojo se asignó a un único ensayo). La ausencia de valores atípicos se estableció a partir de los gráficos de predicción de residuales de Pearson, y la ausencia de *outliers* se verificó en el gráfico de Cook, donde los valores de distancia fueron  $\leq 1$ .

### **1.1.3 Resultados**

#### **Respuesta de piojos a los volátiles del cuero cabelludo humano**

Los piojos mostraron una atracción significativa hacia el brazo del olfatómetro que contenía el papel con muestra del cuero cabelludo ( $p = 0,002$ ) (Figura 20). La probabilidad de elección del modelo mostró diferencias significativas con el modelo nulo ( $p = 0.0014$ ).

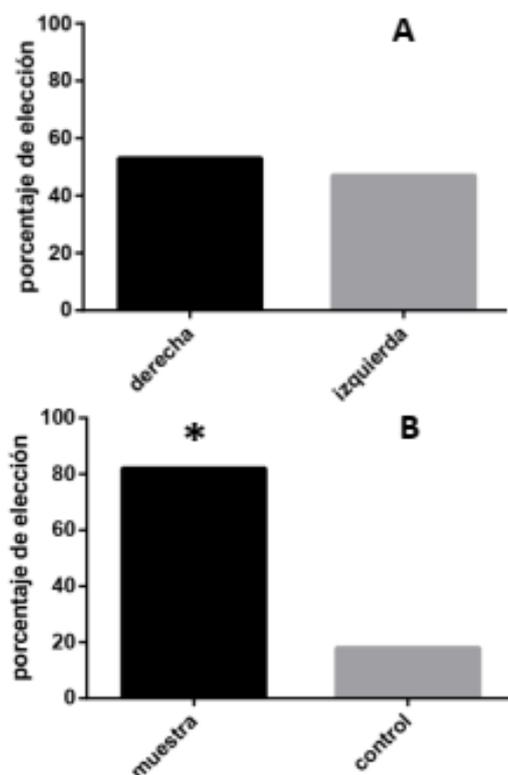


Figura 20. Efecto comportamental de los piojos de la cabeza frente a compuestos volátiles del cuero cabelludo A) Ensayo control B) preferencia hacia los compuestos volátiles del cuero cabelludo. \*Con diferencia significativa.

### **Análisis químico de los volátiles del cuero cabelludo humano**

Los compuestos volátiles del cuero cabelludo identificados mediante análisis de CG-EM se muestran en Tabla 1 y Figura 21. Los análisis revelaron altas proporciones (áreas relativas  $\geq 10\%$ ) de nonanal, sulcatona, ácido palmítico, y geranilacetona (Figura 21). Los compuestos presentes en proporciones menores (áreas relativas entre 1 y 10%) fueron octanal, decanal, 2,6-dimetil-7-octen-2-ol (Mircenol), ácido propanoico, ácido 3-metilbutanoico (ácido isovalérico), 2-ácido etil-hexanoico, ácido octanoico, ácido nonanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido pentadecanoico, ácido

hexadecanoico, 1-dodecanol, 1-tetradecanol, 1-hexadecanol, 1-octadecanol. Se encontraron dos compuestos en proporciones  $\leq 1\%$ : ácido isobutírico y un ácido insaturado de 18 carbonos (probablemente ácido 6-octadecenoico, aunque el espectro de masas no definió la exacta posición del doble enlace) (Tabla 1).

	NOMBRE	ÁREA RELATIVA	INDICE DE KOVATS RELATIVO	INDICE DE KOVATS LITERATURA	REFERENCIA
1	octanal (a)(b)	**	1275	1277	Khan and Verma et al. (2009)
2	sulcatona (a)(b)	***	1306	1318	Yamaguchi et al. (1981)
3	nonanal (a)(b)	***	1356	1350	Yamaguchi et al. (1979)
4	ácido acético (a)(b)	**	1435	1433	Gancel, Ollitrault, et al., (2005)
5	mircenol (a)(b)	**	1450	1455	V.I.Babushok et al (2011)
6	decanal (a)(b)	**	1455	1448	Yamaguchi et al (1979)
7	ácido propanoico (a)(b)	**	1489	1486	Shibamoto et al., (1981)
8	ácido isobutírico (a)(b)	*	1582	1587	Viña and Murillo, et al (2003)
9	ácido 3-metil butanoico (a)(b)	**	1620	1623	Shibamoto et al., (1981)
10	ácido hexanoico (a)(b)	**	1803	1836	V.I.Babushok et al (2011)
11	geranilacetona (a)(b)	***	1814	1816	Yamaguchi et al. (1981)
12	ácido 2-etil hexanoico (b)	**	1906	1910	V.I.Babushok et al (2011)
13	1-dodecanol (a)(b)	**	1976	1967	V.I.Babushok et al (2011)
14	ácido octanoico (a)(b)	**	2042	2050	Rezende and Fraga, et al (2003)
15	ácido nonanoico (a)(b)	**	2142	2156	Tatsuka, Suekane, et al. (1990)
16	1-tetradecanol (a)(b)	**	2145	2140	Hanai and Hong, et al (1989)
17	ácido decanoico (a)(b)	**	2269	2273	V.I.Babushok et al (2011)
18	1-hexadecanol (a)(b)	**	2347	2342	V.I.Babushok et al (2011)
19	ácido dodecanoico (a)(b)	**	2482	2486	V.I.Babushok et al (2011)
20	1-octadecanol (a)(b)	**	2578	2586	V.I.Babushok et al (2011)
21	ácido tetradecanoico (a)(b)	**	2662	2686	V.I.Babushok et al (2011)

22	ácido pentadecanoico (a)(b)	**	2820	2822	V.I.Babushok et al (2011)
23	Ácido palmítico (a)(b)	***	2901	2910	V.I.Babushok et al (2011)
24	6-ácido octadecenoico (a)(b)	*	2919	-	Khan and Verma et al. (2009)

Tabla 1. Compuestos volátiles detectados en el cuero cabelludo humano mediante análisis CG-EM. Proporciones basadas en área relativa. \*\*\* mayor al 10%; \*\* 1% a 10%; \* menor del 1%, (a) comprobado contra patrón estándar (b) similitud mayor al 92% comparado con la biblioteca Wiley.

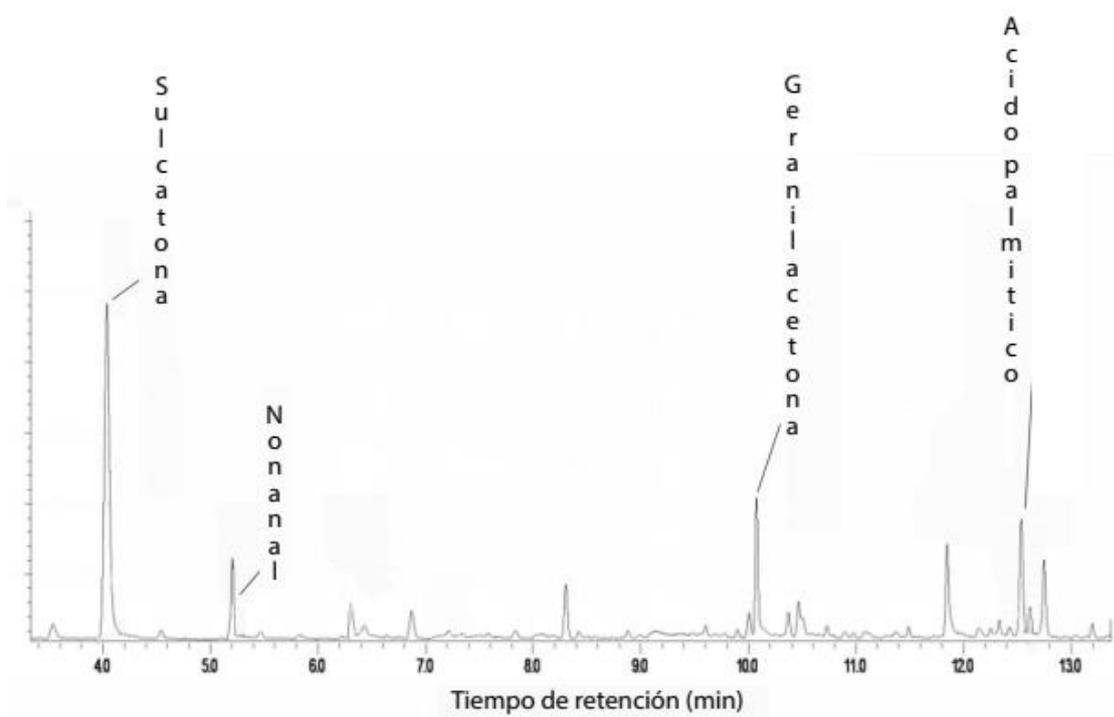


Figura 21: Cromatograma de compuestos volátiles recolectados del cuero cabelludo mediante micro extracción en fase sólida (SPME). Sulcatona, nonanal, geranilacetona y ácido palmítico fueron los compuestos mayoritarios.

## Bioensayo con los compuestos mayoritarios individuales

La respuesta de los piojos frente a distintas masas de los compuestos principales puros se muestra en la Figura 22. Para los compuestos sulcatona, nonanal y geranilacetona (Figura 22 a, b, c) la atracción (probabilidad de elección) disminuyó a medida que aumenta la masa, mientras que para el ácido palmítico se observó el efecto contrario, es decir a mayores masas, mayor atracción de los piojos (Figura 22 d).

Sólo se encontró diferencia significativa con el control para la dosis más alta de nonanal ( $p < 0,05$ ). Para este compuesto, se estableció una respuesta diferente frente a diferentes concentraciones del compuesto, siendo repelente a alta concentraciones y atrayente a concentraciones más bajas.

La probabilidad de elección del modelo ~masa de nonanal difería significativamente del modelo nulo ( $p = 0.0016$ ). A continuación, se muestran las ecuaciones de curvas dosis-respuesta para cada compuesto evaluado.

Sulcatona: Probabilidad de elección =  $e^{0.51240-0.12501 * \text{masa}} / 1 + e^{0.51240-0.12501 * \text{masa}}$  (Eq.1)

Nonanal: Probabilidad de elección =  $e^{0.79028-0.24260 * \text{masa}} / 1 + e^{0.79028-0.24260 * \text{masa}}$  (Eq.2)

Geranilacetona: Probabilidad de elección =  $e^{0.15706-0.08934 * \text{masa}} / 1 + e^{0.15706-0.08934 * \text{masa}}$  (Eq.3)

Ácido palmítico: probabilidad de elección =  $e^{-0.25174 + 0.06068 * \text{masa}} / 1 + e^{-0.25174 + 0.06068$

\* masa (Eq.4)

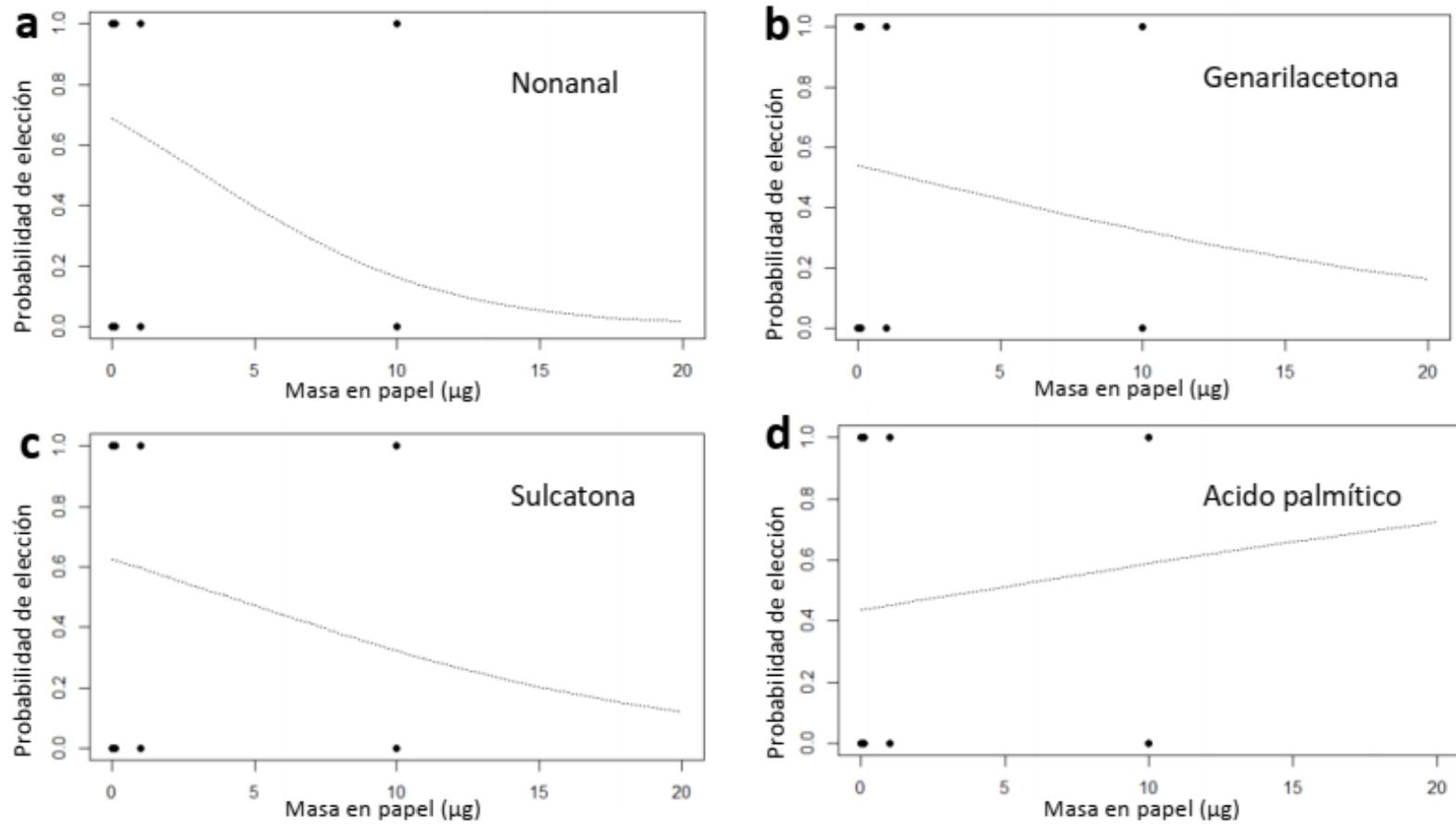


Figura 22. Curvas de dosis-respuesta de compuestos principales puros. El modelo logístico evalúa la probabilidad de elección en función de la masa de los cuatro compuestos. a) sulcatona, b) nonanal, c) geranilacetona, d) ácido palmítico.

#### 1.1.4 Discusión

Los resultados obtenidos representan la primera evidencia de atracción de los piojos de la cabeza hacia los compuestos volátiles del cuero cabelludo humano. Efectos similares se observaron en otros ectoparásitos, como las garrapatas *Boophilus microplus* e *Ixodes ricinus*, quienes tienen la posibilidad de reconocer los compuestos químicos relacionados con el hospedero (Osterkamp et al. 1999). En ese estudio, los autores demostraron que ambas especies de garrapatas tenían una respuesta de atracción a olores de diferentes mamíferos, y en el caso de *B. microplus* observaron una atracción mayor por los olores de bovinos, adjudicando esta preferencia de los insectos hacia su único hospedador.

El efecto del olor *total* del cuero cabelludo (volátiles + menos volátiles) sobre el comportamiento de los piojos, fue presentado recientemente por nuestro laboratorio (Ortega-Insaurralde et al. 2016). En este trabajo se demostró en una arena experimental, un efecto de arresto de los insectos expuestos a papeles muestras obtenida del cuero cabelludo humano (de diferentes edades y sexo). En otras palabras, los papeles con compuestos del cuero cabelludo indujeron a los piojos a disminuir la actividad locomotora promedio hasta detenerse sobre el papel tratado, probablemente debido a la asociación entre el humano y la fuente de alimento. Es importante mencionar que ese estudio no analizó por separado la respuesta hacia componentes más volátiles del cuero cabelludo humano, sino sólo al olor total.

Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral y los resultados anteriores de nuestro laboratorio, podríamos inferir que los piojos de la cabeza son en primera instancia atraídos por compuestos volátiles del cuero cabelludo

humano, y que a continuación, se produciría una disminución de actividad locomotora cuando este confirma la presencia del hospedador mediante claves químicas.

Los resultados del análisis químico mostraron que los compuestos mayoritarios fueron sulcatona, nonanal, geranilacetona y ácido palmítico. Aunque estos compuestos poseen diferentes fuentes, es bien conocida su presencia en las secreciones humanas (Penn et al., 2007; Gallagher et al., 2008).

La respuesta de los insectos hacia los componentes volátiles mayoritarios del cuero cabelludo humano varió en función de las masas utilizadas, es decir que los piojos fueron atraídos o repelidos dependiendo de la masa de compuesto evaluada. Por ejemplo, la respuesta de los piojos hacia el nonanal depende de la masa en una manera bimodal: es repelente a altas concentraciones y atrayente a bajas concentraciones. A diferencia de otros compuestos, este aldehído produjo respuestas significativamente diferentes con respecto al control a alta y baja concentración.

El nonanal fue previamente descrito como un componente activo para diferentes artrópodos hematófagos, como en los mosquitos *Anopheles gambiae* (Meijerink et al., 2000) y *A. aegypti* (Ghaninia et al., 2008; Logan et al., 2010), las moscas tse-tse *Glossina spp* (Gikonyo et al., 2002), el vector de Chagas *T. infestans* (Guerenstein y Guerin, 2001), la mosca *Culicoides impunctatus* (Logan et al., 2009), y las chinches de cama, *Cimex lectuarius* (Harraca et al., 2012). Mostrando distintos tipos de respuestas. Haciendo referencia a los piojos de la cabeza Peock y Maunder (1993) establecieron la primera respuesta hacia un aldehído (piperonal), mostrando que los insectos eran repelidos cuando fueron evaluados en una arena experimental.

Además, el nonanal es un compuesto químico comúnmente asociado a los vertebrados, de alta variabilidad entre diferentes individuos y posiblemente asociado a las respuestas diferenciales de los insectos hacia los vertebrados. De ahí la importancia de medir la bioactividad de esta sustancia en diferentes concentraciones. Nuestros resultados también sugieren que, si los piojos tienen receptores de aldehídos, un pequeño aumento/disminución en la presencia de este compuesto dentro del rango endógeno del humano, podría generar que los piojos seleccionen un huésped apropiado para alimentarse o para establecer la colonia.

Con respecto a la sulcatona, uno de los compuestos mayoritarios y el más volátil, está presente también en la parte superior de la espalda y el antebrazo (Gallagher et al., 2008). En otros artrópodos hematófagos, como *C. lectularis* (Harraca et al 2012) y *A. aegypti*, se ha observado una correlación entre las concentraciones endógenas de sulcatona y la susceptibilidad del hospedero (Logan et al., 2008). En otros hematófagos, como el mosquito *Culicoides impunctatus*, se observó una repelencia significativa a las mezclas que incluyen sulcatona (Logan et al., 2009). A diferencia del nonanal, nuestros resultados no demostraron una respuesta significativa de atracción/repelencia dosis-dependiente, aunque sí hubo una clara tendencia descendente en la probabilidad de elección para las masas más altas, lo que sugiere repelencia incipiente (Figura 22.a). Probablemente, la alta volatilidad de la sulcatona produjo una disminución en su concentración durante el ensayo afectando la elección final.

La geranilacetona produjo una respuesta de comportamiento similar a la sulcatona (Figura 22.c), mostrando poca atracción a masas bajas y una tendencia de repelencia en masas altas. Existe poca información bibliográfica que asocia este compuesto con

insectos hematófagos. Uno de estos estudios demostró por método electro-antenográfico que la geranilacetona era un estimulante olfativo para los mosquitos del género *Anopheles* (Meijerink et al., 2000). Otro estudio demostró el efecto repelente sobre *C. impunctatus* cuando la geranilacetona se mezclaba con la sulcatona, a pesar que el compuesto individual no había mostrado una actividad de repelencia (Logan et al., 2009).

El ácido palmítico mostró también respuesta bimodal, pero a diferencia del nonanal, sulcatona y geranilacetona, fue más repelente a bajas concentraciones que a altas (Figura 22.d). Este compuesto es uno de los principales y de menor volatilidad de los secretados por las glándulas sebáceas (Gallagher et al., 2008). Su actividad sobre distintos insectos es variada. En *A. gambiae* no se observó respuesta (Knols et al., 1997), pero en *Ae. aegypti* y *Culex quinquefasciatus* se registró atracción media cuando estaba asociado con la sangre (Allan et al., 2005).

En conclusión, hemos establecido una respuesta de atracción a la mezcla de compuestos volátiles generados por el cuero cabelludo humano, dentro de condiciones de laboratorio, así como una respuesta diferencial hacia los componentes mayoritarios individuales. Un hallazgo significativo de nuestro estudio fue demostrar que la actividad de nonanal depende de la concentración del compuesto, provocando repelencia a altas concentraciones y atracción a bajas. También demostramos una tendencia similar en la respuesta comportamental de la sulcatona y la geranilacetona en piojos. Para futuras investigaciones se propone evaluar el efecto de mezclas de los compuestos volátiles para determinar si existen interacciones sinérgicas o antagonistas, como se ha demostrado en otros insectos (Barrozo et al., 2004; Logan et al., 2010).

Los resultados de esta sección permiten avanzar en el conocimiento de los mecanismos del piojo para reconocer un posible hospedero utilizando señales químicas. De todos modos, el mecanismo completo por el cual el piojo selecciona su huésped necesita más estudios, ya que probablemente involucran más sistemas que el olfativo.

## **1.2. Análisis comparativo de la composición química y bioactividad de los volátiles de individuos infestados y no infestados.**

### **1.2.1 Introducción**

Dentro de una población determinada, existen diferencias en la tasa de infestación de individuos, siendo los niños de edad escolar los más afectados por la pediculosis (Gratz 1997). En un estudio realizado sobre 1800 niños infestados en escuelas de Buenos Aires, Argentina, se encontró que el 37.82% correspondía a niños y 53.07% correspondía a niñas dentro de un mismo rango etario (Tolozá et al., 2009). Esta misma tendencia ha sido reportada en niños de otros países como el Reino Unido, Australia, Sudáfrica, Turquía, y Brasil (Downs et al. 1999; Speare y Buettner 1999; Govere et al. 2003; Kokturk et al. 2003; Heukelbach et al. 2005). Estas diferencias en las tasas de infestación se relacionaron con el comportamiento de las niñas quienes pasan más tiempo en estrecho contacto entre sí (respecto a los niños) y de esta manera facilitan la transmisión cabeza a cabeza. Este contacto directo cabeza-cabeza se considera como la principal vía de transmisión de piojos, a pesar que se reconocen otras rutas de contagio pasivas y relevantes a través de las acciones de peinado, movimientos de aire, uso de toallas, etc. (Takano-Lee et al. 2005).

En el caso de otros insectos hematófagos, se demostró que los individuos más susceptibles a ser picados por mosquitos presentaban un perfil químico de compuestos de la piel diferente al de los individuos menos susceptibles a las picaduras. Es decir que algunos sujetos estarían emitiendo sustancias que actúan como atractantes o como repelentes según el caso. Por otro lado, estudios de laboratorio realizados con las sustancias de la piel aisladas, demostraron que un mismo compuesto puede generar una

respuesta de atracción o repelencia del insecto dependiendo de la concentración. Este fenómeno se ha estudiado ampliamente en insectos vectores de enfermedades como los mosquitos (Leal et al 2017).

En esta parte del trabajo, habiendo demostrado que los piojos de la cabeza responden a los volátiles del cuero cabelludo humano, junto con estudios anteriores que demostraron no haber diferencias entre edades y sexos en el momento que los piojos reconocen al hospedero (Ortega-Insaurralde et al 2017), el objetivo de esta sección fue establecer posibles diferencias en la composición química del olor del cuero cabelludo (volátiles) entre individuos infestados y no infestados.

### **1.2.2 Materiales y Métodos**

#### **Insectos**

Los insectos fueron colectados y clasificados según lo descrito en materiales y métodos de la sección 1.1.2. Para esta sección se utilizaron piojos hembras para estandarizar el material biológico.

#### **Sustancias Químicas**

Los siguientes compuestos se utilizaron como patrones estándares para el análisis químico: octanal (>99%), nonanal (>99%), decanal (>99%), undecanal (≥99%), sulcatona (>99%), ácido hexadecanoico (>99%) y geranilacetona (>99%), 2,6-dimetil 7-octen-2-ol-

(Mircenol) (>98%), ácido acético glacial ( $\geq 95$ ), ácido propanoico (>98%), ácido butanoico (ácido isovalérico) (>99%), ácido butanoico (>99%), ácido palmitico (>99%), ácido 2-etil hexanoico (>99%), ácido octanoico (>99%), ácido nonanoico (>99%), ácido decanoico (>99%), ácido dodecanoico (>99%), ácido tetradecanoico (>99%), ácido pentadecanoico (>99%), ácido hexadecanoico (>99%). y los estándares de alcanos (C5-C30) (>99%) (Sigma-Aldrich. St. Louis. MO. U.S.A.).

El escualeno fue una muestra de prueba ofrecida por Shimadzu (Kioto, Japon). Los alcoholes primarios 1-hexanol (>95%), 1-octanol ( $\geq 95$ %), 1-dodecanol (>95%), 1-tetradecanol (>95%), 1-hexadecanol (>95%), 1- octadecanol (>95%) fueron adquiridos en Polysciences Corp (Valley Road Warrington, Pennsylvania, U.S.A.).

### **Colecta de volátiles en diferentes individuos: análisis químico y respuesta comportamental**

La posible diferencia entre los hospederos fue analizada sobre 6 voluntarios clasificados como individuos infestados (con piojos en el momento de los análisis) y no infestados (no infestados los últimos 10 años). Las metodologías utilizadas para coleccionar los compuestos y medir la respuesta biológica de los insectos fueron detalladas previamente (materiales y métodos 1.1.2).

## **Análisis comparativo de los volátiles del cuero cabelludo entre individuos infestados y no infestados**

El análisis cuali-cuantitativo de los compuestos volátiles de los individuos infestados (6 niños) y los no infestados (6 adultos), se realizó con un cromatógrafo gaseoso con detector de masas (CG-EM), según las condiciones informadas en la sección de materiales y métodos 1.1.2.

## **Respuesta comportamental a los volátiles del cuero cabelludo de individuos infestados y no infestados**

Para evaluar la respuesta de los piojos a los volátiles de los individuos infestados y no infestados, se utilizó el olfatómetro de doble opción descrito en la sección de materiales y métodos (1.1.2), colocado en una cámara con humedad y temperatura controladas y óptimas para la locomoción de los piojos.

Considerando que no se observó diferencia en la composición química de los compuestos volátiles de los individuos analizados (infestados y no infestados) (ver resultados), se seleccionó un individuo de cada grupo para la evaluación de la respuesta comportamental de los piojos. Para ello, se colocó en un brazo del olfatómetro un papel de filtro con la muestra del individuo del grupo infestado, y en el otro brazo un papel de filtro con la muestra del individuo del otro grupo. Se evaluó la atracción preferencial de los piojos hacia uno de los olores humanos. Para cada ensayo y sus respectivos controles se utilizaron 20 piojos.

## **Análisis estadístico**

La preferencia en la elección de los piojos hacia el olor del individuo infestado o hacia el no infestado, se analizó mediante un modelo lineal generalizado (GLM) con una estructura de error binomial (distribución de Bernoulli) y función de enlace logit (Zuur et al., 2009). El análisis se realizó utilizando lme4: efectos mixtos lineales (Bates et al. 2013) y paquetes MASS (Venables y Ripley 2002) del software R (R Core Team 2013). Los supuestos se probaron por el diseño experimental, la predicción de Pearson se utilizó para evaluar valores atípicos, y la ausencia de valores fuera del rango se verificó con el gráfico de Cook, donde los valores de distancia siempre fueron  $\leq 1$ .

### **1.2.3 Resultados**

#### **Análisis comparativo de los volátiles del cuero cabelludo entre individuos infestados y no infestados**

No se observaron diferencias cualitativas o cuantitativas entre los compuestos emitidos por individuos infestados y no infestados, que presentaron una respuesta de atracción a los piojos (resultados 1.1.3) (Tabla 2). En todos los casos, los aldehídos y la sulcatona se encontraron en proporción mayoritaria. Comparando los perfiles de ambos grupos, encontramos mayor número de compuestos ácidos y mayor proporción en los individuos no infestados.

N° PICO	COMPUESTOS	No infestados			Infestados		
		1	2	3	1	2	3
1	octanal (a)(b)(c)	**	**	**	**	**	**
2	sulcatona (a)(b)(c)	***	***	***	***	***	***
3	1-hexanol (a)(b)(c)	*	-	-	-	-	-
4	nonanal (a)(b)(c)	***	***	***	***	***	***
5	tetradecano (a)(b)(c)	-	-	-	-	-	*
7	6-metil 5-hepten-2-ol (a)(b)(c)	**	-	-	-	**	*
8	ácido acético (a)(b)(c)	**	**	***	**	**	-
9	2.6-dimetil 7-octen-2-ol. (a)(b)	-	*	**	**	-	**
10	decanal (a)(b)(c)	***	***	***	***	***	***
11	ácido propanoico (a)(b)(c)	*	*	**	*	-	-
14	3,7-dimetil 1,6-octadien-3-ol (a)(b)	-	-	**	**	-	*
15	ácido 2-metil-propanoico (a)(b)	-	**	**	-	**	*
16	1-octanol (a)(b)(c)	-	-	-	**	**	-
17	6-metil-3,5-heptadien-2-ona (a)(b)	-	-	-	-	-	**
19	undecanal (a)(b)(c)	-	-	-	-	**	*
20	ácido butanoico(a)(b)(c)	*	**	-	*	-	-
21	1,2-hexanediol (a)(b)	-	-	-	-	-	**
22	ácido 3-metil- butanoico (a)(b)(c)	**	**	**	-	*	*
23	2-decen-1-ol (a)	-	*	-	-	-	-
24	1-nonanol (a)(b)(c)	*	-	-	*	-	-
25	2-undecanal (a)(b)	-	**	-	*	-	-
26	3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (a)	-	-	-	*	**	-
27	3,7-dimetil- 6-octen-1-ol- (a)(b)	*	*	*	**	*	-
28	acido 4-metil -pentanoico. (a)(b)	-	**	-	-	-	-
29	6-metil-2,4-heptanediona. (a)(b)	-	-	-	-	-	*
30	ácido hexanoico (a)(b)(c)	**	***	**	*	*	-
31	geranilacetona (a)(b)(c)	***	**	***	**	**	**
32	ácido 2-etil-hexanoico. (a)(b)(c)	-	*	**	-	*	-
33	ácido heptanoico (a)(b)(c)	-	**	*	-	-	-
34	1-dodecanol (a)(b)(c)	-	**	**	**	**	**
35	ácido octanoico (a)(b)(c)	**	***	**	**	*	**
36	ácido nonanoico (a)(b)(c)	**	***	*	**	*	*

37	1-tetradecanol (a)(b)(c)	*	*	-	**	-	-
38	1-hexadecanol (a)(b)(c)	-	**	**	**	**	-
39	ácido dodecanoico (a)(b)(c)	*	**	*	**	-	-
40	1-octadecanol (a)(b)(c)	-	-	**	-	*	*
41	ácido tetranoico (a)(b)(c)	**	*	*	*	-	*
42	ácido pentadecanoico (a)(b)(c)	*	*	*	*	-	-
43	ácido hexadecanoico (a)(b)(c)	**	**	***	**	**	-
44	escualeno (a)(b)(c)	-	-	-	-	-	**

Tabla 2: Identificación de los volátiles generados por el cuero cabelludos de 6 voluntarios (3 infestados y 3 no infestados). Las cantidades de cada compuesto son estimadas por las áreas relativas de los picos. \*\*\*porcentaje de área mayor al 10%, \*\*porcentaje de área entre 1 a 10 %, \* porcentaje de área menor a 1%. (a) similitud entre la muestra y la biblioteca Wiley mayor al 92% (b) similitud entre índice de Kovats de referencia y (c) obtenido por comparación contra patrones estándar.

### **Respuesta comportamental de los piojos a volátiles de individuos infestados y no infestados**

Los resultados obtenidos no permitieron establecer preferencia de los piojos de la cabeza hacia los volátiles de individuos infestados sobre los no infestados (Figura 23).

En cambio, en los ensayos cuya opción fue olor humano indistintamente del grupo evaluado o papel control, los insectos se orientaron preferencialmente hacia el brazo del olfatómetro en donde se encuentra la muestra. Es decir que como demostramos anteriormente, los piojos prefieren el olor de la cabeza frente a olores neutros, independientemente que el individuo este infestado o no infestado (Figura 23).

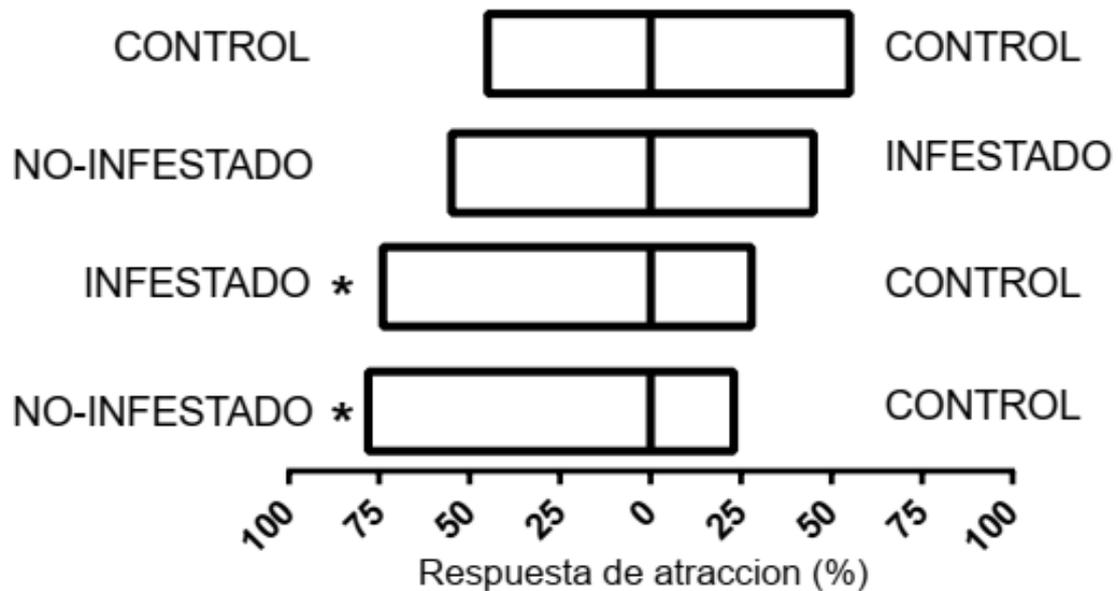


Figura 23. Ensayo de atracción en olfatómetro a volátiles de hospederos infestados y no infestados. Se muestra la probabilidad de elección de los piojos de la cabeza cuando fueron sometidos a diferentes estímulos. \*muestra con diferencias significativas.

#### 1.2.4 Discusión

##### **Análisis comparativo de los volátiles del cuero cabelludo de individuos infestados y no infestados**

Considerando que la tasa de infestación con piojos en niños en edad escolar es significativamente mayor que en individuos adultos, se analizaron de manera comparativa, los compuestos volátiles liberados por la cabeza de individuos infestados (niños) y no infestados (adultos).

De nuestro análisis químico no surgió una clara diferencia entre los grupos infestados y no infestados con respecto a los compuestos que mostraron una respuesta en los piojos (sección 1.1.3), en sendos análisis los aldehídos y la sulcatona fueron mayoritarios en

todos los casos. El mayor número de compuestos ácidos determinados en los individuos no infestados, se puede relacionar con los productos de excreción de glándulas sebáceas que están más activas durante la adultez que en la niñez (individuos no infestados). Estos compuestos ácidos representan una fracción menos volátil y por lo tanto poco representativa en el análisis de respuesta comportamental del piojo a los volátiles humanos.

Los compuestos volátiles identificados en el cuero cabelludo de ambos grupos coinciden con los reportes previos de bibliografía, siendo mayoritarios los aldehídos saturados como el nonanal, octanal y decanal. La producción de estos compuestos puede ser a través de la peroxidación lipídica de ácidos insaturados, por ende, es probable que aparezcan cantidades significativas, ya que el procedimiento de colecta incluye que los voluntarios no laven el cabello 48 horas previas al estudio.

### **Respuesta comportamental de los piojos a volátiles de individuos infestados y no infestados**

Los piojos no mostraron una preferencia significativa hacia los volátiles humanos de uno de los grupos analizados respecto al otro (infestados y no infestados). Este resultado se correlaciona con la similitud observada en los perfiles químicos de los volátiles de ambos grupos. Los compuestos mayoritarios en ambos grupos eran idénticos. A pesar de que los individuos no infestados (adultos) contenían una mayor cantidad de compuestos de carácter ácido que los infestados (niños), se consideró que este no debería ser un factor determinante en este estudio en olfatómetro debido a su baja volatilidad. Este resultado también coincide con los resultados obtenidos por Ortega-Insaurralde et al (2016), en

donde no vieron diferencia de atracción entre hospederos de distintos sexos y edades, aunque los autores solo analizaron muestras de compuesto totales de cuero cabelludo.

Dado que es un hecho que los niños sufren más infestación por pediculosis que los adultos, las principales causas podrían no estar relacionadas con los perfiles químicos del cuero cabelludo, sino con factores comportamentales y/ o culturales. Considerando que estos parásitos completan todo su desarrollo en el hospedador, diversos factores podrían determinar el establecimiento de la colonia, como la calidad del alimento y nidificación debido a diferencias fisiológicas entre adultos y niños. De este modo, la instalación de una colonia en una determinada cabeza podría deberse a factores múltiples que en nuestro trabajo no contemplamos.

### **1.3. Bio-actividad comparada y caracterización química de muestras de distintas partes del cuerpo**

#### **1.3.1 Introducción**

Los humanos pueden ser parasitados por tres especies de piojos que viven en distintas partes del cuerpo: *P. humanus capitis* y *P. humanus humanus* y *P. pubis*. Dos de ellas pertenecen al género *Pediculus* (*P. humanus capitis* y *P. humanus humanus*), tienen una gran similitud morfológica y genómica, pero desarrollan sus colonias en partes diferentes del cuerpo humano (Kirness et al 2010). Los piojos de la cabeza viven en la cabeza humana y pasan toda su vida en ella, mientras que los piojos del cuerpo viven en la ropa y se acercan al cuerpo para alimentarse. Con respecto al nicho ecológico, ambas especies prefieren diferentes condiciones de temperatura y humedad), es decir que ambas explotan áreas diferentes (Gallardo et al 2009).

A pesar de que la principal ruta de transmisión es el contacto de cabeza a cabeza, los piojos también pueden ser desalojados intencionalmente o accidentalmente de su huésped, lo que provoca una necesidad urgente de detectar a otro huésped (Takano-Lee et al 2005). En estas circunstancias, el mecanismo de orientación de los piojos hacia la cabeza humana no está claro. Una de las hipótesis más simples es el geotropismo negativo de los piojos, que se puede observar al transferir un piojo de la cabeza a la ropa y ver cómo sube al cuero cabelludo (Heukelbach, 2010).

En un estudio reciente, Ortega-Insaurralde et al (2016) analizaron en un ámbito experimental la respuesta de los piojos adultos a muestras de compuestos de la cabeza. Estos autores encontraron que los insectos fueron atraídos por la muestra humano y permanecieron en el área de la arena experimental tratada. Además, en nuestro trabajo

previo, observamos una clara atracción de los insectos hacia la mezcla de compuestos volátiles, así como a los principales compuestos individuales del olor de la cabeza.

En la presente sección intentamos averiguar si los piojos reconocen los compuestos emanados por distintas partes del cuerpo humano y si prefieren los de la cabeza sobre los de otras áreas del cuerpo.

### **1.3.2 Materiales y Métodos**

#### **Insectos**

Los insectos se recolectaron como se describió en la parte 1.1.2., y se utilizaron entre una y tres horas después de haber sido retirados del cuero cabelludo. Durante este tiempo, los insectos se mantuvieron en bandejas de plástico en una cámara ambiental que regula la humedad relativa (60–70%) y la temperatura ( $17 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Se seleccionaron hembras vitales (sin daño en las antenas y las patas) para su uso en el bioensayo. Se utilizaron hembras para la estandarización del material biológico.

#### **Sustancias químicas**

Los solventes metanol y acetona (99,8%) utilizados para la extracción de compuestos del papel de filtro se adquirieron en SINTORGAN (Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina).

Para la identificación de los compuestos detectados en el análisis químico, se utilizaron patrones estándares de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El escualeno fue una muestra ofrecida por Shimadzu (Kioto, japon)

### **Toma de compuestos volátiles de diferentes partes del cuerpo (pie, brazo y cabeza)**

La toma de muestra de los compuestos se realizó sobre un adulto joven masculino, quien se había higienizado 48 horas antes las diferentes partes a analizar (cabeza, pie y brazo). Las muestras se obtuvieron de acuerdo a lo detallado en la sección 1.1.2 (Mat y met). Brevemente, se utilizaron papeles de filtros cuadrados de 1,5 cm de lado que se frotaron suavemente sobre las partes del cuerpo a evaluar por un periodo de 30 segundos. Cada muestra obtenida se utilizó para un ensayo y luego se descartó.

### **Respuesta comportamental de los piojos a volátiles de las diferentes partes del cuerpo**

La respuesta de los piojos frente a los volátiles de diferentes partes del cuerpo (cabeza, brazo o pie), se evaluó mediante el olfatómetro de acuerdo a lo descrito en la sección 1.1.2 de Materiales y Métodos.

Para evaluar la atracción de los piojos a los volátiles de las distintas partes del cuerpo, cada papel de filtro con muestra de los compuestos de cabeza, brazo y pie, se introdujo en un vial de 2 ml y se colocó en uno de los brazos del olfatómetro. Un papel sin tratar se introdujo en el otro extremo (control). Los lados donde se colocaron las distintas muestras se intercambiaron alternativamente para evitar un sesgo de direccionalidad.

En cada ensayo, un piojo se introdujo individualmente a través de la abertura central del olfatómetro y a los 180 segundos se registró el lado seleccionado por el insecto.

Los tratamientos realizados y la cantidad de casos analizados fueron:

- Control vs control (n=30)
- Pie vs control (n=30)
- Brazo vs control (n=30)
- Cabeza vs control (n=30)
- Cabeza vs pie (n=30)
- Cabeza vs brazo (n=30)

Finalizado el tiempo del ensayo, se registró con el número uno (1) la elección del lado tratado, y con un número cero (0) la elección del lado no tratado (Figura 24)

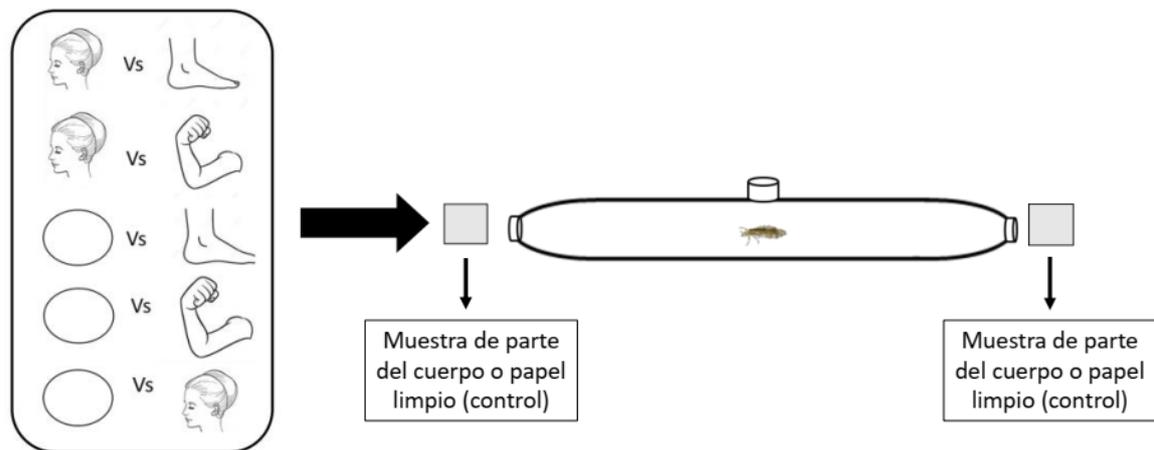


Figura 24. Esquema de evaluación de respuesta a los volátiles de las diferentes partes del cuerpo mediante un olfatómetro. A la izquierda de la figura se muestran los tratamientos realizados.

### Análisis estadístico

Para cuantificar los tratamientos (datos binarios) se utilizó un análisis mediante GLM (modelo lineal generalizado) con función de enlace logit y estructura de error binomial (distribución de Bernoulli) (Zuur et al. 2009). El diseño experimental aseguró los

supuestos de aleatoriedad y observaciones independientes, ya que los papeles tratados y de control se asignaron al azar como "derecho" o "izquierdo", y los piojos se usaron individualmente una vez. La ausencia de datos influyentes se verificó en el gráfico de Cook, donde los valores de distancia siempre fueron  $\leq 1$ , y la ausencia de valores atípicos se evaluó a partir de los residuales de Pearson frente a los gráficos de predicción.

### **Toma de muestra de compuestos totales de las diferentes partes del cuerpo para bioensayo**

El procedimiento de la colección de las muestras de compuestos de distintas partes del cuerpo fue similar al que se utilizó para la obtención de los compuestos volátiles, frotando papeles de filtro cuadrados (1,5 cm de lado) sobre cuero cabelludo, pie o brazo durante 30 segundos.

### **Diseño experimental para evaluar bioactividad de los componentes totales de las distintas partes del cuerpo**

La respuesta preferencial de los insectos hacia las muestras de cabeza, brazo o pie, se evaluó en una arena circular (5,5 cm diámetro), con papel de filtro en la base para facilitar la locomoción del piojo (Whatman 5.5 cm # 1). El papel de filtro fue dividido en dos áreas iguales. En cada área semicircular, se colocó un papel con muestra (tratado o no) dependiendo del ensayo. La arena estaba limitada por un anillo de vidrio de 50 mm de diámetro para evitar escapes de los insectos (Figura 25). Cada insecto se colocó en el centro de la arena, que se mantuvo bajo luz y temperatura controlada (21 lux, 30°C). Los

movimientos de los piojos se registraron con una cámara infrarroja durante 3 minutos y se grabaron en un video digital. Para los controles, se colocaron papeles sin tratar en ambas áreas de la arena.

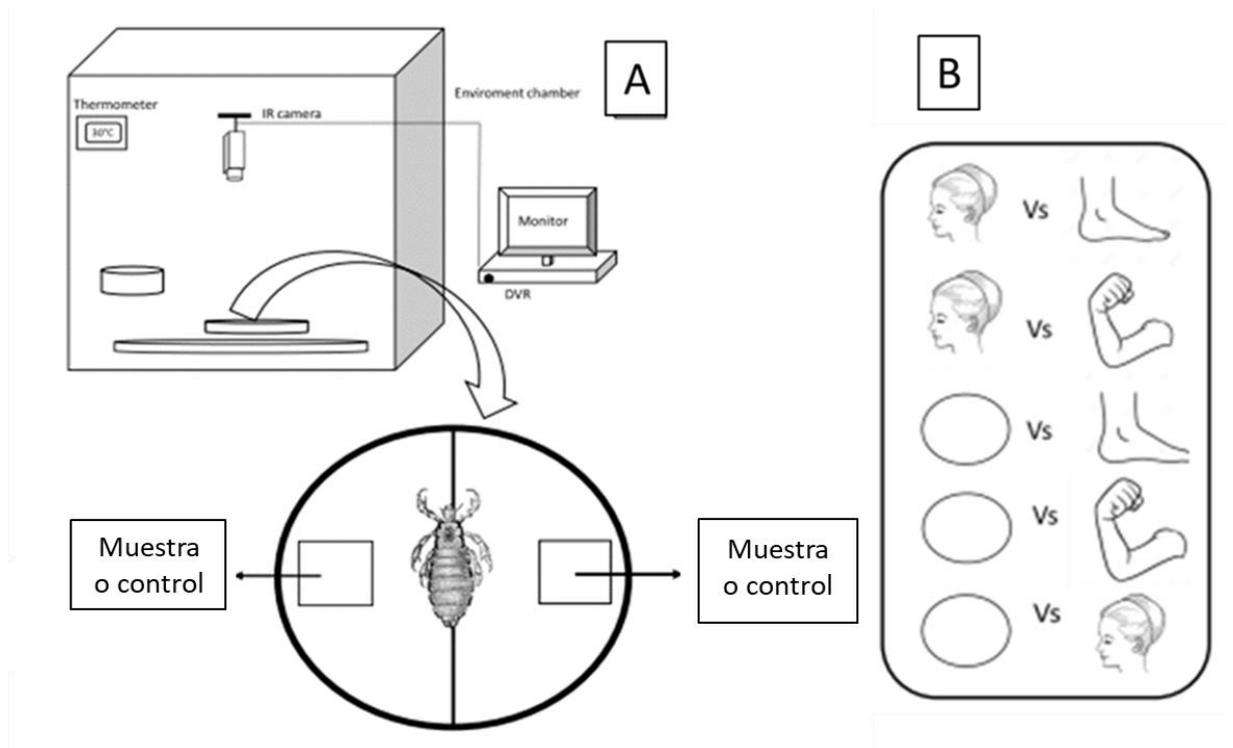


Figura 25. A. Esquema de evaluación de muestras con compuestos de diferentes partes del cuerpo, utilizando una arena experimental dividida en dos zonas simétricas B. Tratamientos realizados.

### **Obtención de los extractos para el análisis químico de los compuestos de distintas partes del cuerpo**

Los extractos a utilizar en el análisis químico, se obtuvieron aplicando 2 ml de una mezcla de metanol- acetona (1: 1) con una pipeta Pasteur de vidrio sobre la piel de la cabeza, pie (empeine) o brazo (antebrazo). Se realizaron 3 lavados consecutivos (de 2 ml cada

uno) en cada zona para asegurar la colecta de la mayoría de los compuestos de la piel. Los lavados se realizaron utilizando un cilindro de vidrio de 2,5 cm de diámetro para contener el solvente de lavado (Figura 26).

Cada extracto se centrifugó a 4.000 RPM para separar los componentes particulados, y luego se concentró por evaporación con nitrógeno hasta llegar al volumen de 50  $\mu$ l. La muestra se conservó en ultra freezer (-78 °C) hasta su análisis. Previo al análisis, el extracto se dejó llegar a temperatura ambiente y luego se inyectó en un CG-EM.



Figura 26: Obtención del extracto de los compuestos A. cabeza. B. pie C. brazo, utilizados en el análisis químico. El solvente utilizado fue acetona: metanol 1:1.

### **Análisis químico de los extractos de diferentes partes del cuerpo**

El análisis químico de los componentes presentes en los extractos de cabeza, pie y brazo, se realizó mediante un CG-EM (Shimadzu QP 2010 ultra). Se utilizó una columna DB-WAX (30 m- 0,25  $\mu$ m- 0,25  $\mu$ m) (Agilent, Santa Clara, California, USA).

La separación y el análisis de las muestras se realizó con el siguiente programa de temperatura: inicial 60°C por 4 min, luego una rampa de temperatura creciente de 6°C por min hasta llegar a 220°C, esta temperatura se mantuvo por 10 minutos, y finalmente una rampa 1°C por min hasta 245°C por 10 min.

El puerto de inyección se colocó a 240 °C. El gas portador helio se usó a una velocidad constante de flujo de columna de 1,4 ml/min.

La adquisición de datos y parámetros para el detector de masas se ajustó de la siguiente manera: rango de escaneo m /z 40 a m /z 350; temperatura de la interfase fue de 245 C°; temperatura de la fuente de iones 220C°; energía ionizante 70 eV.

La identificación de los compuestos se realizó utilizando estándares de referencia (Sigma-Aldrich. St Louis. MO. USA) y/o comparando el índice de retención (IR) con datos de la literatura y/o mediante la comparación y el análisis del espectro de masas (EM) frente a la biblioteca de espectros de masas de Wiley (Mc Lafferty et al., 2005). Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software Labsolution.

### **Análisis estadístico**

Para comparar la preferencia de los piojos hacia los extractos de distintas partes del cuerpo, se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para establecer la permanencia en los dos tratamientos (tratados vs control o tratados vs tratados). La

normalidad y la heterocedasticidad se determinaron gráficamente a través de la gráfica Q-Q y la gráfica de valores residuales frente a los valores predichos. Los paquetes lme4 (Bates et al. 2013) y MASS (Venables y Ripley 2002) fueron de R (R Core Team 2013).

### **1.3.3 Resultados**

#### **Respuesta comportamental a volátiles de las diferentes partes del cuerpo**

Los piojos mostraron claramente una preferencia significativa al sector del olfatómetro con muestras humanas (cabeza, brazo o pie) sobre el control (papel sin muestra) ( $P \leq 0,05$ ). Sin embargo, no mostraron una preferencia significativa a los volátiles de cabeza respecto a los volátiles de brazo o pie ( $P \geq 0,05$ ) (Figura 27).

Considerando que los insectos no mostraron una preferencia diferencial significativa hacia los volátiles de distintas partes del cuerpo, no fue de interés realizar el análisis químico de los volátiles generados por las diferentes partes del cuerpo.

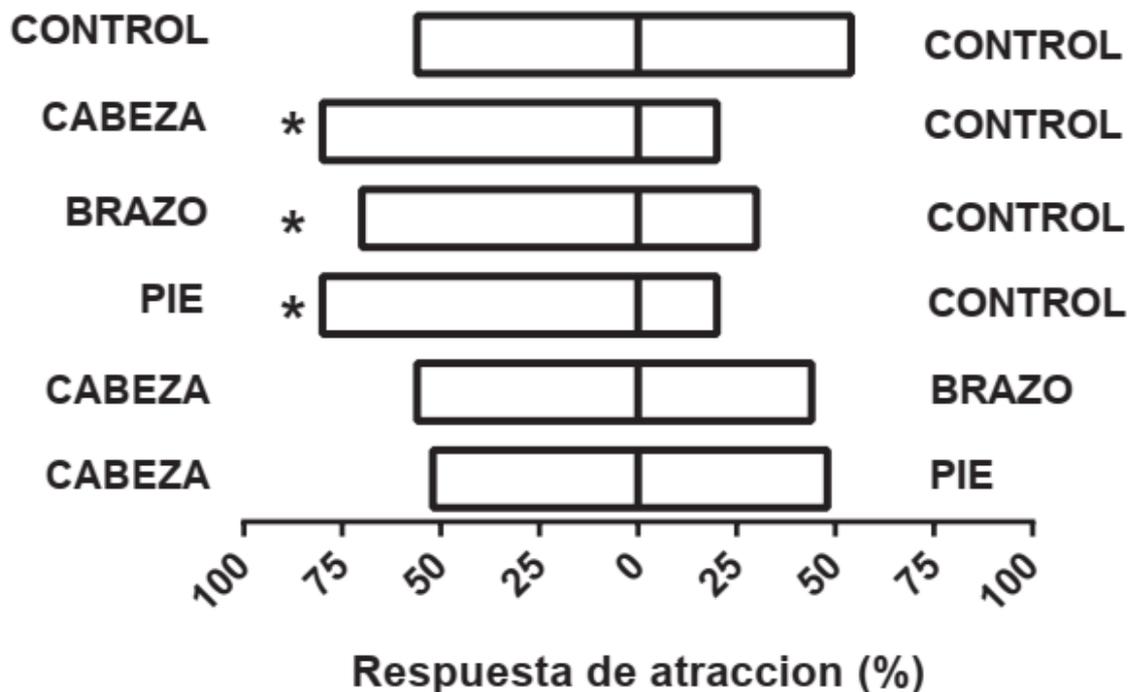


Figura 27. Preferencia de los piojos a los volátiles del olor humano (cabeza, brazo o pie) versus el papel limpio (control), y preferencia frente a los estímulos corporales (cabeza, pie y brazo). Los insectos fueron expuestos a los diferentes estímulos en un olfatómetro de tubo en T. \* Indican diferencias significativas.

### Respuesta comportamental a muestras totales de distintas partes del cuerpo

Los bioensayos de preferencia entre papel control (papel sin tratar) y papel tratado (cabeza, brazo o pie), demostraron que los piojos prefirieron significativamente el papel tratado ( $P \leq 0.001$ ). Ante la opción muestra de cabeza versus muestra de brazo o pie, los piojos mostraron una clara respuesta preferencial hacia la muestra de la cabeza respecto a las muestras de otras partes del cuerpo ( $P \leq 0.001$ ) (Figura 28).

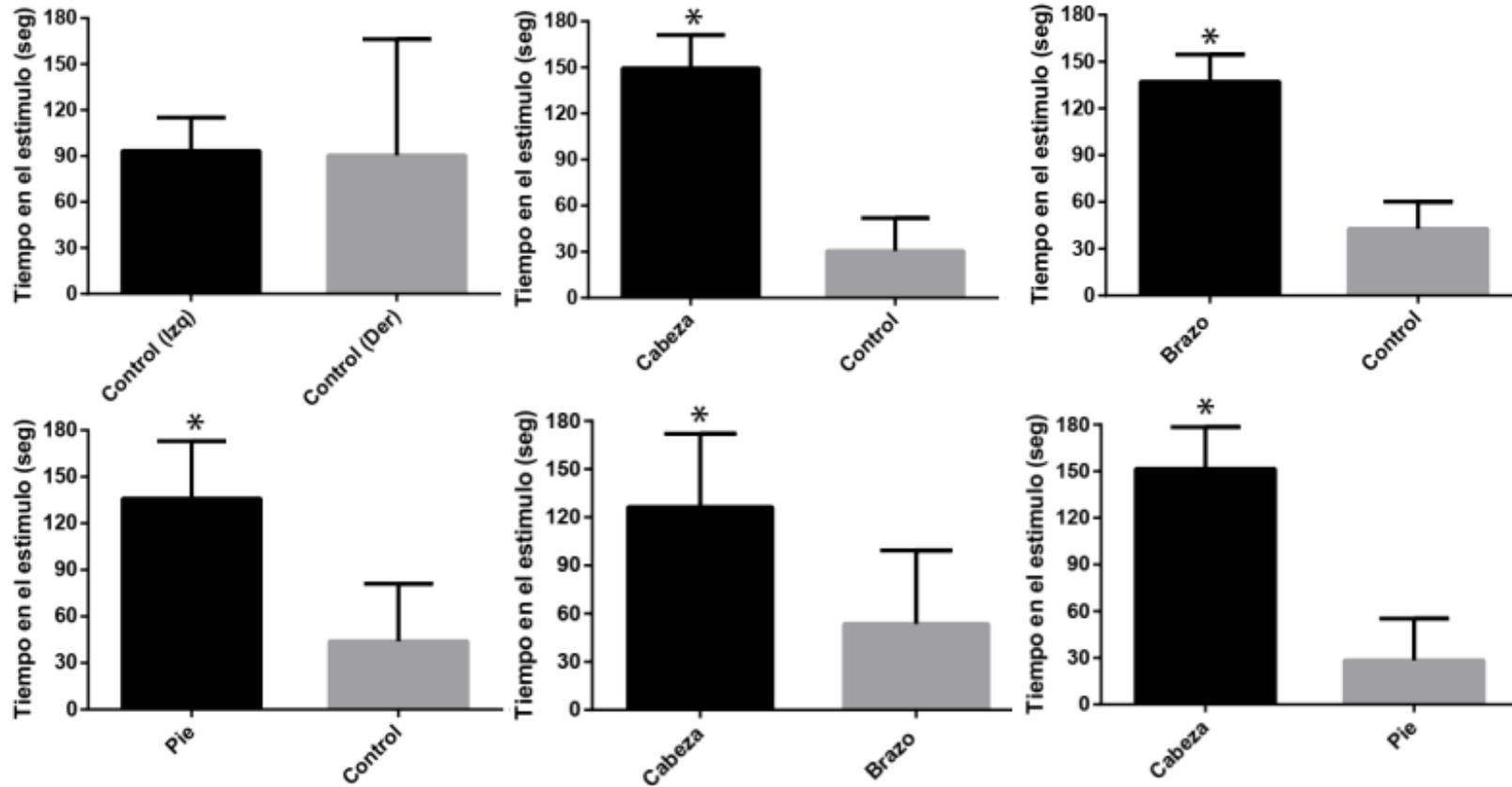


Figura 28. Respuesta de preferencia direccional de piojos hembras hacia la muestra de cabeza, brazo o pie. Los insectos fueron expuestos a los diferentes estímulos en una arena experimental circular dividido en dos zonas simétricas. \* Indica diferencias significativas ( $p < 0,001$ ).

## Análisis químico de los extractos totales de diferentes partes del cuerpo

El análisis químico mostró diferencias en la identidad y en la cantidad de los compuestos presentes en los extractos provenientes de las diferentes partes del cuerpo. En el extracto de la cabeza se detectaron 27 compuestos, mientras que en los extractos de pie y brazo se detectaron 15 y 4 compuestos respectivamente (Tabla 3).

En el análisis comparativo, se destacan los compuestos de carácter ácido presentes en la cabeza, como se puede observar en el cromatograma desde el minuto 30 hasta el minuto 40 (Figura 29 y Tabla 3). Un compuesto común y abundante en las tres partes del cuerpo analizadas fue el escualeno (>70 %).

Compuestos	Áreas relativas (a)		
	CABEZA	BRAZO	PIE
metil benceno <sub>(a)(c)</sub>	0,04	6,42	X
undecano <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,03	X	1,24
1,2-dimetil benceno <sub>(a)(c)</sub>	x	X	2,22
1,4 -dimetil benceno <sub>(a)(c)</sub>	0,04	X	X
1,2,4-trimetil benceno <sub>(a)(c)</sub>	0,23	X	1,99
Dodecano <sub>(a)(b)(c)</sub>	x	X	4,88
1,2-propanediol <sub>(a)(c)</sub>	0,1	X	0,87
1-undecanol <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,26	X	1,75
miristato de isopropilo <sub>(a)(c)</sub>	0,25	X	X
ácido butanoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,02	X	X
ácido pentanoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,27	X	X
pentanoato de etilo <sub>(a)(c)</sub>	0,15	X	X
1-dodecanol <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,06	X	4,56

etilenglicol monododecil éter <sub>(a)(c)</sub>	x	X	1,93
2-nonadecanol <sub>(a)(c)</sub>	x	X	1,2
ácido decanoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	1,47	X	X
2- (fenilmetileno) – octanal <sub>(c)</sub>	x	X	0,91
glicerol <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,3	X	X
1-tetradecanol <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,04	X	11,74
1-hexadecanol <sub>(a)(b)(c)</sub>	x	6,82	X
3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno <sub>(a)(c)</sub>	0,07	X	X
ácido dodecanoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,19	X	0,78
1-octadecanol <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,42	19,77	26,11
urea <sub>(a)(c)</sub>	x	X	4,21
ácido tridecanoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	1,24	X	X
ácido tetradecanoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	0,95	X	X
ácido-trans-9-hexadecenoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	3,72	X	X
ácido pentanoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	1,76	X	X
ácido cis-9- octadecenoico <sub>(a)(b)(c)</sub>	5,1	X	X
ácido hexadecanoico	10,9	X	X
ácido trans-9- octadecenoico	0,65	X	X
escualeno	70,92	66,99	32,55
ácido octadecanoico	0,59	x	X
escualeno	0,23	x	X

Tabla 3. Análisis químico de los extractos de cabeza, brazo y pie, mediante CG-EM. (a): identificado en base a su índice de Kovats; (b) identificado contra patrón estándar; (c) identificado por comparación de su EM con biblioteca con índice de similitud mayor a 92%.

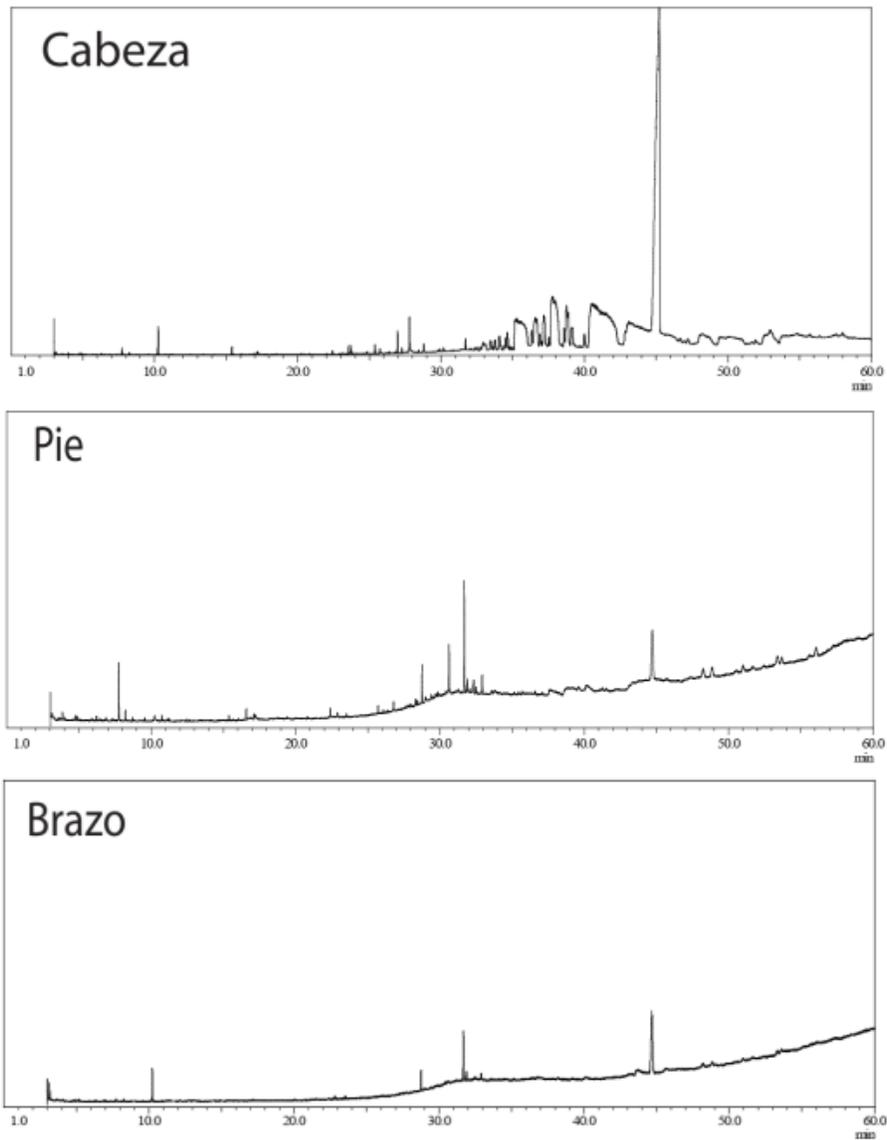


Figura 29. Cromatogramas de los extractos en acetona: metanol (1: 1) obtenidos de las diferentes partes de cuerpo (cabeza, pie y brazo).

### 1.3.3. Discusión

Nuestros resultados demostraron que los piojos de la cabeza son atraídos hacia los compuestos volátiles del olor humano independientemente de la zona del cuerpo de donde

proviene, sin mostrar preferencia hacia los volátiles de la cabeza en comparación con los volátiles de otras partes del cuerpo (brazo y pie).

Por el contrario, cuando los piojos eran expuestos a las muestras que contenían la suma de componentes químicos de mayor y menor volatilidad provenientes de diferentes partes del cuerpo, los insectos mostraron una clara respuesta preferencial hacia las muestras obtenidas de la cabeza cuando se las enfrentaba con las muestras de pie y brazo.

Estos resultados sugieren que los piojos de la cabeza son atraídos por los componentes volátiles del olor humano en general, independientemente de que provenga de distintas partes del cuerpo. Sin embargo, frente a una muestra que contenga también los compuestos de menor volatilidad, el piojo prefiere la cabeza respecto a otras partes del cuerpo como brazo y pie.

Considerando los resultados del análisis químico, esta diferencia de comportamiento podría deberse a alguno de los compuestos ácidos presentes en cabeza o a la mezcla de los mismos, que generan una respuesta de reconocimiento diferencial sobre el área a infestar.

Actualmente se conoce que la mayoría de los artrópodos hematófagos utilizan claves para ubicar a sus hospederos y luego se mueven en el cuerpo para seleccionar áreas favorables para su alimentación. Por ejemplo, la mayoría de las especies de mosquitos tienen sitios de picadura preferenciales (De Jong R. & G.J. Knols 1996). Estos autores informaron que las hembras de *Anopheles gambiae* prefieren picar en los pies y tobillo de los humanos por sobre otras partes del cuerpo, muy probablemente debido que el perfil químico del pie difiere de

otras zonas del cuerpo por la cantidad y tipo de glándulas exocrinas asociadas a la micro fauna.

En el caso de de *Simulium sp* (mosca negra), algunas especies prefieren morder la cabeza humana mientras otras especies prefieren morder el hombro o la espalda (Crosskey 1990). De manera similar, los flebótomos se movieron sobre el cuerpo de un ratón anestesiado en busca de lugares preferenciales para alimentarse tales como la cabeza y los pies (Cole y Edman 1988)

El análisis químico de los compuestos presentes en las distintas partes del cuerpo, demostró que el cuero cabelludo posee mayor número de compuestos de carácter ácido, posiblemente debido a que en esta zona y en el cuello hay mayor proporción de glándulas sebáceas. Las glándulas sebáceas se caracterizan por sintetizar el sebo (generación de ácidos grasos) cuya función es la de "lubricar" y proteger la superficie de la piel. Éstas se diferencian de las glándulas sudoríparas (apocrinas y ecrinas) que tienen la función de termo-regular el organismo, y cuyo producto de excreción es el agua.

Los piojos humanos no tienen la necesidad de recorrer grandes distancias para encontrar su hospedero, ya que no sobreviven fuera de él. Las fuentes de contagio se generan principalmente de manera directa (contacto entre hospederos) o de manera pasiva mediante objetos inanimados que pueden transportar un insecto de un individuo a otro. Es decir, que los piojos no tienen la necesidad de diferenciar olores a larga distancia para detectar al hospedero, pero tienen la necesidad de alcanzar la cabeza del hospedero para instalar la colonia. Además, un estudio reciente de Ortega-Insaurralde et al. (2019),

demonstró que los piojos tienen la capacidad de seleccionar distintas fuentes de olores humanos versus olores neutros mediante estructuras quimiorreceptoras de la antena. Posiblemente por ello, pueden discriminar los olores de distintas partes del cuerpo humano a muy corta distancia y esto estaría asociado a sustancias de menor volatilidad, diferenciando la zona que infestan. Los mecanismos por los que puede hacer esta discriminación todavía no están claros, pero hipotetizamos que se basan en su sistema olfativo y/o gustativo.

**PARTE 2: COMUNICACIÓN  
QUÍMICA DEL *PEDICULUS  
HUMANUS CAPITIS* CON  
SUS CONGÉNERES**

## 2.1 Introducción

Como las feromonas en general, las feromonas de agregación actúan como señales de reconocimiento para la comunicación química entre individuos del mismo grupo (Jaffe, 1987). Los artrópodos tienen la posibilidad de producir y emitir feromonas mediante diferentes vías (glándulas, cutícula o productos de excreción). En el caso de los insectos hematófagos, las heces juegan un rol fundamental en la comunicación química entre individuos de la misma especie (Lehane 2005).

En *T infestans*, se demostró agregación de los insectos cuando se expusieron a los volátiles de las heces co-específicas (Lorenzo Figueiras et al. 1994; Lorenzo y Lazzari 1996; Lorenzo Figueiras y Lazzari 1998). Por otro lado, Gálvez-Marroquín et al. (2018) observaron un efecto de atracción de *T dimidiata* hacia los volátiles de sus excretas y lo atribuyeron al nonanal, el componente principal, ya que los otros compuestos se encontraban a nivel de trazas.

En chinches de cama, otro insecto hematófago, se evaluó la respuesta de individuos adultos a las heces y exuvias de otros congéneres, obteniendo como resultado un efecto de agregación en las zonas que contenían las muestras. El análisis químico de las muestras resultó en un blend de nueve compuestos: nonanal, decanal, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-octenal, (2*E*, 4*E*)-octadienal, benzaldehído, limoneno, sulcatona y alcohol bencílico (Siljander et al., 2008). Teniendo en cuenta estos antecedentes en insectos hematófagos, nuestra hipótesis fue que las heces de los piojos (*P humanus capitis*) tienen un rol en la comunicación intraespecífica.

Las heces de los insectos contienen compuestos nitrogenados. Haciendo referencia al comportamiento, se vio que existe una respuesta de atracción al amonio y a sustancias nitrogenadas en varios órdenes de insectos, como producto de este comportamiento ha sido explotada como cebo en trampas. Se postula que la respuesta al amonio representa un rasgo primitivo desarrollado a partir de ancestros saprófitos que lo necesitaban y que fue conservado a través de la evolución, independientemente del comportamiento relacionado con la alimentación.

Así como las fracciones más volátiles de las heces pueden actuar como feromonas de agregación. Los componentes menos volátiles podrían actuar como señal de la presencia de una posible fuente de alimento, ya que los insectos hematófagos reconocen la sangre a través de pequeñas moléculas tales como los nucleótidos de adenina (ATP) (Friend & Smith, 1977). Así, la sangre, al ser digerida por los insectos, genera componentes que pueden ser utilizados por los congéneres para determinar el grado nutricional del hospedero.

En garrapatas se demostró que los productos de excreción generan un tipo de señal que es interpretada por sus congéneres como la presencia de una fuente de alimento viable (Grenacher et al 2001). Los compuestos que determinan este comportamiento fueron descritos en *Ixodes ricinus*. Los autores encontraron en las heces sustancias del grupo de las purinas y otros compuestos nitrogenados como el amonio (Dusbábek et al., 1991a).

En el caso del efecto de las heces en el comportamiento de los piojos del cuerpo, Wigglesworth (1941) demostró que los insectos eran atraídos hacia el papel que contenía sus excrementos. Más tarde, Mumcuoglu et al (1986) validó esta respuesta de atracción

demostrando que el 100 por ciento de las hembras eran atraídas al extracto acuoso de las heces y realizó la identificación de los compuestos químicos presentes como hemoglobina, xantina, hipoxantina, ácido úrico y sales de amonio. Los compuestos detectados fueron evaluados individualmente y sólo las sales de amonio produjeron atracción. Los autores postularon que los compuestos individuales actúan como sinergistas en la materia fecal. Otra hipótesis postulada fue que la diferencia de respuesta de los piojos entre los compuestos aislados y la mezcla total podría deberse a que en las heces no se detectaron productos de excreción.

Los estudios mencionados se realizaron sobre los piojos del cuerpo. Los piojos de la cabeza están estrechamente relacionados con los piojos del cuerpo, ya que divergieron recientemente, y las primeras investigaciones sobre el genoma de ambas especies mostraron que sus genes están altamente conservados (Kittler et al 2003; Yong et al 2003). Teniendo en cuenta la importancia biológica y el carácter de cercanía entre estas dos especies, en esta sección estudiaremos cómo responden los piojos a los componentes extraíbles de las heces mediante diferentes solventes de extracción. Además, analizaremos mediante técnicas de química analítica los compuestos presentes en los extractos que muestran bioactividad.

En la siguiente sección estudiaremos la respuesta de los piojos frente a volátiles de heces y al extracto de sus heces. A partir de los resultados obtenidos en los bioensayos de comportamiento, se analizarán mediante técnicas de química analítica los compuestos presentes en los extractos que muestran bioactividad.

## **2.2 Materiales y Métodos**

### **Insectos**

Los insectos fueron recolectados en establecimientos escolares según el protocolo mencionado en 1.1.2. Los insectos se mantuvieron en una cámara acondicionada hasta su utilización. Para estandarizar los insectos a utilizar en el bioensayo y en la recolección de heces, se seleccionaron aquellos individuos sin restos de sangre en el intestino.

### **Sustancias Químicas**

Se utilizaron patrones estándar de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.): 2-pentanona (>99%), hexanal (> 99%), heptanal (> 99%), octanal (> 99%), sulcatona (> 99%), nonanal (>99%), ácido acético (>99%), 2-etil-1-hexanol (> 99%), decanal (> 99%), geranilacetona (>99%), 2,6-dimetil 7-octen-2-ol (Mircenol), ácido butírico (>99%), ácido hexanoico (>99%), ácido octanoico (>99%), undecanona (> 99%), hexadecano (>99%), y alcanos (C5-C30) (> 99%). Se utilizaron patrones estándares de Polysciences Corp (Valley Road Warrington, Pennsylvania, EE. UU), de los alcoholes primarios 1-octanol (> 95%), 1-nonanol, (> 95%).

Para el estudio de los extractos de heces se utilizaron 3 solventes de extracción: hexano, diclorometano y metanol. Todos los solventes fueron calidad pro-análisis (99,8%) adquiridos en SINTORGAN (Villa Martelli, Buenos Aires, Argentina). Se utilizaron patrones estándar para el análisis químico: la hipoxantina ( $\geq 98\%$ ) fue adquirida de Janssen

Pharmaceutica (Beerse, Bélgica), y el ácido úrico ( $\geq 99\%$ ) y la guanina ( $\geq 98\%$ ) fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

### **Recolección de las heces**

Se colocaron grupos de 50 piojos (machos, hembras y ninfas 3) en los brazos y manos de un voluntario (joven adulto hombre) previamente higienizado con jabón neutro. Se permitió a los insectos que se alimenten hasta saciedad o 15 minutos, para asegurar que todos los individuos tengan el abdomen con alimento (Figura 29). Luego, los piojos se colocaron sobre un papel de filtro circular Whatman #1 (45 mm diámetro) y se los cubrió con una botella Pirex (25 mm de diámetro de base x 50 mm de altura) para limitar sus movimientos y evitar escapes (Figura 30). El dispositivo de colecta se mantuvo en una cámara cerrada con luz de baja intensidad ( $21 \pm 0,1$  lux), humedad controlada (70% HR) y una temperatura de 25 °C durante 2 horas. El tiempo se fijó para asegurar la excreta de todos los piojos y la cantidad de material biológico colectado por grupos fue aproximadamente 0.014 gramos. Las heces colectadas se recogieron del papel de filtro y se destinaron a los estudios biológicos y químicos.



Figura 29. Piojos alimentándose sobre el voluntario. Se utilizaron piojos hembras, machos y ninfas 3.



Figura 30. Colección de heces de piojos. (A) piojos colocados sobre el papel de filtro y limitados por una botella de vidrio para evitar escapes. (B) piojos y sus excreciones.

### **Bioensayo comportamental de respuesta de los piojos hacia los volátiles de heces**

Para determinar la respuesta de los piojos hacia los volátiles emanados de las heces, se realizaron 3 ensayos comparativos (respuesta a heces, piojos, y piojos + heces). Los bioensayos se realizaron en el olfatómetro de doble opción adaptado según las condiciones descritas anteriormente en la sección 1.1.2 (Figura 31).

Para analizar el efecto de las heces sobre los piojos, se colocó en uno de los brazos del olfatómetro un vial de 2 ml con papel de filtro con excreta de 50 piojos (el papel circular utilizado para la colecta cortado a la mitad), y en el otro brazo se colocó un papel sin muestra (control). Los tratamientos restantes (piojos y piojos + heces) se realizaron para discriminar el efecto específico de los insectos a sus heces en la respuesta comportamental.

Las muestras se colocaron alternando los lados derecho e izquierdo del olfatómetro para evitar un sesgo de direccionalidad.

Las condiciones experimentales fueron las mismas que se detallan en la sección (1.1.2 materiales y métodos).

En cada ensayo, un piojo se introdujo por el orificio central del olfatómetro y se le permitió caminar libremente durante 180 segundos. Finalizado el ensayo, se registró el brazo elegido por el insecto y se asignó un valor binario, siendo 1 = proximidad al papel tratado, y 0 = proximidad al papel no tratado (n = 20). Luego del ensayo, se descartó el insecto evaluado. Para excluir una posible desviación hacia un lado del olfatómetro, se realizó un experimento de control colocando un papel de filtro limpio en cada brazo (n = 20).

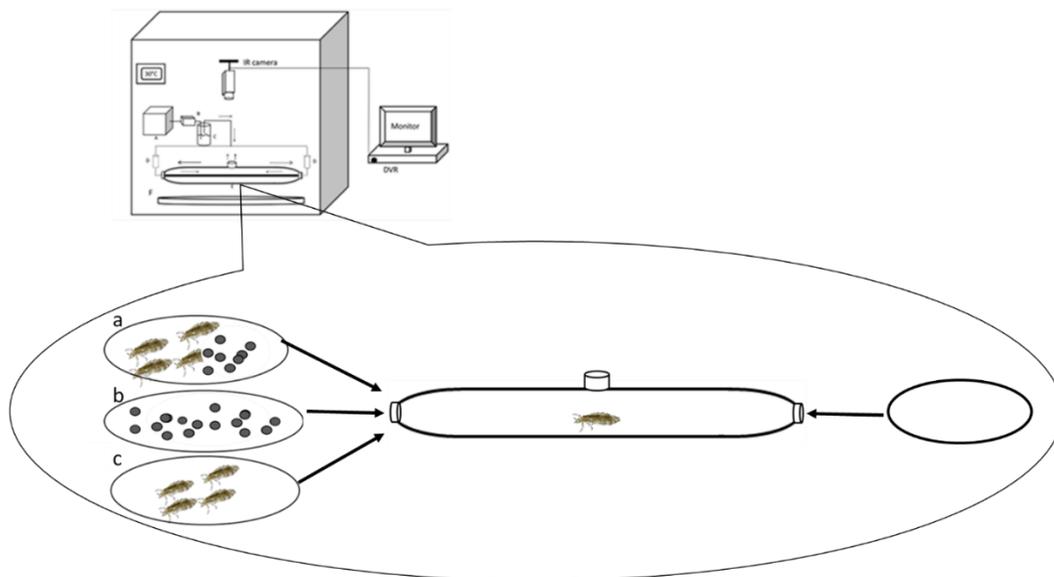


Figura 31. Esquema de la respuesta comportamental de los piojos a los volátiles de los siguientes tratamientos: (a) piojos + heces. (b) heces. (c) piojos

### **Colección de los volátiles de las heces para análisis químico**

Para la recolección de los volátiles se utilizaron 3 viales cerrados (10 ml) y 1 control conteniendo:

1. Piojos alimentados + heces (entre 150 y 180 piojos).
2. Piojos ayunados (entre 150 y 180 piojos ayunados).
3. Papel con heces de piojos, sin insectos (heces de 150 a 180 piojos).
4. Esferas de vidrio (control).

Estos viales se colocaron dentro de una cámara a 25°C y 70% de humedad durante 2 horas. Posteriormente, los compuestos volátiles se adsorbieron mediante una fibra de extracción de fase sólida (SPME) de divinilbenceno/ carboxeno/ polidimetilsiloxano (DVB/ CAR/ PDMS; 50/30  $\mu\text{m}$ ) (Supelco), perforando la tapa de vinilo del vial y exponiendo su fase activa al espacio de cabeza durante 20 min a 30°C. La colección de volátiles se realizó sobre una misma muestra, por duplicado (Figura 32). Para discriminar los compuestos del extracto que podrían provenir de la piel del huésped, se realizó un blanco frotando y deslizando 50 esferas de vidrio (diámetro 3 mm) sobre el brazo del voluntario. Las esferas se colocaron en un vial y se colectó su espacio de cabeza con una fibra SPME imitando las condiciones de colecta anteriormente mencionadas.

## **Análisis químico de los volátiles de las heces**

Los volátiles colectados de las heces se analizaron en un cromatógrafo gaseoso acoplado a un espectrómetro de masas (CG-EM) Shimadzu QP2010-Ultra equipado con una columna capilar polar DB-WAX (30 m, 0,25 mm id, df 0,25  $\mu$ m, Agilent Technologies; Santa Clara, CA) con Helio como gas portador (flujo de columna 1,25 ml/min). La fibra se insertó en el inyector GC en modo splitless a 240°C. La temperatura del CG se programó desde 50 °C (4 min), seguido de una rampa de 8°C/min hasta alcanzar los 230°C (en isoterma durante 5 min). El detector se fijó a 70 eV, y el escaneado de las masas fue de 40 m/z a 350 m/z, con una temperatura de interfaz de 245°C. La caracterización química de compuestos volátiles individuales se realizó comparando los Tr (tiempos de retención) con los estándares de referencia (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), comparando los índices de retención (IR) con datos de la literatura, y/o mediante la comparación y análisis del espectro de masas (EM) contra la biblioteca de espectros de masas de Wiley (McLafferty 2005), según el caso. Los picos en cada cromatograma se normalizaron para evitar la influencia de contaminantes, es decir que no se consideraron componentes tales como los siloxanos, impurezas provenientes del aire de la habitación, jabón líquido y solventes (por ejemplo, trazas de cloroformo, columna y septas), así como los solventes comúnmente empleados en cosmética, y los productos de aire ambiente (por ejemplo, 2-butoxi etanol). Todas las áreas de los compuestos restantes se sumaron y luego se dividieron por cada área individual para calcular su proporción en las muestras analizadas. Todos los análisis químicos se analizaron con el software lab solution.

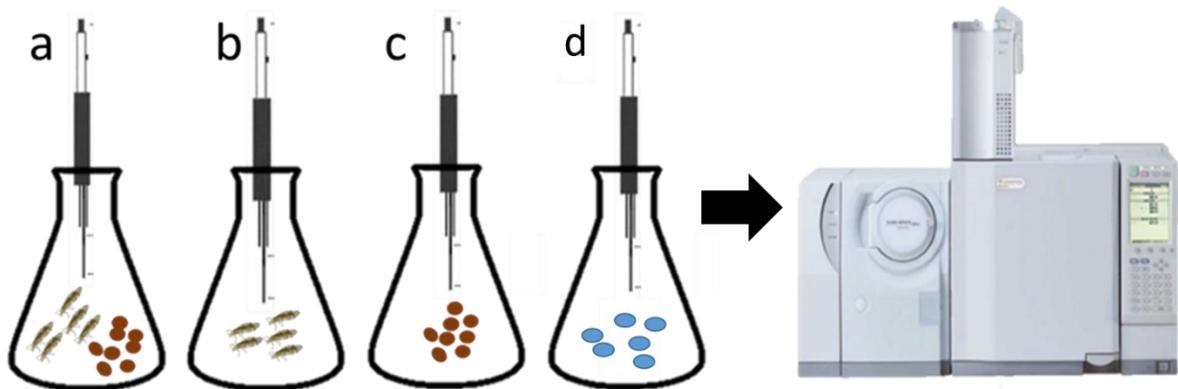


Figura 32. Esquema de colecta de volátiles de heces y posterior análisis. (a) piojos + heces. (b) piojos (ayunados). (c) heces. (d) esferas de vidrio (control).

### **Análisis estadístico del bioensayo de los volátiles de heces**

Los datos binarios obtenidos del olfatómetro (proximidad a las heces o proximidad al papel limpio) se analizaron utilizando un modelo lineal generalizado (GLM) con estructura de error binomial (distribución de Bernoulli) y función de enlace logit (Zuur et al. 2009). Los supuestos de independencia y la aleatoriedad se aseguraron mediante el diseño experimental (cada piojo se asignó a un solo ensayo y el papel tratado se asignó aleatoriamente al lado derecho o izquierdo del olfatómetro). La ausencia de valores atípicos se evaluó a partir de los residuales de Pearson frente a los gráficos de predicción, y la ausencia de datos influyentes se verificó en el gráfico de Cook, donde los valores de distancia siempre fueron  $\leq 1$ . El análisis se realizó con el paquete lme4 (Bates et al. 2013) y MASS (Venables y Ripley 2002) del software R (R Core Team 2013).

### **Obtención de extractos de heces de piojos en solventes**

La obtención de los extractos de heces se realizó con solventes orgánicos de polaridad creciente: hexano, diclorometano y metanol. La extracción se llevó a cabo sumergiendo los papeles de filtro impregnados con heces de 50 piojos (sección 2.1.2) en un vial de 2 ml con 500 µl de disolvente y el vial se colocó en ultrasonido (Arcano, modelo PS-10A) durante 20 minutos a 30°C para mejorar la extracción de los componentes. Los extractos obtenidos se centrifugaron (4000 RPM, IEC Centrifugadora HN) para eliminar restos del papel. Para el análisis químico, el sobrenadante se filtró para evitar el material particulado (Ministart filter unit 0,20 µm. Sartorius). Este procedimiento se realizó para evitar inconvenientes en el equipo analítico utilizado. Sendas muestras (para bioensayo y análisis químico) se guardaron en ultra freezer (SANYO-MDF-U33V-PE) a -78°C hasta su utilización. Por cada extracción con solvente, se utilizó un papel con heces, y luego el papel lavado se descartó (Figura 33).

### **Bioensayo comportamental para evaluar atracción de los piojos hacia los extractos de heces**

Se analizó la respuesta comportamental de piojos hacia los extractos fecales en diferentes solventes (metanol, diclorometano y hexano). La arena experimental consistió en discos de papel de filtro (Whatman #1, 55 mm de diámetro) divididos en dos áreas iguales. Un área se impregnó con 150 µl de extracto con solvente, y la otra con la misma cantidad de disolvente puro (control). Todos los papeles experimentales se dejaron secar durante 30

segundos. Cada papel tratado se colocó cuidadosamente en el fondo de una caja de Petri de vidrio (60 mm de diámetro), y sobre ella se colocó un anillo de vidrio (50 mm de diámetro, 40 mm de alto) para evitar que los piojos escapen de la arena experimental. Las áreas tratadas y no tratadas en cada experimento se eligieron al azar para evitar el sesgo de ubicación. (Figura 33) Cada piojo se colocó individualmente en el centro de la arena y se registraron sus movimientos durante 180 segundos, siendo la variable respuesta el tiempo promedio de permanencia en cada área (control o tratamiento) de la arena.

El dispositivo de vidrio se limpió con etanol y se dejó secar en el horno antes de cada prueba. Las arenas experimentales se colocaron en una cámara ambiental a 30 ° C, 70% HR y baja intensidad de luz (21 lux).

Los movimientos de los insectos se registraron con una cámara infrarroja resistente a la intemperie (KIR-J639CE20, Sony, China) conectada a un monitor (LG, China) y una grabadora de video digital (DVR5104HE, Dajua Technology Co. Ltd, Hangzhou, China). Se realizaron veinte réplicas para cada disolvente utilizado.

### **Análisis químico de los extractos de heces de piojos**

El análisis químico se realizó en un HPLC-UV-MS (sistema Alliance e2695 de Waters Corp) utilizando una columna analítica de fase reversa (Varian RP C-18, 250 mm × 4,6 mm i.d., tamaño de partícula de 5 µm). Los solventes de corrida fueron, CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 10 mM, pH 4,7 (buffer) y metanol, a un flujo de 0,3 ml/min. Las condiciones de la corrida cromatográfica

fueron: fase móvil buffer (Fase A) y metanol (Fase B), y el gradiente de disolvente cambió de acuerdo con las siguientes condiciones: de 0 a 5 minutos se mantuvo en 90% (A): 10% (B), y entre 5 min y 30 min varió hasta llegar a 10% (A): 90% (B). Este valor se mantuvo durante 10 minutos y la medición se terminó en un tiempo total de 40 minutos.

La temperatura de la columna se ajustó a 30 °C durante toda la corrida y el volumen de inyección fue de 10 µL. Para el análisis UV, el cromatograma se adquirió utilizando un detector de arreglo de fotodiodos (longitud de onda 190- 800 nm) a 30°C, utilizando un ancho de rendija de 1,2 nm y de banda a 1 nm. Los espectros UV obtenidos para cada pico se compararon con los datos bibliográficos. El espectrómetro de masas funcionó en modo *scan* con rango de adquisición entre m/z 50- 1200 TIC (Cromatografía de Iones Totales). Las señales también fueron adquiridas por el método SIR (Simple Ion Recording). El procesamiento de los datos se realizó con el software MassLynx v4.1 (Waters Corp). Los compuestos identificados se confirmaron contra estándares analíticos (Sigma Aldrich. St Louis, MO).

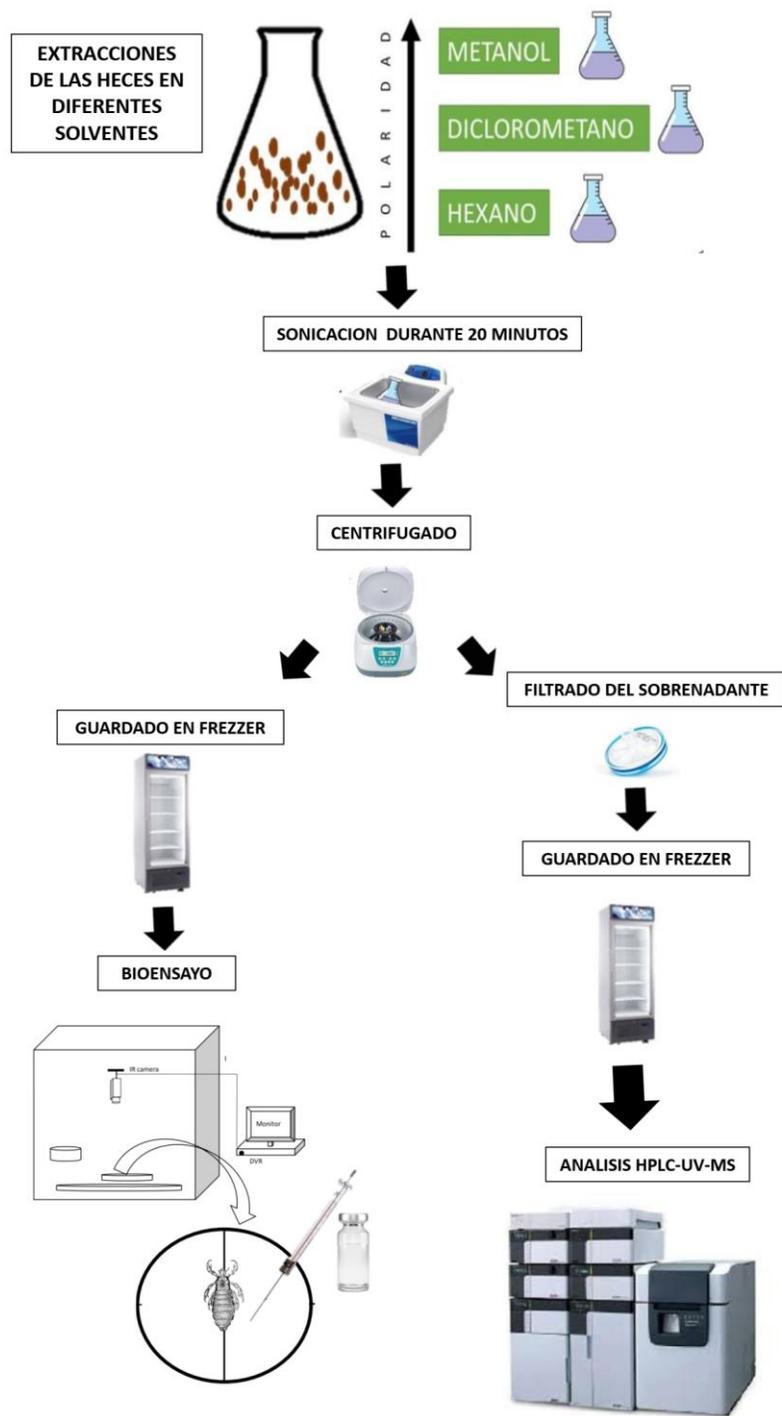


Figura 33. Procedimiento de extracción de los compuestos de las heces en solvente.

## **Análisis estadístico del bioensayo comportamental de los extractos de heces**

Los resultados obtenidos en la arena circular se analizaron mediante el método de varianza unidireccional (ANOVA) para determinar si hubo diferencias significativas entre el tiempo de permanencia en el área control y el área con extractos de heces (tratamiento). Los supuestos de independencia y aleatoriedad se aseguraron mediante el diseño experimental (cada piojo se utilizó sólo en un ensayo; el área tratada se colocó aleatoriamente al lado derecho o izquierdo de la arena circular). La normalidad y la heterocedasticidad se determinaron mediante un gráfico Q-Q plot y un gráfico de valores residuales frente a valores predichos.

### **2.3 Resultados**

#### **Respuesta comportamental de los piojos hacia volátiles de las heces**

Los piojos mostraron una respuesta positiva o atracción significativa hacia el aire que contenía volátiles de heces y de piojos + heces ( $p \leq 0,05$ ). En contraste, no hubo una atracción significativa hacia los volátiles de los piojos solos (Figura 34). Estos resultados sugieren que las heces contienen algún compuesto volátil o mezcla de volátiles que inducen la respuesta de atracción.

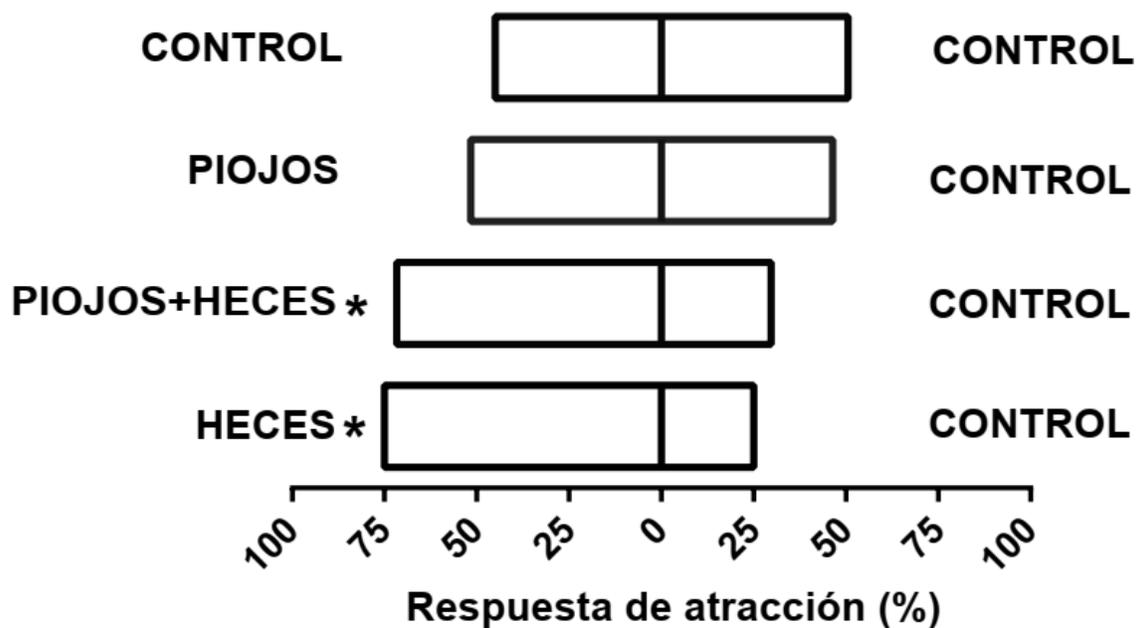


Figura 34. Respuesta (porcentaje de insectos) de elección en un olfatómetro de doble elección a volátiles de piojos, piojos+ heces, y heces. Cada barra horizontal marca la preferencia por un brazo. Los asteriscos indican una diferencia significativa en la respuesta entre el tratamiento y el control ( $p < 0,05$ ).

#### Análisis químico de los volátiles de las heces

En el espacio de cabeza del vial con las heces de piojos se identificaron 19 sustancias: 2-pentanona, hexanal, heptanal, 3-metil-3-buten-1-ol, octanal, sulcatona, nonanal, ácido acético, 2-etil-1-hexanol, decanal, 1-octanol, ácido butírico, 1-nonanol, geranil-acetona, ácido hexanoico, ácido octanoico y trazas de 2,6-dimetil-7-octen-2-ol, 2-undecanona y hexadecano (Figura 35).

En el espacio de cabeza de la muestra de piojos + heces se identificaron 21 compuestos y tres de ellos no estaban presentes en la muestra de heces: 1-octen-3-ona, 2-nonenal y geranioleno (Tabla 4). Nuestra hipótesis es que se podrían haber generado por la interacción de los piojos con sus excretas mediante la microbiota asociada al insecto.

En el espacio de cabeza del vial de los piojos solos, se identificaron 11 compuestos: 2-pentanona, 3-metil-3-buten-1-ol, ácido acético, 2-etil-1-hexanol, 2,6-dimetil-7-octen-2-ol, 2-nonenal, 2-undecanona, 1-nonanol, hexadecano, ácido hexadecanoico y geranilacetona siendo los mayoritarios el ácido acético y hexadecano (Tabla 4). En el análisis comparativo de los tres extractos, la mayor diferencia encontrada fue la presencia y alta proporción de los aldehídos hexanal, nonanal y decanal, en aquellas muestras en donde estaban presentes las heces en comparación con las muestras sin heces.

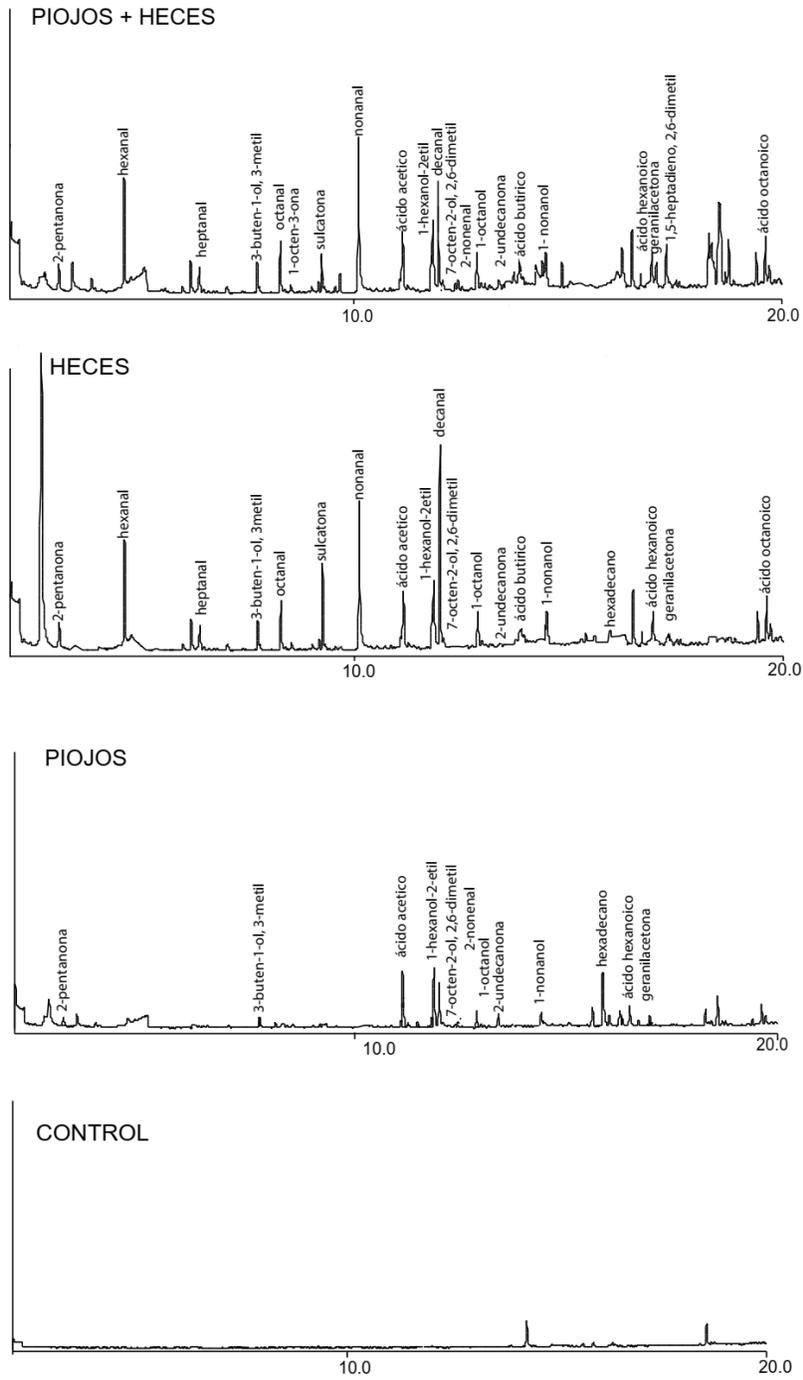


Figura 35. Cromatogramas (CIT) de los volátiles generados por piojos + heces, heces, piojos ayunados, y control (esferas de vidrio), adsorbidos en una fibra SPME colocada en el espacio de cabeza del vial con las diferentes muestras. Se indican en la figura los diferentes compuestos encontrados.

Compuestos volátiles	Área relativa		
	Piojos + heces	Heces	Piojos
2-pentanona <sup>(a)(b)(c)</sup>	3.8	3.8	6.9
hexanal <sup>(a)(b)(c)</sup>	12.0	12.0	X
heptanal <sup>(a)(b)(c)</sup>	2.9	2.9	X
3-metil-3-buten-1-ol <sup>(a)(c)</sup>	3.1	3.1	5.1
octanal <sup>(a)(b)(c)</sup>	6.4	6.4	X
1-octen-3-ona <sup>(a)(c)</sup>	<1	X	X
sulcatona <sup>(a)(b)(c)</sup>	1.2	6.2	X
nonanal <sup>(a)(b)(c)</sup>	20.8	13.8	X
ácido acético <sup>(a)(b)(c)</sup>	10.2	10.2	12.2
2-etil-1-hexanol <sup>(a)(c)</sup>	4.1	4.1	15
decanal <sup>(a)(b)(c)</sup>	10.9	17.6	X
2,6-dimetil-7-octen-2-ol <sup>(a)(c)</sup>	<1	<1	6.3
2-nonenal <sup>(a)(b)(c)</sup>	1.6	X	9.4
1-octanol <sup>(a)(b)(c)</sup>	4.3	4.3	X
2-undecanona <sup>(a)(b)(c)</sup>	<1	<1	5.0
ácido butírico <sup>(a)(b)(c)</sup>	3.4	3.4	X
1-nonanol <sup>(a)(b)(c)</sup>	3.9	3.4	8.9
hexadecano <sup>(a)(b)(c)</sup>	X	<1	16.0
ácido hexanoico <sup>(a)(b)(c)</sup>	3.6	3.6	5.6
geranilacetona <sup>(a)(b)(c)</sup>	2.3	3.6	9.6
geranioleno <sup>(a)(b)(c)</sup>	2.3	X	X
ácido octanoico <sup>(a)(b)(c)</sup>	2.5	2.5	X

Tabla 4. Área relativa de los volátiles detectados en el espacio de cabeza del vial con: Piojos + heces, Heces y Piojos ayunados. (a) identificación por similitud mayor al 92% con el espectro de masas de la biblioteca Wiley; (b) comparación del tiempo de retención con el estándar; (c) comparación del IR con IR de literatura.

### Respuesta comportamental de los piojos hacia los extractos de heces

Los bioensayos en la arena experimental mostraron que los piojos de la cabeza fueron atraídos por el extracto metanólico de heces ( $p \leq 0,05$ ). Por el contrario, los piojos no

mostraron atracción por los extractos en diclorometano o hexano ( $p \geq 0,05$ ) (Figura 36). Estos resultados indicaron que el extracto de mayor polaridad produjo atracción de los piojos de la cabeza.

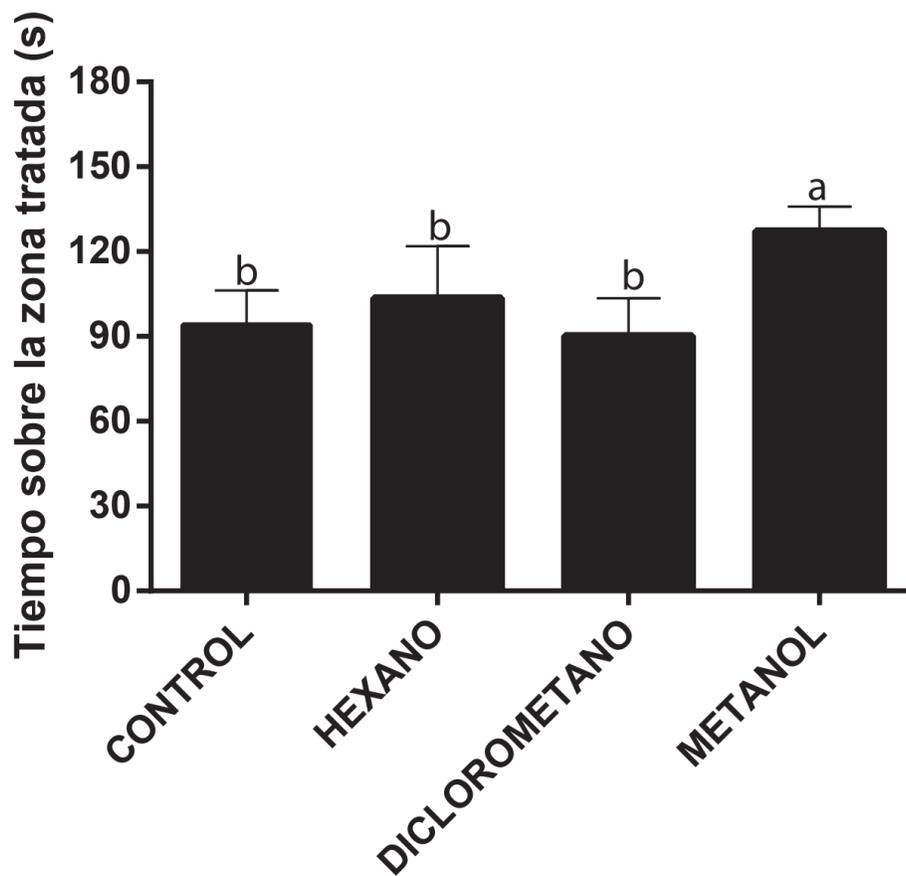


Figura 36. Respuesta de *P. humanus capitis* frente a diferentes extractos de heces en tres solventes evaluados en arena experimental. Letras distintas indican diferencia significativa

## Análisis químicos de los extractos de heces de piojos

El análisis químico del extracto metanólico de heces (el único extracto que produjo atracción del piojo de la cabeza) mediante HPLC-MS mostró tres picos (Figura 37). Los picos obtenidos se compararon con patrones estándar, espectro UV y espectro de masas. El pico con tiempo de retención a los 12,17 min corresponde a la hipoxantina y el pico observado a los 9,86 min corresponde al ácido úrico. La identidad del tercer pico (tr =11,67 min) no pudo confirmarse, ya que cuando se inyectó el patrón estándar de los posibles compuestos, los tiempos de retención fueron dudosos. Sin embargo, considerando los espectros UV y de masas, ese pico podría corresponder a guanina o iso-guanina (Figura 38).

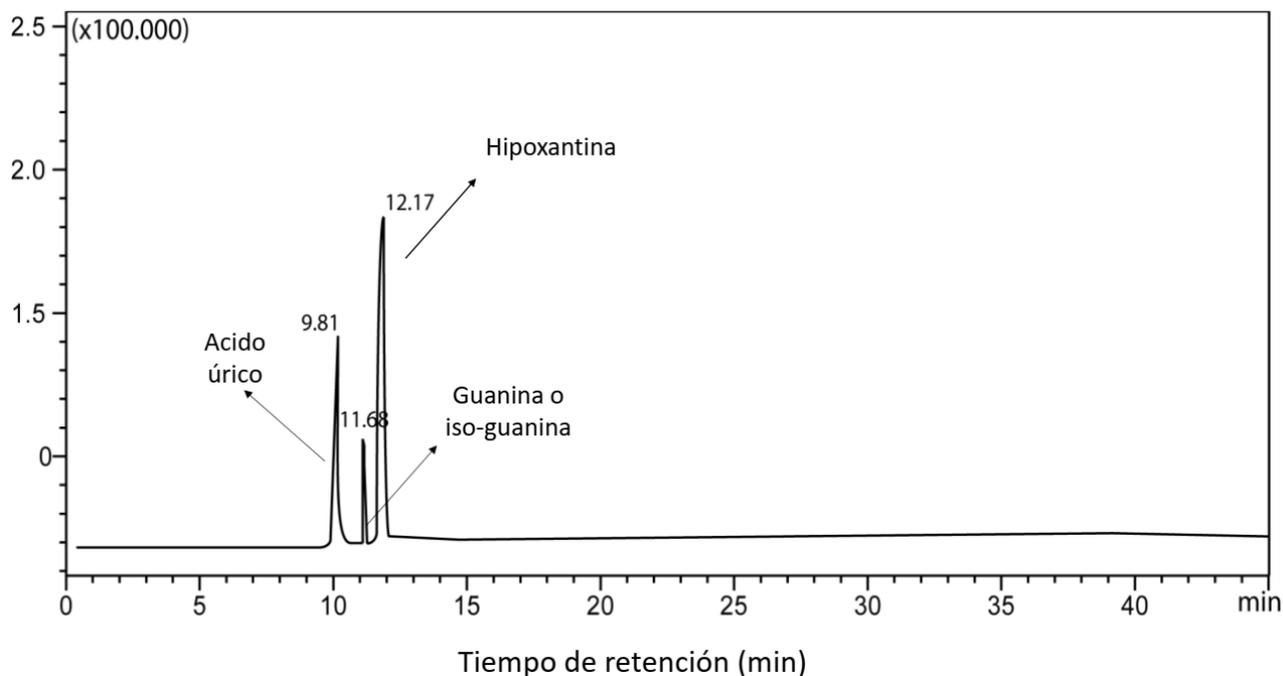


Figura 37. Análisis químico por HPLC-UV-MS del extracto metanólico de heces de piojos.

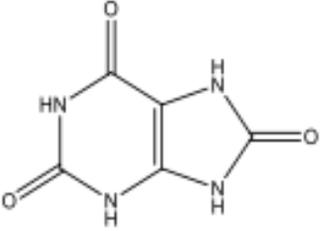
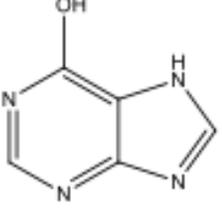
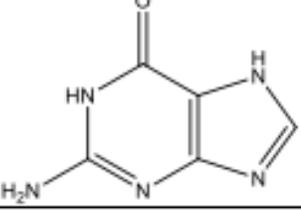
Sustancia patrón	$m/z$ detectado $([M+H]^+)$	tr/min en mix de estándares	tr/min en la muestra
<p><b>Ácido úrico</b></p> 	169,04	9,81	9,81
<p><b>Hipoxantina</b></p> 	137,05	11,79	11,59
<p><b>Guanina</b></p> 	152,06	-	11,68

Figura 38. Compuestos identificados en el análisis de HPLC-MS-UV del extracto metanolico de heces.

## 2.4 Discusión

Los piojos fueron atraídos por los compuestos volátiles generados por las heces y también por los volátiles emitidos por piojos y sus heces, pero no mostraron atracción por los volátiles de piojos ayunados (sin heces). También se encontraron diferencias químicas entre los perfiles de los volátiles de heces, piojos + heces y solo piojos. (Tabla 4).

En el análisis químico de los volátiles de heces, se identificaron compuestos que habían sido previamente detectados en la muestra de volátiles del cuero cabelludo (parte 1 de esta tesis doctoral) tales como aldehídos (nonanal, octanal, decanal) y sulcatona. Para alguno de estos compuestos (nonanal y sulcatona) se había demostrado una respuesta de dependiente de la concentración (sección 1.1).

Los aldehídos detectados en los volátiles de heces de piojos también están presentes en otros insectos hematófagos como las chinches de cama y los triatominos, mostrando una respuesta comportamental dosis-dependiente. Estos compuestos podrían estar asociados a comportamientos de alimentación, ovoposición o refugio, y, dependiendo de las dosis, podrían estar brindando determinada información sobre sus congéneres (Pires et al., 2002, Vitta et al., 2002, 2007). Además, otros compuestos detectados en heces de piojos como 2-etil-1-hexanol, ácido hexanoico y ácido acético, fueron previamente asociados al comportamiento de agregación en *T. infestans* y *T. brasiliensis* (Mota et al., 2014), aunque en estos casos provienen de las glándulas meta esternales y no de las heces.

En el bioensayo de respuesta a los volátiles de piojos sin alimentar, no se observó respuesta de atracción hacia otros piojos, sugiriendo que la respuesta comportamental es producida por la presencia de las heces, que contribuyen al enriqueciendo la mezcla de volátiles.

Haciendo referencia a los compuestos de menor volatilidad en las heces, los primeros estudios sobre la comunicación química entre piojos del hombre se realizaron sobre los piojos del cuerpo *P humanus humanus*. En estos trabajos se determinó que había una respuesta de agregación a los extractos acuosos de sus heces, y se detectaron entre sus compuestos sustancias nitrogenadas del tipo de las purinas y sales de amonio (Mumcuoglu et al. 1986). Resultados similares se encontraron en las garrapatas, *Ricinus* (Ixodidae: Ixodidae). En este caso, se observó que las heces conespecíficas representan un estímulo que genera una respuesta de agregación. Los componentes principales involucrados también fueron purinas y sus derivados (Grenacher et al. 2001).

En el caso de los piojos de la cabeza, la respuesta a sus propias heces era desconocida. En esta sección de la tesis, establecimos que los piojos de la cabeza son atraídos por el extracto en metanol de sus heces, pero no por los extractos en hexano o diclorometano. El metanol es un solvente polar con la propiedad de extraer compuestos polares, mientras que el diclorometano y el hexano tienen polaridad reducida. Sobre la base de estos resultados, se sugiere que los compuestos que producen atracción de los piojos son de naturaleza polar.

De hecho, la identificación química mostró la presencia de hipoxantina, ácido úrico y otra purina identificada tentativamente como guanina o iso-guanina. Para este último, a pesar que los espectros de masas y UV mostraron similitud con la guanina, la identidad no pudo

ser confirmada porque el pico cromatográfico no coincidió exactamente con el tiempo de retención del patrón estándar. Nuestra hipótesis es que este compuesto es un isómero de la guanina, posiblemente iso-guanina.

Los tres compuestos identificados en heces de los piojos de la cabeza, también se hallaron en las heces de los piojos del cuerpo (Mumcuoglu et al. 1986) y de garrapatas (Grenacher et al. 2001). En heces de los piojos del cuerpo, se detectó hemoglobina, xantina, hipoxantina, ácido úrico y sales de amonio, y en las garrapatas guanina, xantina, ácido úrico y 8-aza-guanina. Estos compuestos fueron evaluados individualmente, pero ninguno mostró actividad de atracción similar a la observada por las heces, posiblemente debido a algún efecto sinergista entre los compuestos presentes.

A diferencia de otros insectos hematófagos, los piojos humanos son parásitos permanentes y obligados que pasan toda su vida en la cabeza. Sin embargo, la transmisión de la pediculosis es una evidencia de la dispersión de piojos entre diferentes hospederos, pudiéndose encontrar diferentes poblaciones en una cabeza. Por lo tanto, nuestra hipótesis es que los compuestos generados en las heces pueden ser utilizados por los piojos para distinguir diferentes cohortes que provienen de diferentes huéspedes. Teniendo en cuenta esto, proponemos que los piojos pueden usar información quimio-sensorial basada en los mismos compuestos tanto para la comunicación conespecífica como inter-específica, generando distinta respuesta según la concentración y estado fisiológico del insecto.

Considerando que las hembras de piojos de la cabeza deben ser fecundadas en muchas ocasiones para mantener la fertilidad (Takanolee et al. 2005), el poder de atracción de las

heces demostrado en nuestro trabajo podría también estar asociado a la búsqueda de pareja. Esta posible vía de comunicación con sus congéneres es sumamente interesante sobre todo si consideramos que los piojos de la cabeza no presentan glándulas externas en el tórax y el abdomen (Hatsushika et al. 1983 y Ortega Insaurralde et al. 2019) a diferencia de otros insectos hematófagos como chinches de cama y triatomos (Usinger 1966).

La composición fecal puede proporcionar información sobre la condición fisiológica del huésped como fuente adecuada de alimento o reproducción, como se informó para las garrapatas, donde los compuestos químicos generados después de un evento de alimentación evocaron una respuesta de agregación hacia otras garrapatas desde una distancia corta, interpretándose como una señal de alimento (Donze et al. 2004). Aunque los piojos son ectoparásitos permanentes en permanente contacto con su hospedero, estos pueden distinguir distintos tipos de olores y asociarlas como un posible sitio de hábitat o alimentación (sección 1.3).

En cuanto a la fuente de estos compuestos, se desconocen los tejidos secretores de los compuestos fecales en los piojos. Los compuestos podrían ser un producto metabólico derivado de la digestión de sangre o producidos por microorganismos. Los simbiontes intestinales son microorganismos esenciales en varios insectos hematófagos (Eichler y Schaub 2002), y su presencia en las heces podría generar distintos compuestos que generen agregación en los piojos. Las comunidades microbianas fecales han demostrado tener un papel importante en la comunicación química de los insectos (Ezenwa et al. 2012): en las cucarachas *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae), las comunidades bacterianas intestinales median la producción de feromonas de agregación (Wada-Katsumata et

al.2015). Además, los residuos del tracto digestivo de los huéspedes atraen garrapatas. Es decir, los ungulados liberan metabolitos volátiles del rumen que se transportan en el aire y atraen a *Ixodes spp* a distancia (Donzé et al. 2004). Se necesitarán estudios futuros para determinar si la fuente de compuestos fecales que muestran respuesta es propia del insecto o generada por microorganismos asociados.

Esta parte de la tesis representa la primera evidencia de la comunicación química entre piojos de la cabeza. Los resultados respaldan la existencia de sustancias activas presentes en las heces de *P. humanus capitis* potencialmente involucradas en su comportamiento de agregación, y nuestros futuros estudios tendrán como objetivo discriminar las concentraciones y proporciones de productos químicos asociados con un comportamiento de atracción o repelencia. También son necesarios estudios para verificar si las diferencias entre las concentraciones de volátiles de las heces están asociados a la tasa de infestación en la población.

# **CUADRO RESUMEN DE LA TESIS**

	RESPUESTA COMPORTAMENTAL			ANÁLISIS QUIMICO	
	EXTRACTO	METODOLOGÍA	RESULTADO	METODOLOGÍA	RESULTADO
<b>PARTE 1.1</b>					
Compuestos del cuero cabelludo	Compuestos volátiles	Olfatómetro	Atracción	Colecta de compuestos mediante fibra - análisis por CG MS	24 compuestos detectados/ 4 compuestos mayoritarios (nonanal-sulcatona-geranilacetona-ac. Palmítico)
<b>PARTE 1.2</b>					
Comparación de individuos infestados Vs no infestados	Compuestos volátiles	Olfatómetro	atracción en ambos grupos (sin diferencia significativa entre infestados y no infestados)	Colecta de compuestos mediante fibra - análisis por CG MS	Detección de los mismos compuestos mayoritarios / mayor diferencia de compuestos ácidos en no infestados
<b>PARTE 1.3</b>					
Compuestos de distintas partes del cuerpo	compuestos volátiles	Olfatómetro	Atracción hacia todas las partes del cuerpo / no existe preferencia	no corresponde*	no corresponde*
	Extracto total	Arena experimental circular	Atracción hacia compuestos totales de las partes del cuerpo/ existe una preferencia de la cabeza sobre otras partes del cuerpo	Extracción con solventes (metanol-acetona1:1) - análisis por CG-MS	Mayor cantidad de compuestos ácidos en la cabeza
<b>PARTE 2</b>					
Compuestos de heces de piojos	volátiles	Olfatómetro	Atracción hacia las heces	Colecta de compuestos mediante fibra - análisis por CG MS	19 compuestos identificados/compuestos mayoritarios aldehídos
	Extracto total	Arena experimental circular- Extracción con solventes de distinta polaridad (metanol, diclorometano y hexano)	Atracción hacia extracto metanólico de heces**	Extracción con solventes de distinta polaridad (metanol, diclorometano y hexano)- analisis por HPLC-MS-UV	3 compuestos detectados (ácido úrico, hipoxantina y guanina o isoguanina)

<b>PARTE 1.1</b>	RESPUESTA COMPORTAMENTAL		
	COMPUESTOS	METODOLOGÍA	RESULTADOS
Compuestos volátiles mayoritarios del cuero cabelludo	Nonanal	Olfatómetro	Atracción a dosis bajas/ repelencia a dosis altas (significativo)
	Sulcatona	Olfatómetro	Tendencia de atracción a dosis bajas
	Geranilacetona	Olfatómetro	Tendencia de atracción a dosis bajas
	Ácido palmítico	Olfatómetro	Tendencia de atracción a dosis bajas

\* Al no haber diferencia significativa entre las preferencias, no se realizó el análisis químico \*\* se realizó el análisis químico del extracto metanólico al ser el único que mostró respuesta significativa

# **CONCLUSIONES FINALES**

A lo largo de esta tesis se estudió el comportamiento de los piojos frente a estímulos químicos provenientes del hospedero y proveniente de sus congéneres, evaluando compuestos volátiles y no volátiles. A modo de resumen, los principales resultados de este trabajo son:

1. La mezcla de volátiles del cuero cabelludo humano desencadena una respuesta de atracción sobre los piojos de la cabeza.
2. Se identificaron 24 compuestos en la mezcla de volátiles del cuero cabelludo humano. Los compuestos mayoritarios fueron nonanal, sulcatona, geranilacetona y ácido palmítico.
3. Individualmente, la bioactividad del nonanal mostro diferencia significativa frente al control, produciendo atracción a bajas concentraciones y repelencia a altas. Los volátiles sulcatona y geranilacetona produjeron una tendencia de atracción de los piojos de la cabeza, siendo más atrayentes a menor concentración. El ácido palmítico fue el único compuesto que de manera individual mostro una tendencia de atracción a dosis altas.
4. Los individuos infestados por piojos mostraron similar composición de volátiles mayoritarios del cuero cabelludo que los no infestados. Coincidentemente, los piojos no mostraron una preferencia hacia los volátiles del grupo infestado respecto al no infestado.
5. Los volátiles de distintas partes del cuerpo (cuero cabelludo, brazo y pie) produjeron atracción similar de piojos, sin mostrar una preferencia hacia los volátiles del cuero cabelludo.

6. Las muestras de todos los compuestos emanados por las distintas partes del cuerpo (cuero cabelludo, brazo y pie) produjeron atracción de los piojos, pero cuando se les ofreció distintos estímulos en un mismo ensayo, los piojos demostraron una clara preferencia hacia la muestra del cuero cabelludo sobre la muestra de brazo o pie.
7. Los volátiles de las heces de los piojos de la cabeza desencadenan una respuesta de atracción de sus congéneres.
8. Se identificaron 19 compuestos que componen la mezcla de volátiles de las heces de piojos, siendo mayoritarios decanal, nonanal, hexanal y ácido acético.
9. El extracto metanólico de las heces de piojos atrae a sus congéneres, indicando la naturaleza polar de los compuestos atractantes de piojos.
10. Se identificaron 3 compuestos en el extracto metanólico de heces: ácido úrico, hipoxantina y guanina o iso-guanina.

Este trabajo de Tesis Doctoral representa la primera evidencia de comunicación química entre el piojo de la cabeza y su hospedador humano, y entre el piojo de la cabeza y sus congéneres.

Los resultados demostraron que los piojos se orientan hacia los volátiles emanados por su hospedero humano (y/o algunos de sus componentes mayoritarios), y que claramente prefieren muestras de todos los compuestos del cuero cabelludo respecto a muestras de otras partes del cuerpo (brazo y pie). Esto sugiere que el insecto utiliza en primera instancia, señales químicas volátiles o de contacto para orientarse hacia el humano, y claves químicas de contacto para orientarse hacia la cabeza.

Los resultados también demostraron que los piojos se orientan hacia los compuestos emanados de las heces de sus congéneres, sugiriendo que representan señales químicas sobre la fuente de alimento o reconocimiento de pareja.

La comunicación química demostrada para el piojo de la cabeza, junto con otros mecanismos fisiológicos, condiciona el comportamiento de este importante parásito humano y sienta algunas bases de la transmisión de la pediculosis. Nuevos estudios son necesarios para discriminar las mezclas y proporciones de los compuestos determinantes del comportamiento de los piojos, como también la importancia de la micro flora del cuero cabelludo asociada a la infestación por piojos.

Asimismo, los resultados de este trabajo resultan relevantes no solo desde una perspectiva de la biología del piojo de la cabeza sino en el marco del desarrollo de nuevas herramientas contra la enfermedad de la pediculosis, disminuyendo o reemplazando los actuales pediculicidas y generando una alternativa más amigable con el ambiente, y con menos efectos secundarios en niños que es la población que mayoritariamente utiliza estos productos.

# **BIBLIOGRAFIA**

- Ahmadi, A and G.A.H. McClelland.1985. Mosquito-mediated attraction of female mosquitoes to a host. *Physiological entomology* 10,803-9.
- Allan, S.A., U.R. Bernier, and D.L. Kline. 2005. Attraction of mosquitoes to volatiles associated with blood. *J. Vector. Ecol.* 31:71–78.
- Babushok, V.I. and P. J. Linstrom. 2011. Retention indices for frequently reported compounds of plant essential oils. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* 40:043–101.
- Barrozo, R. B. and C. R. Lazzari. 2004. The response of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to carbon dioxide and other host odours. *Chem. Senses.* 29: 319–329.
- Bates, D., M. Maechler, and B. Bolker. 2013. lme4: linear-mixed effects models using S4 classes. Retrieved from: [http://CRAN.R-project.org/ package=lme4](http://CRAN.R-project.org/package=lme4) (R package version 0.9999992).
- Buczek, A., D. Markowska-Gosik, D. Widomska , and I. Kawa .2004. *Pediculosis capitis* among schoolchildren in urban and rural areas of astern Poland. *Eur. J. Epidemiol.* 19:491–495
- Burgess, I. F. 2009. Current treatments for pediculosis capitis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 22: 131 136.
- Buxton, P.A. 1947. *The louse: an account of the lice which infest man, their medical importance and control.* Edward Arnold & Co., London, United Kingdom.

- Canyon, D.V, R. Speare and R. Muller.2002. Spatial and Kinetic Factors for the Transfer of Head Lice (*Pediculus capitis*) Between Hairs. *International J. Dermatol.* 119:
- Canyon, D. V., and R. Speare. 2010. Indirect transmission of head lice via inanimate objects. *The Open Dermatol. J.* 4: 72–76.629-631.
- Chapman, R.F. 1998. *The Insects. Structure and Function.* Chapman R.F. (ed.). Londres.
- Coleman, R. E., and J. D. Edman. 1988. Feeding-site selection of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) on mice infected with *Leishmania mexicana amazonensis*. *J. Med. Entomol.* 25: 229–233
- Crosskey, R.W. 1990. Host animals, biting and bloodsucking. In: *the natural history of blackflies.* Wiley, Chichester. pp. 411–446.
- Cruz-Lopez, L., E.A Malo, J.C. Rojas, and E.D. Morgan. 2001. Chemical ecology of triatomine bugs: vectors of Chagas disease. *Med. Vet. Entomol.* 15: 351-357
- De Jong, R., and G. J. Knols. 1996. Selection of biting sites by mosquitoes. In *Olfaction in mosquito-host interactions.* Wiley, Chichester (Ciba Foundation symposium) 200: 89–103
- Donzé, G., C. McMahon, and P.M. Guerin. 2004. Rumen metabolites serve ticks to exploit large mammals. *J. Exp. Biol.* 207: 4283-4289.
- Downs, M.R,I. Harvey ,and C.T. Kennedy . 1999. The epidemiology of head lice and scabies in the UK. *Epidemiol. Infect.* 122:471–477

- Dusbábek, F., A. Jegorov, and P. Simek. 1991a. Identification of xanthine and hypoxanthine as components of assembly pheromone in excreta of argasid ticks. *Exp. Appl. Acarol.* 11: 307–316.
- Eichler, S., and G.A. Schaub. 2002. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Exp. Parasitol.* 100: 17–27
- Ezenwa, V.O., N.M. Gerardo, D.M. Inouye, M. Medina, and J.B Xavier. 2012. Animal behaviour and the microbiome. *Science* 338: 198–199.
- Fontan, A., P. G. Audino, A. Martinez, R. A. Alzogaray, E. N. Zerb, F. Camps, and A. Cork. 2002. Attractant volatiles released by female and male *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), a vector of chagas disease: chemical analysis and behavioral bioassay. *J. Med. Entomol.* 39: 191–197.
- Friend, W.G., and J. J. B. Smith. 1977. Factors Affecting Feeding by Bloodsucking Insects. *Annual Rev. Entomol.* 22:309-331
- Gallardo, A., G. Mougabure Cueto, and M. I. Picollo. 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
- Gallagher, M., C. J. Wysocki, J. J. Leyden, A. I. Spielman, X. Sun, and G. Preti. 2008. Analyses of volatile organic compounds from human skin. *Br.J. Dermatol.* 159: 780–791.

- Galvez Marroquin, Z., L. Cruz López, E. A. Malo, J. M. Ramsey, and J. C. Rojas. 2018. Behavioural and electrophysiological responses of *Triatoma dimidiata* nymphs to conspecific fecal volatiles. *Med. and Vet. Entomol.* 32: 102–110.
- Gancel, A.L., P. Ollitrault, Y. Froelicher, F. Tomi, C. Jacquemond, F. Luro, and J. M. Brillouet. 2005. Leaf volatile compounds of six citrus somatic allotetraploid hybrids originating from various combinations of lime, lemon, citron, sweet orange, and grapefruit, *J. Agric. Food Chem.* 536: 2224–2230.
- Ghaninia, M., M. Larsson, B. S. Hansson, and R. Ignell. 2008. Natural odor ligands for olfactory receptor neurons of the female mosquito *Aedes aegypti*: use of gas chromatography-linked single sensillum recordings. *J. Exp. Biol.* 211: 3020–3027.
- Gibson, G and S. J. Torr. 1999. Visual and olfactory responses of haematophagous Diptera to host stimuli. *Med. and Vet. Entomol.* 13:2-23.
- Gikonyo, N. K., A. Hassanali, P. G. Njagi, P. M. Gitu, and J. O. Midiwo. 2002. Odor composition of preferred (buffalo and ox) and non-preferred (waterbuck) hosts of some Savanna tsetse flies. *J. Chem. Ecol.* 28: 969–981.
- Goetz, N., G. Kaba, D. Good, G. Hussler, and P. Bore. 1987. Detection and identification of volatile compounds evolved from human hair and scalp using headspace gas chromatogram. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 39:1–13.
- Govere, J.M., R. Speare, and D.N. Durrheim. 2003. The prevalence of pediculosis in rural South African schoolchildren. *S. Afr. J. Sci.* 99:21–23

- Gratz, N.G. 1997. Human lice. Their prevalence, control and resistance to insecticides—a review 1985–1997. WHO/CTD/WHOPES/ 97.8ph. J. Soc. Cosmet. Chem. 39:1–13.
- Grenacher, S., T. Krober, P. M. Guerin, and M. Vlimant. 2001. Behavioural and chemoreceptor cell responses of the tick, *Ixodes ricinus*, to its own faeces and faecal constituents. Exp. Appl. Acarol. 25: 641–660.
- Guerenstein, P. G., and P. M. Guerin. 2001. Olfactory and behavioural responses of the blood-sucking bug *Triatoma infestans* to odours of vertebrate hosts. J. Exp. Biol. 204: 585–597.
- Hanai, T. and C. Hong. 1989. Structure-retention correlation in CGC. J. Hi. Res. Chromatogr. 125: 327–332.
- Harraca, V., C. Ryne, G. Birgersson, and R. Ignell. 2012. Smelling your way to food: can bed bugs use our odour? J. Exp. Biol. 215: 623–629.
- Hatsushika, R., S. Naramoto, and K. Miyoshi. 1983. Scanning electron microscope studies on head louse, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). Kawasaki Med. J. 9: 109–119.
- Heukelbach. J., T. Wilcke, B. Winter, and H. Feldmeier .2005. Epidemiology and morbidity of scabies and pediculosis capitis in resource-poor communities in Brazil. Brit. J. Dermatol. 153:150–156
- Heukelbach. J., H.D. Mazigo, E. Obasy, W. Mauka, P. Manyiri, M. Zinga, E. J .Kweka, and L. Mnyone. 2010. Knowledge, Attitudes, and Practices about Malaria and Its Control

in Rural Northwest Tanzania. *Malaria Research and Treatment* Volume 2010,  
Article ID 794261, 9 pages.

Jacobson, M. 1972. *Insect Sex Pheromone* Academic Press, New York and London, 382 pp.

Jaffe, K. 1987. Evolution of territoriality and nestmate recognition systems in ants, pp.  
295–311. In: Pasteels, J. M., and J. L. Deneubourg (eds.), *from individual to  
collective behavior in social insects*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.

Johnson, K. P., J. D. Weckstein, S. E. Bush, and D. H. Clayton. 2011. The evolution of host  
specificity in dove body lice. *Parasitology*. 138: 1730–1736.

Karlson, P., and M. Lüscher. 1959. Pheromones: a new term for a class of biologically active  
substances. *Nature*. 183: 55-56

Kirkness, E.F., Haaas, B.J., Sun, W., Braig, H.R., Perotti, M.A., Clark, J.M., Lee, S.H.,  
Robertson, H. M., Kennedy, R.C., Elhaik, E., Gerlach, D., Kriventseva, E.V., Elsik, C.G.,  
Graur, D., Hill, C.A., Veenstra, J.A., Walenz, B., Tubio, J.M., Ribeiro, J.M., Rozas, J.,  
Johnston, J.S., Reese, J.T., Popadic, A., Tojo, M., Raoult, D., Reed, D.L., Tomoyasu, Y.,  
Kraus, E., Mittapalli, O., Margam, V.M., Li, H.M., Meyer, J.M., Johnson, R.M.,  
Romero-Severson, J., Vanzee, J.P., Alvarez-Ponce, D., Vieira, F.G., Aguade, M.,  
Guirao-Rico, S., Anzola, J.M., Yoon, K.S., Strycharz, J.P., Unger, M.F., Christley, S.,  
Lobo, N.F., Seufferheld, M.J., Wang, N., Dasch, G.A., Struchiner, C.J., Madey, G.,  
Hannick, L.I., Bidwell, S., Joardar, V., Caler, E., Shao, R., Barker, S.C., Cameron, S.,  
Bruggner, R.V., Regier, A., Johnson, J., Viswanathan, L., Utterback, T.R., Sutton, G.G.,

- Lawson, D., Waterhouse, R.M., Venter, J.C., Strausberg, R.L., Berenbaum, M.R., Collins, F. H., Zdobnov, E.M., and B.R. Pittendrigh. 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.
- Kittler, R., M. Kayser, and M. Stoneking. 2003. Molecular evolution of *Pediculus humanus* and the origin of clothing. *Curr. Biol.* 13: 1414–1417.
- Khan, M., S.C. Verma, S.K. Srivastava, A.S. Shawl, K.V. Syamsundar, S.P.S. Khanuja, and T. Kumar. 2009. Essential oil composition of *Taxus wallichiana* Zucc. from the Northern Himalayan region of India, *Flavour Fragr. J.* 215:772–775.
- Knols, B. G. J., J. J. A van Loon, A. Cork, R. D. Robinson, W. Adam, J. Meijerink, R. De Jong, and W. Takken. 1997. Behavioural and electrophysiological responses of the female malaria mosquito *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) to Limburger cheese volatiles. *Bull. Entomol. Res.* 87:151–159.
- Kokturk. A., K. Baz, R. Bugdayci, T. Sasmaz, U. Tursen, T. Kaya, and G. Ikizoglu. 2003. The prevalence of pediculosis capitis in schoolchildren in Mersin, Turkey. *Int. J. Dermatol.* 42:694–698
- Labows, J.N., K.J.McGinley, A.M. Kligman.1982. Perspectives on axillary odor. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 34:193–202
- Law, J.H., and F.E. Regnier. 1971. Pheromones. *Annual Review Biochem.*, 40: 533-548

- Leal, W. S., M. R. Barbosa, F. Zeng, G. B. Faierstein, T. Kaiming, H.S.M. Paiva, R. D. G Duschinka, M. Crespo, and F.J.C Ayres .2017. Does Zika virus infection affect mosquito response to repellents? Sci Rep 7, 42826, doi:10.1038/srep42826
- Lehane, M. J. 2005. Biology of Blood-sucking in Insects. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Logan, J. G., M. A. Birkett, S. J. Clark, S. Powers, N. J. Seal, L. J. Wadhams, A. J. Mordue Luntz, and J. A. Pickett. 2008. Identification of human-derived volatile chemicals that interfere with attraction of *Aedes aegypti* mosquitoes. J. Chem. Ecol. 34: 308–322.
- Logan, J. G., N. J. Seal, J. I. Cook, N. M. Stanczyk, M. A. Birkett, S. J. Clark, S. A. Gezan, L. J. Wadhams, J. A. Pickett, and A. J. Mordue. 2009. Identification of human-derived volatile chemicals that interfere with attraction of the Scottish biting midge and their potential use as repellents. J. Med. Entomol. 46: 208–219.
- Logan, J. G., N. M. Stanczyk, A. Hassanali, J. Kemei, A. E. G. Santana, K. A. L. Ribeiro, J. A. Pickett, and A. J. Mordue. 2010. Arm-in-cage testing of natural human-derived mosquito repellents. Malar. J. 9–239.
- Lorenzo Figueiras, A. N., A. Kenigsten, and C. R. Lazzari. 1994. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: Chemical signals and temporal pattern. J. Insect. Physiol. 40: 311– 316.

- Lorenzo, M. G., and C. R. Lazzari. 1996. The spatial pattern of defecation in *Triatoma infestans* and the role of faeces as a chemical mark of the refuge. *J. Insect. Physiol.* 42: 903–907.
- Lorenzo Figueiras, A. N., and C. R Lazzari. 1998. Aggregation in the haematophagous bug *Triatoma infestans*: a novel assembling factor. *Physiol. Entomol.* 23: 33–37.
- Mimouni, D., O.E. Ankol, M. Gdalevich, I. Grotto, N. Davidovitch, E. Zangvil. 2002. Seasonality trends of Pediculosis capitis and Phthirus pubis in a young adult population: follow-up of 20 years. *J. Eur. Acad. Dermatol Venereol.* 16:257-259.
- McLafferty, F.W. 2005. Wiley registry of mass spectral data. *J. Chem. Ecol.* 26: 1367–1382.
- Meijerink, J. M. A., H. Braks, A. Brack, T. Adam, M. Dekker, A. Posthumus, T. A. Van Beek, and J. A. Van Loon. 2000. Identification of Olfactory Stimulants for *Anopheles gambiae* from Human Sweat Sam. *J. Chem. Ecol.* 26: 6–2000
- Mota, T., A. C. R. Vitta, A. N. Lorenzo Figueiras, C. P Barezani, and C. L. Zani. 2014. A multi-species bait for Chagas disease vectors. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8(2): e2677.
- Mumcuoglu, K., R. Galun, 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., 2008. Human lice: Pediculus and Pthirus. In: Paleomicrobiology-Past human infections. Raoult D & Drancourt M (Eds.). Springer, Berlin, pp: 215-222

Mustaparta, H. 1984. Olfaction in chemical Ecology of Insects, ed. Bell, W.J. & Cardé, R.T. pp: 37-72. London: Chapman & Hall.

Nicolaidis, N. 1974. Skin lipids: their biochemical uniqueness. *Science*. 186: 19–26.

Nuttall, G.H.F. 1917. The biology of *Pediculus humanus*. Quick laboratory, University of Cambridge, Cambridge, UK.

Oliveira-Filho, J. G., L. L. Ferreira, A. L. F. Sarria, J. A. Pickett, M. A. Birkett, G. M. Mascarin, A. A. Perez de Leon, and L. Miranda-Ferreira-Borges. 2017. Brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, infestation of susceptible dog hosts is reduced by slow release of semiochemicals from a less susceptible host Ticks. *Tick. Borne Dis.* 8:139-145

Ortega-Insaurralde, I., A. C. Toloza, P. Gonzalez-Audino, G. A. Mougabure Cueto, A. Alvarez-Costa, G. Roca-Acevedo, 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-Insaurralde, I., A. Toloza, P. Gonzalez-Audino, and M.I. Picollo. 2016. Arrestant effect of human scalp compounds on head louse (Phthiraptera: Pediculidae) behavior. *J. Med. Entomol.* 1–6.

Ortega-Insaurralde, I., S. Minoli, A. Toloza, M. I. Picollo, and R. Barrozo. 2019. The sensory machinery of the head louse *Pediculus humanus capitis*: from the antennae to the brain. *Front. Physiol.* 10: 434.

- Osterkamp, J., U. Wahl, G. Schmalfluss, and W. Haas. 1999. Host-odour recognition in two tick species is coded in a blend of vertebrate volatiles. *J. Comp. Physiol. A.* 185: 59–67.
- Payot, F., 1920. contribution a l etude du *Phthirus pubis* (Linne, Leach). *Bull Soc vaud Natl.* 53:127-161.
- Penn, D. J., E. Oberzaucher, K. Grammer, G. Fischer, H. A. Soini, D. Wiesler, M. V. Novotny, S. J. Dixon, Y. Xu, and R. G. Brereton. 2007. Individual and gender fingerprints in human body odour. *J. r. Soc. Interface.* 4:331–340
- Picollo, M. I., C. V. Vassena, A. A. Casadio, J. Massimo, and E. N. Zerba. 1998. Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura; Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 35: 814–817.
- Penn, D. J., E. Oberzaucher, K. Grammer, G. Fischer, H. A. Soini, D. Wiesler, M. V. Novotny, S. J. Dixon, Y. Xu, and R. G. Brereton. 2007. Individual and gender fingerprints in human body odour. *J. r. Soc. Interface.* 4: 331–340.
- Peock, S. and J. W. Maunder. 1993. Arena tests with piperonal, a new louse repellent. *J. r. Soc. Health.* 113: 292–294.
- Picollo, M. I., C. V. Vassena, A. A. Casadio, J. Massimo, and E. N. Zerba. 1998. Laboratory studies of susceptibility and resistance to insecticides in *Pediculus capitis* (Anoplura; Pediculidae). *J. Med. Entomol.* 35: 814–817.

- Pires, H. H. R., M. G. Lorenzo, L. Diotaiuti, C. R. Lazzari, and A. N. Lorenzo Figueiras. 2002. Aggregation behaviour in *Panstrongylus megistus* and *Triatoma infestans*: inter and intra-specific responses. *Acta Trop.* 81: 47–52.
- R Core Team. 2013. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reed, D., V. Smith, S. Hammonf, A. Rogers, and D. Clayton. 2004. Genetic analysis of lice supports direct contact between modern and archaic humans. *PLoS Biol.* 2 (11): 1972-1983.
- Rezende, C. M., and S.R.G. Fraga. 2003. Chemical and aroma determination of the pulp and seeds of murici (*Byrsonima crassifolia* L.), *J. Braz. Chem. Soc.* 143: 425–428.
- Schofield, C.J. and J.W. Patterson. 1977. Assembly pheromone of *Triatoma infestans* and *Rhodnius prolixus* nymphs (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.*, 13 (1977), pp. 727-734
- Shibamoto, T., Y. Kamiya, and S. Mihara. 1981. Isolation and identification of volatile compounds in cooked meat: sukiyaki, *J. Agric. Food Chem.* 291: 57–63.
- Siljander. E., R. Gries, and G. Khaskin. 2008. Identification of the airborne aggregation pheromone of the common bed bug, *Cimex lectularius*. *J. Chem. Ecol.* 34: 708–718.
- Speare, R., and P. Buettner .1999. Head lice in pupils of a primary school in Australia and implications for control. *Int. J. Dermatol.* 38: 285-290

- Städler, E. 1984. Contact chemoreception in chemical Ecology of Insects. Ed.: Bell. W.J. & Cardé, R.T. pp: 3-36. London, Chapman & Hall.
- Takano-Lee, M., J. D. Edman, B. A. Mullens, and J. M. Clark. 2005. Transmission potential of the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). Int. J. Dermatol.44: 811–816.
- Tatsuka, K., S. Suekane, Y. Sakai, and H. Sumitani. 1990. Volatile constituents of kiwi fruit flowers: simultaneous distillation and extraction versus headspace sampling, J. Agric. Food Chem. 38: 12–2
- Toloza, A., C. Vassena, A. Gallardo, P. González-Audino, and M. I. Picollo. 2009. Epidemiology of Pediculosis capitis in elementary schools of Buenos Aires, Argentina. Parasitol. Res. 104: 1295–1298.
- Usinger, R. L.1966. Monograph of Cimicidae (Hemiptera-Heteroptera). College Park: Entomological Society of America. United States.
- Venables, W. N. and B. D. Ripley. 2002. Modern applied statistics using S, 4<sup>th</sup> ed. Springer, New York
- Viña, A., and E. Murillo. 2003. Essential oil composition from twelve varieties of basil (*Ocimum* spp) grown in Columbia, J. Braz. Chem. Soc. 15:744–749.
- Vitta, A., N.A. Figueiras, C.R Lazzari, L. Diotaiuti, and M.G Lorenzo. 2002. Aggregation mediated by faeces and footprints in *Triatoma pseudomaculata* (Heteroptera: Reduviidae), a Chagas disease vector. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 97: 865–867.

- Vitta, A., T. Mota, L. Diotaiuti, and M. Lorenzo. 2007. The use of aggregation signals by *Triatoma brasiliensis* (Heteroptera: Reduviidae). *Acta. Trop.* 101:147–152.
- Wada-Katsumataa, A., L. Zurekc, G. Nalyanyaa, G. W. Roelofsd, A. Zhangf, and C. Schal. 2015. Gut bacteria mediate aggregation in the German cockroach. *PNAS* 112:15678–15683.
- Wigglesworth, V. 1941. The sensory physiology of the human louse *Pediculus humanus corporis* De Geer (Anoplura). *Parasitology.* 32: 67–109.
- Yamaguchi, K. and T. Shibamoto. 1979. Volatile constituents of Castanopsis flower, J. *Agric. Food Chem.* 274: 847–850.
- Yamaguchi, K. and T. Shibamoto. 1981. Volatile constituents of green tea, Gyokuro (*Camellia sinensis L. var Yabukita*), J. *Agric. Food Chem.* 292:366–370.
- Yong, Z., P. E. Fournier, E. Rydkina, and D. Raoult. 2003. The geographical segregation of human lice preceded that of *Pediculus humanus capitis* and *Pediculus humanus humanus*. *CRBiologies* 326: 565– 574.
- Wall, R. 2007. Ectoparasites: Future Challenges in a changing world. *Vet. Parasitology.* 14: 62-74
- Zuur, A.F., E. N. Ieno, N. Walker, A. Anatoly, and Saveliev. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R, pp. 574–580. Verlag, New York.

<https://www.weh.ox.ac.uk/research/typhus-in-naples-1943-44-a-study-in-vector-control>

fuelle BBC, <https://abcnews.go.com/Health/typhus-fever-outbreak-la-prompts-question/story?id=58306414>)

<https://www.alamy.com/this-image-depicts-a-dorsal-view-of-a-female-head-louse-pediculus-image155846133.html>)

<https://www.npr.org/sections/health-shots/2019/03/26/706616008/video-head-lice-up-close-and-all-too-personal>

[www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

# **PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS**