

**UNIVERSITAT
DE
VALÈNCIA**



**FACULTAT
DE
FARMÀCIA**

TESIS DOCTORAL INTERNACIONAL

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN
PARASITOLOGÍA HUMANA Y ANIMAL (3145)**

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia
Facultat de Farmàcia, Universitat de València, Valencia, España

**CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA
MORFOLOGÍA Y LA EPIDEMIOLOGÍA DEL PIOJO DE LA
CABEZA**

***PEDICULUS HUMANUS CAPITIS*
(PHTHIRAPTERA: PEDICULIDAE)**

**CONTRIBUTION TO THE KNOWLEDGE OF
MORPHOLOGY AND EPIDEMIOLOGY OF THE LOUSE OF THE
HEAD *PEDICULUS HUMANUS CAPITIS*
(PHTHIRAPTERA: PEDICULIDAE)**

Por

BLANCA ESTHELA ÁLVAREZ FERNÁNDEZ

Directoras

Prof. Dra. M^a Adela Valero Aleixandre

Catedrática de Parasitología

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Facultat de
Farmàcia, Universitat de València, España

y

Prof. Dra. María Manuela Morales Suárez-Varela

Catedrática de Medicina Preventiva y Salud Pública

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació,
Bromatologia, Toxicologia i Medicina Legal, Facultat de Farmàcia, Universitat de
València, España

Valencia, abril 2023

Las abajo firmantes, Prof. Dra. **MARIA ADELA VALERO ALEIXANDRE**, Catedrática de Parasitología del Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia y la Prof. Dra. **MARÍA MANUELA MORALES SUÁREZ-VARELA**, Catedrática de Medicina Preventiva y Salud Pública del Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública, Ciències de l'Alimentació, Bromatologia, Toxicologia i Medicina Legal, de la Facultat de Farmàcia de la Universitat de Valencia, por la presente:

CERTIFICAN:

Que la graduada Dña. **BLANCA ESTHELA ÁLVAREZ FERNÁNDEZ** ha realizado el trabajo titulado “**CONTRIBUCIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA MORFOLOGÍA Y LA EPIDEMIOLOGÍA DEL PIOJO DE LA CABEZA *PEDICULUS HUMANUS CAPITIS (PHTHIRAPTERA: PEDICULIDAE)***” bajo su dirección, con el fin de optar al título de Doctor Internacional por la Universitat de València.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente informe en València, a 20 de abril de 2023.

Fdo: Prof. Dra. M. Adela Valero Fdo: Prof. Dra. María Manuela Morales
Aleixandre Suárez-Varela

A DIOS
A MI FAMILIA

The content of this thesis has been published in the following articles:

- Álvarez-Fernández, B. E., Morales-Suárez-Varela, M., Noguera-Torres, B. & Valero, M. A (2021). *Pediculus humanus capitis*: a study of the male genitalia using a combined stereoscopic, confocal laser scanning, and scanning electron microscopy approach. *Parasites & Vectors*, 14(1), (1-10. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05082-w>)
- Álvarez-Fernández, B. E., Valero, M. A., Noguera-Torres, B., & Morales-Suárez-Varela, M. M. (2023). Embryonic development of *Pediculus humanus capitis*: morphological update and proposal of new external markers for the differentiation between early, medium, and late eggs. *Acta Parasitologica*, 1-10. (<https://doi.org/10.1007/s11686-023-00667-0>)
- Álvarez-Fernández, B. E., Morales-Suárez-Varela, M., Noguera-Torres, B. & Valero, M. A. Morphological analysis of the ecdysial pattern of *Pediculus humanus capitis* in exoskeletons combining three state-of-the-art microscopy techniques. Submitted

Citaci3n:

3lvarez-Fern3ndez, B. E., Contribuci3n al conocimiento de la morfolog3a y la epidemiolog3a del piojo de la cabeza *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae). Tesis Doctoral Internacional (Dir. M.A. Valero Aleixandre, M. M. Morales Su3rez-Varela). Facultat de Farm3cia. Universitat de Val3ncia, Espa3a. 136 pp.

ABSTRACT

The head louse *Pediculus humanus capitis* is a hematophagous ectoparasite that causes pediculosis capitis, one of the most common dermatological diseases worldwide. Given this, the need to elucidate important aspects of the development of human lice in natural infestation conditions and discover the involved risk factors that lead to a certain prevalence of pediculosis capitis, lice samples were obtained from primary school students of Guerrero (Mexico). The results have been grouped into four sections. **A.** *Pediculus humanus capitis*: a study of male genitalia. The morphological details and complexity of the male genitalia at different stages of copulation and at rest were described for the first time, using stereoscopic microscopy (SM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM). The vesica is composed of two distinct anatomical parts, the proximal lobe and the distal lobe. Both lobes have short narrow spines, as well as long and wide scales with sharp or rounded tips. The round scales vary in size and have a wavy base and rounded tips, resembling a tongue. A gland-like area on the penis with 11 shallow circular depressions and a flat area with 14–16 exit orifices was identified. The apical end of the penis has a foliaceous trifurcation to expel the contents of the ejaculatory duct. These characteristics had not been previously described in any suborder of lice. **B.** Embryonic development of *P. h. capitis*: morphologic update and proposal of new external markers for the differentiation between early, medium, and late eggs. The morphological characteristics of *P. h. capitis* were described and analyzed through SM with a special focus on embryonic development. The eggs possess an operculum with 10 aeropyles, and no micropyles were observed. For the first time, the presence of defective/unviable eggs because of the apparent lack of yolk granules was documented. The early eggs present yolk granule content and development of the germ band, while the middle eggs have an embryonic rudiment with outlines of eyes and limbs. In late eggs, embryos with eyes and antennae can be observed, with a thorax that has three pairs of legs and an abdomen with six pairs of spiracles. At the end of this stage, the embryo acquires the morphology of nymph I. The established morphological characteristics were present, and additional biomarkers are proposed (i.e., the presence of spiracles and antennae, and the proportion occupied by the embryo) to facilitate the differentiation at each stage. The updated morphological characteristics of *P. h. capitis* eggs facilitate the standardization of toxicological tests in the search for ovicidal drugs. **C.** Morphological analysis of the ecdysial pattern of *P. h. capitis* in exoskeletons. Combining SM, CLSM, and SEM, morphological details of the naturally molted exoskeletons of the head louse are described. The exoskeletons present a visible expansion and a consistent pattern of the ecdysial opening, located anteriorly on the dorsal midline of the exoskeletons and ending at the apex of the metathorax. The respiratory system, composed of thoracic and abdominal spiracles, tracheas, tracheoles, and taenidia, is attached to the exoskeleton. The abdominal spiracles present a circular peritreme with concentric wavy shapes. Inside the spiracular atrium, valve-like structures that control the inflow of oxygen to the respiratory system are located. The respiratory system is completely replaced at each stage of the metamorphosis. This is the first study to address the morphology of the exoskeletons of *P. h. capitis* with the combination of state-of-the-

art microscopy techniques. These results serve as the basis for future research on the physiological characterization and regulation of the morphological development and ecdysis in lice. **D.** The prevalence of pediculosis capitis in students at a primary school in Chilpancingo, Guerrero, Mexico. A questionnaire completed by the parents/caregivers about the presence of pediculosis in their children and related risk factors was applied. The collected data from the questionnaire were analyzed using the SPSS® v.26 software. The children who suffered from pediculosis capitis in the last 12 months were 126 (19 males; 107 females), corresponding to a prevalence of 50.6 parasitized children for every 100 children. Conversely, before the last 12 months, 232 children (66 males; 166 females) had been parasitized, corresponding to a prevalence of 49.4 parasitized individuals for every 100 children. There are no significant differences between the prevalence of the last 12 months and that valued at the time of the study. Being a girl, the presence of infested family members, and a mother younger than 30 years old were factors associated with suffering from pediculosis capitis. The low participation in the study indicates the stigmatization of this parasite and the need to disseminate information concerning pediculosis. Regional studies of this nature are important to determine the current situation of pediculosis and define the type of intervention required in each case given its complexity.

Keywords: *Pediculus humanus capitis*, genitalia, embryogenesis, nymph, exoskeletons, ecdysis, Epidemiology, Guerrero, children, Mexico.

RESUMEN

El piojo de la cabeza *Pediculus humanus capitis* es un ectoparásito hematófago que causa la pediculosis capitis, una de las enfermedades dermatológicas más comunes a nivel mundial. Dada la necesidad de dilucidar aspectos importantes del desarrollo de los piojos humanos en condiciones naturales de infestación y descubrir los factores de riesgo involucrados que conducen a una cierta prevalencia de pediculosis capitis, se obtuvieron muestras de piojos de estudiantes de primaria de Guerrero (México). Los resultados obtenidos se han agrupado en cuatro apartados. **A.** *Pediculus humanus capitis*: estudio de la genitalia masculina. Se revela por primera vez los detalles morfológicos y la complejidad de la genitalia masculina del piojo de la cabeza en diferentes etapas de la cópula y en reposo, utilizando microscopía estereoscópica (SM), microscopía de barrido láser confocal (CLSM) y microscopía electrónica de barrido (SEM). La vesica se compone de dos partes anatómicas distintas, el lóbulo proximal y el lóbulo distal. Ambos lóbulos tienen espinas cortas y estrechas, así como escamas largas y anchas con puntas afiladas o redondeadas. Las escamas redondeadas varían en tamaño y tienen una base ondulada y puntas redondeadas, por lo que se asemejan a una lengua en apariencia. Se identifica un área similar a una glándula en el pene con 11 depresiones circulares poco profundas y un área plana con 14-16 orificios de salida. El extremo apical del pene tiene una trifurcación foliácea y sirve para expulsar el contenido del conducto eyaculador. Estas características no habían sido descritas previamente para ningún suborden de piojos. **B.** Desarrollo embrionario de *P. h. capitis*: actualización morfológica y propuesta de nuevos marcadores externos para la diferenciación entre huevos tempranos, medios y tardíos. Mediante SM se describe y analizan las características morfológicas de los huevos de *P. h. capitis* con enfoque especial en el desarrollo embrionario. Los huevos muestran un opérculo con 10 aerópilos, no se observaron micropilos. Por primera vez se documenta la presencia de huevos defectuosos inviables por aparente ausencia de gránulos de yema. Los huevos tempranos presentan contenido de gránulos de yema y desarrollo de la banda germinal, mientras que los huevos medios tienen un rudimento embrionario con contornos de ojos y extremidades. En huevos tardíos se pueden observar embriones con ojos y antenas, con un tórax que tiene tres pares de patas y un abdomen con seis pares de espiráculos. Al final de esta etapa, el embrión adquiere la morfología de ninfa I. Las características morfológicas establecidas estaban presentes y se proponen biomarcadores adicionales (es decir, la presencia de espiráculos, presencia de antenas, y la proporción que ocupa el embrión) para facilitar la diferenciación en cada etapa. Las características morfológicas actualizadas en los huevos de *P. h. capitis* facilitan la estandarización de las pruebas toxicológicas en la búsqueda de fármacos ovicidas. **C.** Análisis morfológico del patrón ecdisial de *P. h. capitis* en exoesqueletos. Combinando SM, CLSM y SEM, se describen detalles morfológicos de los exoesqueletos mudados naturalmente del piojo de la cabeza. Los exoesqueletos presentan una expansión visible y un patrón consistente de la abertura ecdisial, ubicada anteriormente en la línea media dorsal de los exoesqueletos que terminan en el vértice del metatórax. El sistema respiratorio, compuesto por espiráculos torácicos y abdominales, tráqueas, traqueolas y tenidios, se presenta adherido al exoesqueleto. Los espiráculos abdominales presentan peritrema circular con formas

onduladas concéntricas. Dentro del atrio espiracular se localizan estructuras parecidas a válvulas que controlan la entrada de oxígeno al sistema respiratorio. El sistema respiratorio se reemplaza por completo en cada etapa de metamorfosis. Este es el primer estudio que aborda la morfología de los exoesqueletos de *P. h. capitis* con la combinación de técnicas de microscopía de última generación. Estos resultados sirven de base para futuras investigaciones sobre la caracterización fisiológica y la regulación del desarrollo morfológico y la ecdisis en piojos. **D.** Prevalencia de pediculosis capitis en estudiantes de una escuela primaria de Chilpancingo, Guerrero. México. Se aplicó un cuestionario completado por los padres/tutores sobre la presencia de pediculosis en sus hijos y factores de riesgo relacionados. Los datos recopilados del cuestionario se analizaron con el software SPSS® v.26. Los niños que padecieron pediculosis capitis en los últimos 12 meses fueron 126 (19 varones; 107 mujeres), lo que corresponde a una prevalencia de 50,6 niños parasitados por cada 100 niños. En tanto, antes de los últimos 12 meses se habían parasitado 232 niños (66 varones; 166 mujeres), lo que corresponde a una prevalencia de 49,4 individuos parasitados por cada 100 niños. No existen diferencias significativas entre la prevalencia de los últimos 12 meses y la valorada en el momento de la realización del estudio. El perfil identificado fue ser niña, la presencia de familiares infestados y una madre menor de 30 años fueron factores asociados a padecer pediculosis capitis. La baja participación en el estudio indica la estigmatización que presenta esta parasitación y la necesidad de difusión de información sobre la pediculosis. Estudios regionales de esta naturaleza, son importantes para determinar la situación actual de la pediculosis y definir el tipo de intervención que se requiere en cada caso y situación dada su complejidad.

Palabras clave: *Pediculus humanus capitis*, genitalia, embriogénesis, ninfa, exoesqueletos, ecdisis, Epidemiología, Guerrero, niños, México.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento a la Prof. **Dra. M.^a ADELA VALERO ALEIXANDRE**, Catedrática de Parasitología de la Universitat de València, en calidad de directora de tesis, por todos estos años de formación, conocimientos, paciencia y apoyo. Gracias por ser parte de mi formación académica desde mis estudios de Máster y aprender de toda su experiencia. De igual manera me siento profundamente agradecida con mi codirectora de tesis doctoral, la Prof. **Dra. MARÍA MANUELA MORALES SUÁREZ-VARELA**, Catedrática de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universitat de València, por toda su disponibilidad y asesoría durante estos años de doctorado. Muchas gracias a ambas por brindarme su confianza en todo momento y tener siempre las palabras justas para motivarme a continuar con este hermoso trabajo. Mil gracias, con nada podré pagar por todo el apoyo que me han brindado.

Quiero dar las gracias al **Prof. Dr. BENJAMÍN NOGUEDA TORRES**, Profesor Investigador de Tiempo Completo del Instituto Politécnico Nacional, Jefe del laboratorio de Helmintología del Departamento de Parasitología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y Profesor Titular de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Polotécnico Nacional, México, por su valiosa asesoría y contribución en la elaboración de los artículos científicos resultantes. Gracias por su siempre gentil disposición.

El presente trabajo se ha llevado a cabo en la Unidad de Parasitología Sanitaria de la Universitat de València, Centro Colaborador Oficial de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Ginebra en “Fascioliasis y sus Moluscos Vectores” y Centro de Referencia de la FAO/Naciones Unidas, en los que el Prof. Dr. Dr. Honoris Causa **SANTIAGO MAS-COMA**, Catedrático de Parasitología de la Universitat de València, es el director y la Catedrática de Parasitología, **M. DOLORES BARGUES CASTELLO** es subdirectora, y a los que quiero expresar mi agradecimiento por toda la formación y ayuda brindada desde que inicié mi formación de posgrado.

Me gustaría expresar mi agradecimiento al resto de miembros del Departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universitat de València por todo su apoyo. Agradezco también a mis compañeras del laboratorio y amigas, Dra. MARTA REGUERA por brindarme de su valiosa ayuda y

experiencia profesional en todo momento, Dña. ELIZABETH CHOQUETICLLA, por su entrañable amistad y compañía.

Mi sincero agradecimiento y reconocimiento para el personal del Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE) de la Universitat de València, por el increíble trabajo que desempeñan cada día, agradezco la ayuda de Dña. MARIA TERESA MÍNGUEZ, Dra. PILAR GÓMEZ, Dr. ENRIQUE NAVARRO, Dña. CLARA YÉBENES, Dña. MARÍA DURÁN y Dr. RAFAEL BENITO, estoy infinitamente agradecida por su tiempo y en deuda por siempre.

Este estudio se ha llevado a cabo gracias a la financiación proporcionada por varios proyectos, programas y becas de diferentes organismos e instituciones:

- Proyectos nº 2016/099 y nº 2021/004 del Programa PROMETEO, Programa de Ayudas para Grupos de Investigación de Excelencia, Generalitat Valenciana, Valencia, España.
- Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales – RICET (Proyectos Nos. RD16/0027/0023 y RD16/0027/0013 de la PN de I+D+I, ISCIII-Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa RETICS) , Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid
- Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER), Area de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), ISC III, C. Monforte de Lemos 3-5, 28029 Madrid, Spain.
- Consorcio para la Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain

ÍNDICE	Pág
ABSTRACT	V
RESUMEN	VII
AGRADECIMIENTOS	IX
ÍNDICE.....	XIII
ÍNDICE DE FIGS.....	XVII
ÍNDICE DE TABLAS.....	XIX
ABREVIATURAS	XXI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Introducción	3
1.1. Información histórica de <i>Pediculus humanus</i>	3
1.2. Sistemática de Phthiraptera.....	5
1.3. Aspectos sanitarios.....	7
1.4. Epidemiología	10
1.5. Ciclo de vida y ecología de <i>Pediculus humanus capitis</i>	11
1.6. Manifestaciones clínicas	13
1.7. Diagnóstico	14
1.8. Tratamiento y prevención	15
1.9. Morfología y biología de <i>Pediculus humanus</i>	17
1.10. Diferenciación morfológica entre machos y hembras de <i>Pediculus humanus</i> ..	18
1.11. Objetivos.....	21
CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS	23
2. Material y métodos	25
2.1. Población de estudio	25

2.2. Diagnóstico de infestación.....	25
2.2.1. Método de peinado para optimizar la obtención de muestras.....	26
2.3. Recolección y transporte de muestras.....	27
2.4. Material parasitológico	28
2.5. Técnicas de microscopía.....	29
2.5.1. Microscopía Estereoscópica (SM)	29
2.5.2. Microscopía de Barrido Láser Confocal (CLSM).....	29
2.5.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	30
2.5.3.1. Secado de punto crítico de muestras biológicas para SEM.....	30
2.6. Solución de Karnovsky	33
2.7. Declaración ética y consentimiento para participar	34

CAPITULO III. *PEDICULUS HUMANUS CAPITIS*: A STUDY OF THE MALE GENITALIA USING A COMBINED STEREOSCOPIC, CONFOCAL LASER SCANNING, AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY APPROACH..... 35

3. <i>Pediculus humanus capitis</i> : a study of the male genitalia using a combined stereoscopic, confocal laser scanning, and scanning electron microscopy approach .	37
3.1. Introduction.....	37
3.2. Material and methods.....	38
3.2.1. Specimens.....	38
3.2.2. Stereoscopic microscopy.....	38
3.2.3. Confocal laser scanning microscopy.....	39
3.2.4. Scanning electron microscopy	39
3.3. Results.....	39
3.3.1. Specimens at rest versus specimens at the copulation stage	39
3.3.2. Characteristics of the specimens at the copulation stage	40
3.3.3. Structures that compose the genitalia.....	42

3.4. Discussion	45
CAPÍTULO IV. EMBRYONIC DEVELOPMENT OF <i>PEDICULUS HUMANUS</i> <i>CAPITIS</i> : MORPHOLOGICAL UPDATE AND PROPOSAL OF NEW EXTERNAL MARKERS FOR THE DIFFERENTIATION BETWEEN EARLY, MEDIUM, AND LATE EGGS.....	49
4. Embryonic development of <i>Pediculus humanus capitis</i> : Morphological update and proposal of new external markers for the differentiation between early, medium, and late eggs	51
4.1. Introduction.....	51
4.2. Materials and methods	53
4.2.1. Specimens.....	53
4.2.2. Stereoscopic microscopy	53
4.3. Results.....	53
4.3.1. Egg morphology	54
4.3.2. Defective/non-viable eggs.....	55
4.3.3. Morphology of the embryogenesis.....	55
4.3.3.1. Early eggs	55
4.3.3.2. Medium eggs	56
4.3.3.3. Late eggs.....	56
4.4. Discussion	58
CAPÍTULO V. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL PATRÓN ECDISIAL DE <i>PEDICULUS HUMANUS CAPITIS</i> EN EXOESQUELETOS COMBINANDO TRES TÉCNICAS MICROSCÓPICAS DE ÚLTIMA GENERACIÓN.....	63
5. Análisis morfológico del patrón ecdisial de <i>Pediculus humanus capitis</i> en exoesqueletos combinando tres técnicas microscópicas de última generación	65
5.1. Introducción	65
5.2. Material y métodos	66
5.2.1. Especímenes	66

5.2.2. Microscopía estereoscópica.....	66
5.2.3. Microscopía de barrido láser confocal	67
5.2.4. Microscopía electrónica de barrido	67
5.3. Resultados	67
5.3.1. Descripción de las ninfas.....	68
5.3.2. Descripción del exoesqueleto	69
5.3.3. Patrón de ecdisis.....	70
5.3.4. Sistema respiratorio.....	71
5.4. Discusión.....	72
CAPÍTULO VI. PREVALENCIA DE PEDICULOSIS CAPITIS EN ESTUDIANTES DE UNA ESCUELA PRIMARIA DE CHILPANCINGO, GUERRERO, MÉXICO ...	75
6. Prevalencia de pediculosis capitis en estudiantes de una escuela primaria de Chilpancingo, Guerrero, México	77
6.1. Introducción	77
6.2. Material y métodos	78
6.2.1. Población de estudio y protocolo	78
6.2.2. Análisis estadístico.....	78
6.3. Declaración ética y consentimiento para participar	79
6.4. Resultados	79
6.5. Discusión.....	87
6.5.1. Limitaciones del estudio.....	89
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONS	91
CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS.....	97
ANEXO. PUBLICACIONES.....	115

ÍNDICE DE FIGS

Pág

Fig. 1. Especímenes de piojos arqueológicos.....	4
Fig. 2. Huevos/liendres hallados en sitios arqueológicos.....	4
Fig. 3. Subgrupos de Phthiraptera	7
Fig. 4. Vista dorsal de los piojos humanos.....	8
Fig. 5. Mapa de distribución de la pediculosis capitis a nivel mundial.....	11
Fig. 6. Ciclo biológico del piojo de la cabeza.	12
Fig. 7. Aspecto dorsal de ejemplares de <i>Pediculus humanus</i>	19
Fig. 8. Principales diferencias morfológicas externas entre el macho y la hembra de <i>Pediculus humanus</i>	20
Fig. 9. Material para obtención de ejemplares de piojos.....	26
Fig. 10. Método sistemático de peinado para optimizar la obtención de muestras.....	27
Fig. 11. Equipo de microscopía utilizado.....	30
Fig. 12. Equipo utilizado en la preparación y observación de muestras biológicas para SEM.....	33
Fig. 13. Male specimen of <i>P. h. capitis</i> under SM.....	40
Fig. 14. Male specimen of <i>P. h. capitis</i> under SEM.....	40
Fig. 15. Structures of the male genitalia of <i>P. h. capitis</i> studied under SM, CLSM, and SEM.....	41
Fig. 16. Detail of the structures of <i>P. h. capitis</i> under SEM	43
Fig. 17. Anatomical details of the penis of <i>P. h. capitis</i>	44
Fig. 18. Morphological details of the penis of <i>P. h. capitis</i> under SEM.....	45
Fig. 19. Morphology the <i>P. h. capitis</i> egg under SM.....	54
Fig. 20. Morphology of defective/non-viable and early <i>P. h. capitis</i> eggs under SM ...	55
Fig. 21. Morphology of medium <i>P. h. capitis</i> eggs under SM.....	56
Fig. 22. Morphology of late <i>P. h. capitis</i> eggs under SM	57
Fig. 23. Morfología comparativa de las etapas de desarrollo y exoesqueletos de <i>P. h. capitis</i> observados bajo SM.....	68
Fig. 24. Morfología de las etapas ninfales de <i>P. h. capitis</i> observadas bajo SM	69

Fig. 25. Morfología de exoesqueletos de <i>P. h. capitis</i>	70
Fig. 26. Sistema respiratorio adherido a exoesqueleto de etapa III de <i>P. h. capitis</i> , observado bajo SEM.....	71
Fig. 27. Tráqueas y traqueolas en un exoesqueleto en etapa III de <i>P. h. capitis</i> observadas bajo SEM.....	72
Fig. 28. Árbol de clasificación por el método de CHAID.....	80

ÍNDICE DE TABLAS

Pág

Tabla 1. Sistemática del género <i>Pediculus</i>	5
Tabla 2. Clasificación de Phthiraptera.....	6
Tabla 3. Número de especímenes utilizados en cada técnica microscópica.....	28
Table 4. Markers of embryonic development proposed in previous works and the present study.....	60
Tabla 5. Factores socioeconómicos de la pediculosis capitis.	83
Tabla 6. Tabla de árbol. Método de crecimiento CHAID	84
Tabla 7. Porcentaje de predicción de la pediculosis	85

ABREVIATURAS

ab	abdomen
ae	aeropyles
ANOVA	analysis of variance
ap	anterior pole
as	espiráculos abdominales
CHAID	chi-squared automatic interaction detection
cl	clípeo
CLSM	confocal laser scanning microscopy / microscopía de barrido láser confocal
CPD	critical point drying / secado de punto crítico
dil	dilator
dlv	distal lobe of the vesica
ds	dorsal side
em	embryo
ep	epicráneo
ey	eye
fl	first pair of legs
gb	germ band
go	genital opening
hd	cabeza
ht	haustelo
lp	leg primordium
m	mesomeres
mp	mouth primordium
ns	nit sheath
ob	opercular border
oc	occipucio
op	operculum
plv	proximal lobe of the vesica
PC	pediculosis capitis

pn	penis
op	opercular pole
pp	posterior pole
pr	parameres
SEM	scanning electron microscopy / microscopía electrónica de barrido
sl	second pair of legs
SM	stereoscopic microscopy / microscopía estereoscópica
sp	support of the penis
SPSS	statistical package for social sciences
sv	válvula espiracular
svs	spines of the vesica stem
tb	tunica basalis
tc	tarsal claw
tl	third pair of legs
ts	espiráculo torácico
tx	tórax
v	vesica
vs	ventral side
vs	vesica stem
wp	peritrema ondulado concéntrico

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Información histórica de *Pediculus humanus*

Históricamente, la infestación por piojos ha sido y sigue siendo un problema mundial debido a que pueden infestar a personas de todas las edades, nivel social y económico (Fu et al., 2022). Los piojos humanos son altamente específicos y han evolucionado junto con sus hospedadores durante miles de años, por lo que ofrecen una característica única para reconstruir la migración humana y su historia evolutiva, complementando así los registros fósiles de homínidos (Amanzougaghene et al., 2020). De hecho, los análisis filogenéticos de representantes del género *Pediculus* han confirmado algunos eventos en la evolución humana, por ejemplo, *Pediculus humanus* y *P. schaeffi* (piojos de chimpancés) compartieron un ancestro común hace aproximadamente 5,6 millones de años. Esto se correlaciona con la división genética de chimpancés y humanos hace aproximadamente 6 millones de años (Phadungsaksawasdi et al., 2021; Amanzougaghene et al., 2020).

La coevolución de piojos y humanos se ha demostrado mediante informes de especímenes arqueológicos encontrados alrededor del mundo. En Arica (Chile) se han documentado hallazgos de machos y hembras de piojos de la cabeza en perfecto estado de conservación recolectados de cuatro sitios arqueológicos (Núñez et al., 2017), liendres /huevos recolectados de momias (Arriaza et al., 2013), liendres y piojos adultos recolectados de una momia de Maitas Chiribaya altamente infestada (**Fig. 1**), encontrada en la región andina del desierto de Atacama (Arriaza et al., 2012). También se ha informado de piojos y liendres bien conservados recolectados en un cuero cabelludo peruano, que data de la época precolombina (**Fig. 2a**) (Dutra et al., 2014).

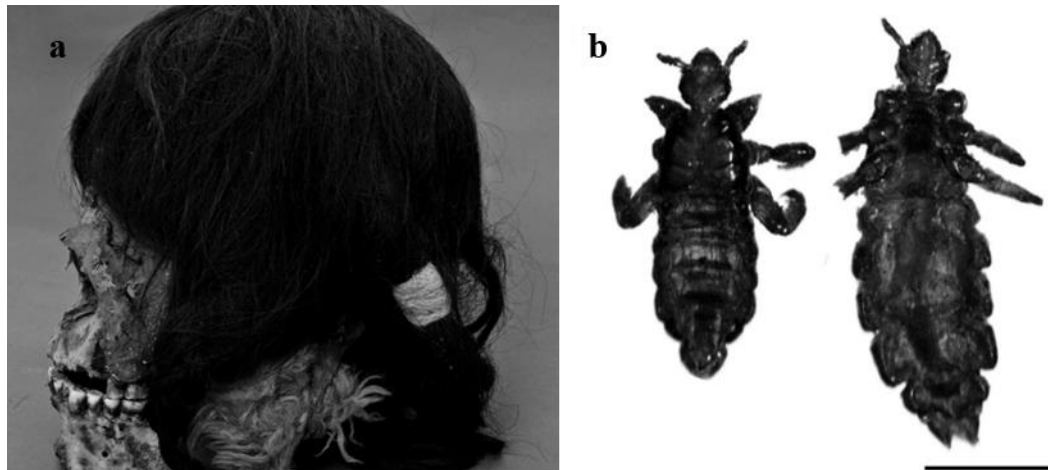


Fig. 1. Especímenes de piojos arqueológicos. (a) Momia de Arica Maitas Chiribaya infestada con piojos de la cabeza. (b) Piojos momificados macho y hembra. Barra de escala 1,000 μm . Tomado de Arriaza et al. (2012).

Otros sitios informados donde se han encontrado especímenes de piojos arqueológicos son el suroeste de EEUU, las islas Aleutianas, Groenlandia, México y en momias de sacrificios incas (Araújo et al., 2000). Sin embargo, el registro más antiguo data de hace más de 10.000 años, con un huevo de piojo humano adherido al cabello (**Fig. 2b**), encontrado en un sitio arqueológico en el noreste de Brasil (Fu et al., 2022; Araújo et al., 2000). Este hallazgo proporciona una nueva visión de la historia coevolutiva de humanos y parásitos (Araújo et al., 2000).

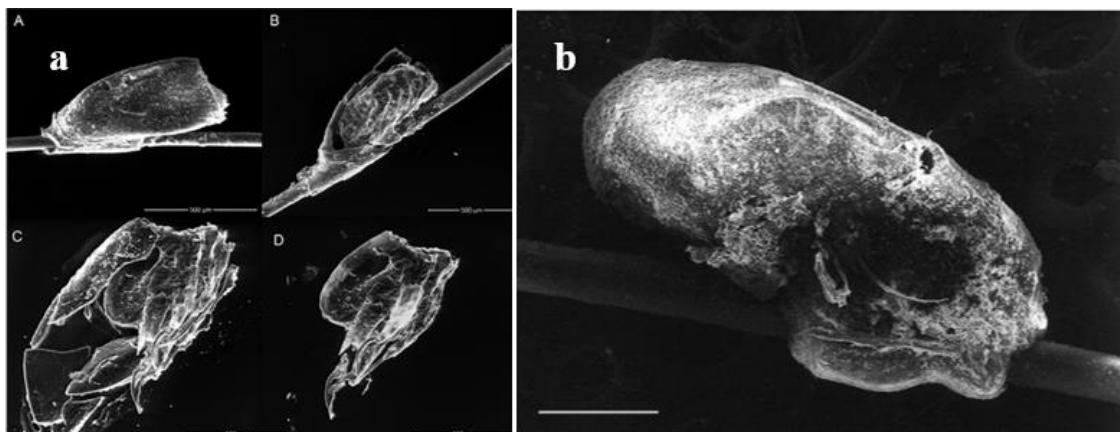


Fig. 2. Huevos/liendres hallados en sitios arqueológicos. (a) Microscopía de barrido de bajo vacío de huevos/liendres adheridos a un cabello, mostrando una larva en eclosión. Barra de escala 500 μm . (b) Huevo de piojo de 10. 000 años adherido a un mechón de cabello humano. Barra de escala 0,26 mm. Modificado de Dutra et al. (2014) y Araújo et al. (2000).

En el siglo XXI, la infestación de piojos humanos sigue estando muy extendida en todo el mundo (Amanzougaghene et al., 2020). Nuevos descubrimientos de la biología,

epidemiología, historia evolutiva de los piojos, sus agentes patógenos bacterianos y las estrategias de control han estimulado aún más la renovación del interés en este insecto hematófago (Amanzougaghene et al., 2020).

1.2. Sistemática de Phthiraptera

Los piojos (Insecta: Phthiraptera) son ectoparásitos obligados de aves y mamíferos (Light et al., 2010). El término Phthiraptera viene del griego (phteir = piojo, ápteros = sin alas) y su diversidad incluye alrededor de 5.000 especies descritas (Beutel et al., 2014).

Se cree que los parientes más cercanos de los piojos son los piojos del grupo más basal, el orden Psocoptera (Yoshizawa & Johnson, 2006; Grimaldi & Engel, 2005). Los psocópteros son insectos de vida libre, pero hay muchos registros de varias especies de psocópteros en el plumaje de las aves y el pelaje de los mamíferos, así como en sus nidos (Yoshizawa & Johnson, 2006). De acuerdo con la lista taxonómica mayormente aceptada para los piojos chupadores (Durdén, 1994), la clasificación de *Pediculus* se indica en la **Tabla 1**.

Phylum: Arthropoda
Subplylum: Hexapoda
Clase: Insecta
Subclase: Pterigota
Orden: Phthiraptera
Suborden: Anoplura
Familia: Pediculidae Leach, 1817
Género: <i>Pediculus</i> Linnaeus, 1758
Especie: <i>Pediculus humanus</i> Linnaeus, 1758
<i>Pediculus humanus capitis</i> De Geer, 1778

Tabla 1. Sistemática del género *Pediculus*. Adaptado de Durdén (1994).

El orden de Phthiraptera incluye cuatro subórdenes (**Tabla 2**), divididos en dos grupos principales, los piojos masticadores y los piojos chupadores. Los piojos masticadores comprenden tres subórdenes: i) Amblycera con aproximadamente 1360 especies y 5 superfamilias; ii) Ischnocera con aproximadamente 3080 especies y 5 superfamilias y iii) Rhynchophthirina con 3 especies y una familia. Los piojos chupadores comprenden el suborden Anoplura con aproximadamente 540 especies y 5 superfamilias (Beutel et al., 2014; Veracx & Raoult, 2012).

Orden Phthiraptera		Hospedadores
Subórdenes:		
<input type="checkbox"/> Amblycera	} Piojos masticadores	Aves y mamíferos
<input type="checkbox"/> Ischnocera		
<input type="checkbox"/> Rhynchophthirina		
<input type="checkbox"/> Anoplura	} Piojos chupadores	Solo mamíferos euterios
▪ Hamophthiriidae		
▪ Neolinognathidae		
▪ Hoplopleuridae		
▪ Enderleinellidae		
▪ Polyplacidae		
▪ Linognathidae		
▪ Ratemiidae		
▪ Microthoraciidae		
▪ Echinophthiriidae		
▪ Hybophthiridae		
▪ Haematopinidae		
▪ Pecaroecidae		
▪ Pedicinidae		
<input type="checkbox"/> Pthiridae		
<input type="checkbox"/> Pediculidae		

Tabla 2. Clasificación de Phthiraptera. Lista de los principales subórdenes y familias de piojos masticadores y chupadores. Modificado de Veracx & Raoult (2012).

Los piojos masticadores parasitan aves y mamíferos (Light et al., 2010). Por otra parte, los piojos chupadores parasitan solo a los mamíferos euterios y están morfológicamente adaptados para la vida en sus hospedadores (Light et al., 2010). Las especies de Amblycera e Ischnocera suelen ser carroñeros que se alimentan de partículas de piel o plumas, secreciones, pequeñas cantidades de sangre o huevos o ninfas de anoplurianos (**Fig. 3**) (Beutel et al., 2014).

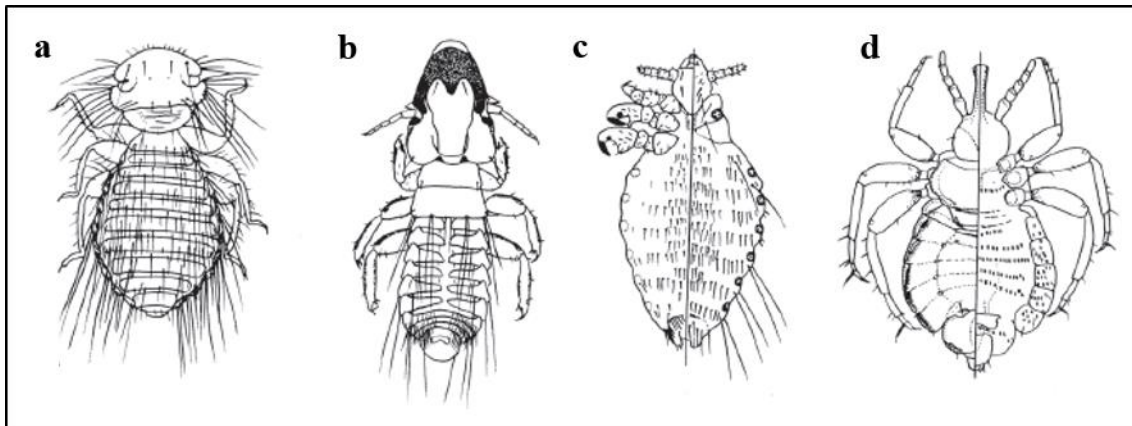


Fig. 3. Subgrupos de Phthiraptera. **(a)** Amblycera. **(b)** Ischnocera. **(c)** Anoplura. **(d)** Rhynchophthirina. **(a y b)** Presentes en mamíferos y aves. **(c y d)** Presentes en mamíferos, vista dorsal y ventral combinadas). Tomado de Beutel et al. (2014).

Dentro de Phthiraptera, los estudios filogenéticos han demostrado que los piojos chupadores son monofiléticos (Light et al., 2010). Todas las especies de Rhynchophthirina y Anoplura están especializadas en chupar sangre con piezas bucales fuertemente modificadas (Beutel et al., 2014). En los anoplurianos, el labrum se evierte y a través de los estiletos labiales e hipofaríngeos perforan los vasos sanguíneos, la saliva es bombeada hacia la perforación por medio del canal salival hipofaríngeo y la sangre es succionada hacia el tracto digestivo (Beutel et al., 2014).

Las especies de Rhynchophthirina tienen piezas bucales para masticar modificadas, unidas al extremo de una probóscide larga que utilizan para atravesar la piel, provocando la formación de depósitos de sangre de la cual se alimentan usando sus piezas bucales (Light et al., 2010). Por lo tanto, es probable que los piojos chupadores hayan evolucionado a partir de un antepasado tipo Rhynchophthirina que se alimentaba de sangre con piezas bucales anopluranas altamente modificadas derivadas de las piezas bucales masticadoras ancestrales que se encuentran en todos los demás piojos (Light et al., 2010).

1.3. Aspectos sanitarios

Los piojos humanos son insectos hemimetábolos hematófagos obligados (Adjemian et al., 2022; Durden, 1994) que comprenden dos familias, Pediculidae y Pthiridae (**Fig. 4**)

con solo un género de cada una *Pediculus* y *Pthirus* respectivamente (Araújo et al., 2000; Amanzougaghene et al., 2020).

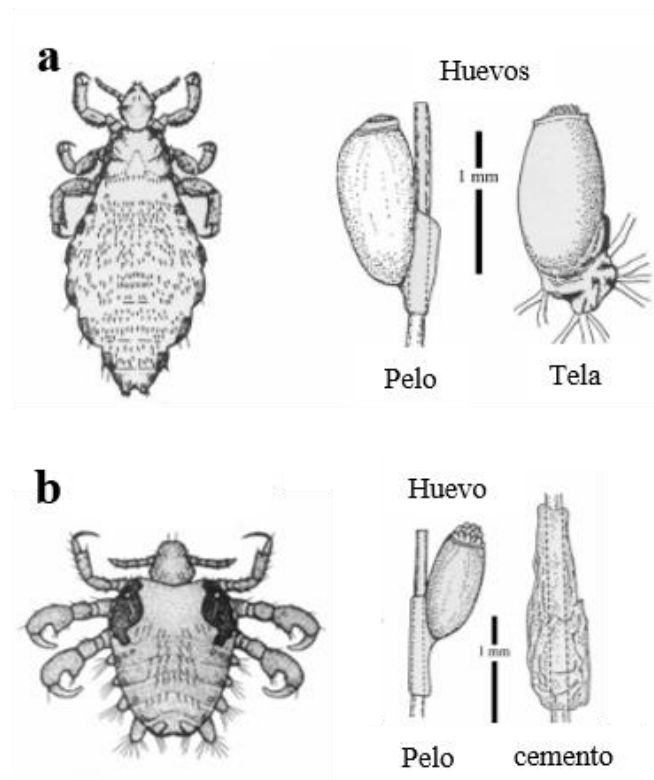


Fig. 4. Vista dorsal de los piojos humanos. **(a)** Adulto de *Pediculus humanus*, se muestran huevos adheridos al sustrato, según la especie que corresponda. **(b)** *Pthirus pubis* o piojo púbico. Modificado de Durden (2002).

La especie *Pediculus humanus* incluye dos ecotipos que infestan exclusivamente a humanos (Dutra et al., 2014; Núñez et al., 2017; Tovar-Corona et al., 2015): el piojo de la cabeza *Pediculus humanus capitis* descrito por De Geer en 1778 y el piojo del cuerpo *Pediculus humanus humanus* descrito por Linnaeus en 1758. Ambos ecotipos de piojos son ecológicamente diferentes, pero morfológica y biológicamente semejantes (Amanzougaghene et al., 2020; 2019; Veracx & Raoult, 2012). Sin embargo, la superposición morfológica que existe entre ellos hace difícil identificar individualmente los especímenes sin datos relacionados con su ubicación en el hospedador (Durden, 2002).

El piojo de la cabeza causa la pediculosis capitis (Galassi et al., 2018), dicho piojo vive y se reproduce en la cabeza humana (Amanzougaghene et al., 2020), accediendo a los nutrientes directamente por las vénulas del cuero cabelludo (Núñez et al., 2017).

Pediculus humanus capitis vive y pone sus huevos en el cuero cabelludo, infestando preferentemente a escolares de todo el mundo independientemente de la clase social o nivel de higiene, a diferencia de *P. h. humanus*, que vive y se multiplica en la ropa en personas que viven en condiciones precarias y condiciones antihigiénicas principalmente hacinadas (Louni et al., 2018). *Phthirus pubis* es el piojo púbico causante de la pediculosis pubis o phthiriasis pubis. La transmisión puede ser por contacto sexual, contacto corporal cercano o, menos frecuentemente, por medio de fómites (Kireççi, 2021). Ocasionalmente, *Phthirus pubis* también puede infestar las pestañas de los ojos causando phthiriasis palpebrarum (Wu et al., 2017).

Los piojos de la cabeza (*P. h. capitis*) causan problemas de Salud Pública, económicos y sociales en todo el mundo, mientras que los piojos del cuerpo humano (*P. h. humanus*) representan un grave problema de Salud Pública (Kim et al., 2021). Actualmente se acepta que *P. h. humanus* es vector de enfermedades infecciosas mortales, como el Tifus epidémico, la fiebre de las trincheras o la fiebre recurrente (Phadungsaksawasdi et al., 2021; Amanzougaghene et al., 2020). Sin embargo, el potencial de *P. h. capitis* como vector ha tenido un reconocimiento creciente, destacando los informes de detección de microorganismos, patógenos y no patógenos, como *Bartonella quintana*, *Borrelia recurrentis* y *Acinetobacter* spp. (Phadungsaksawasdi et al., 2021; Amanzougaghene et al., 2020), estas recientes descripciones cambian el paradigma de que únicamente los piojos del cuerpo son vectores de enfermedades (Amanzougaghene et al., 2020; Louni et al., 2018).

La transmisión de los piojos de la cabeza y el cuerpo se produce a través del contacto cercano de una persona no infectada con una persona infectada, como cabeza-cabeza o por compartir sombreros, fundas de almohadas o ropa (Bohl et al., 2015; Fu et al., 2022). Es frecuente en población pediátrica la infección persistente con piojos de la cabeza que a menudo se asocia con una infección secundaria del cuero cabelludo, siendo una causa importante de impétigo en los países en desarrollo (Heukelbach & Feldmeier, 2004). Debido al prurito, las alteraciones del sueño y la dificultad de concentración subsiguientes, los niños infestados pueden tener un desempeño deficiente en la escuela (Heukelbach & Feldmeier, 2004).

Entre las ectoparasitosis hay una familia de enfermedades de importancia en la salud pública denominadas enfermedades epidérmicas parasitarias de la piel, dentro ellas se

encuentra la pediculosis de la cabeza, del cuerpo y de pubis (OPS, 2022). Este grupo de enfermedades cumplen los criterios definidos para las enfermedades desatendidas de las poblaciones desatendidas (Feldmeier & Heukelbach, 2009; Ehrenberg & Ault, 2005). En 2016, el consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), aprobó el plan de acción para la eliminación de las enfermedades infecciosas desatendidas y las medidas posteriores a la eliminación 2016-2022 (OPS, 2020). El plan de acción de esta iniciativa acordó incluir a la tungiasis (causada por *Tunga penetrans*), la escabiosis (causada por *Sarcoptes scabiei*) y la pediculosis (causada por *P. h. capitis*); además de la miasis (causada por *Dermatobia hominis* y *Cochliomyia hominivorax*, entre más de 30 especies de moscas), así como la larva migratoria cutánea causada por uncinarias (*Ancylostoma caninum*, *A. brasiliense* y *A. tubaeforme*) (OPS, 2020). Además se recomendó la puesta en marcha de una hoja de ruta compuesta por tres acciones principales, que son la identificación de focos: mapeo y vigilancia epidemiológica, intervenciones integradas, e investigación operativa y de aplicación (OPS, 2020).

1.4. Epidemiología

Los piojos de la cabeza infestan más de 100 millones de personas en todo el mundo (Coates et al., 2020). Tan solo en los Estados Unidos se infectan anualmente de 6 a 12 millones de personas (Coates et al., 2020). Los niños de entre 3 y 12 años suelen tener la mayor prevalencia, ya que es más probable que interactúen entre sí, especialmente en la escuela (Fu et al., 2022). La prevalencia global estimada en niños escolares es del 19 % (**Fig. 5**) (Fu et al., 2022; Hatam-Nahavandi et al., 2020), siendo las niñas las mayormente infestadas (19%) en comparación con los niños (7%) (Hatam-Nahavandi et al., 2020).

En América, la prevalencia más alta se encontró en América Central y del Sur (33%), ya que en ciertas áreas de países como Brasil, las reinfestaciones puede ocurrir de 15 a 19 veces al año (Bohl et al., 2015); a diferencia de Europa, donde se encontró la prevalencia más baja (5%) (Hatam-Nahavandi et al., 2020). En los países desarrollados, la prevalencia ha disminuido significativamente debido al tratamiento preventivo (véase apartado 1.8), sin embargo en los países en desarrollo y lugares donde los insecticidas no están fácilmente disponibles, la prevalencia probablemente se ha mantenido sin cambios (Fu et al., 2022). No obstante, es probable que la prevalencia general esté subestimada, ya que

la pediculosis capitis no es una enfermedad de notificación obligatoria (Woods et al., 2022).

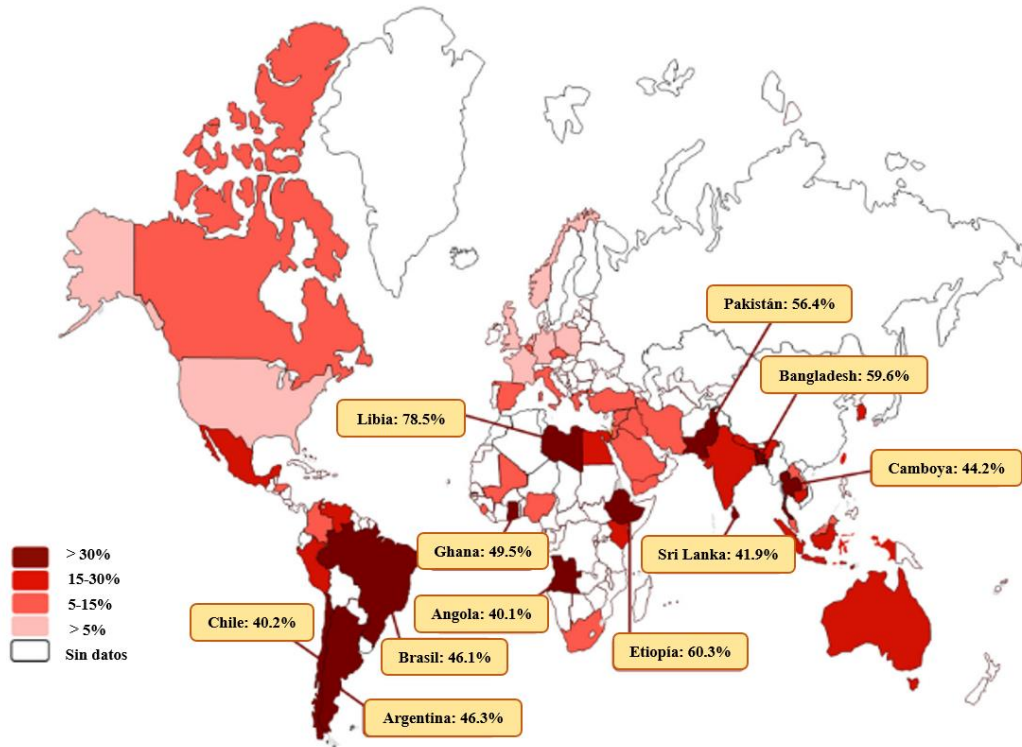


Fig. 5. Mapa de distribución de la pediculosis capitis a nivel mundial. Modificado de Hatam-Nahavandi et al. (2020).

1.5. Ciclo de vida y ecología de *Pediculus humanus capitis*

El ciclo biológico de *P. h. capitis* (**Fig. 6**), tiene una duración de aproximadamente 3-4 semanas (Linardi et al., 1987). El ciclo incluye: huevo, tres etapas ninfales y adultos (Laguna & Risau-Gusman, 2011). Las ninfas semejan a adultos en miniatura, con excepción de genitales definidos y otras estructuras asociadas a individuos adultos (Durden, 2002). Los piojos humanos requieren ingerir sangre regularmente para sobrevivir y completar su desarrollo (Fu et al., 2022). Para ello, no necesitan realizar una búsqueda activa del hospedador a larga distancia como la mayoría de los insectos hematófagos (Galassi et al., 2018).

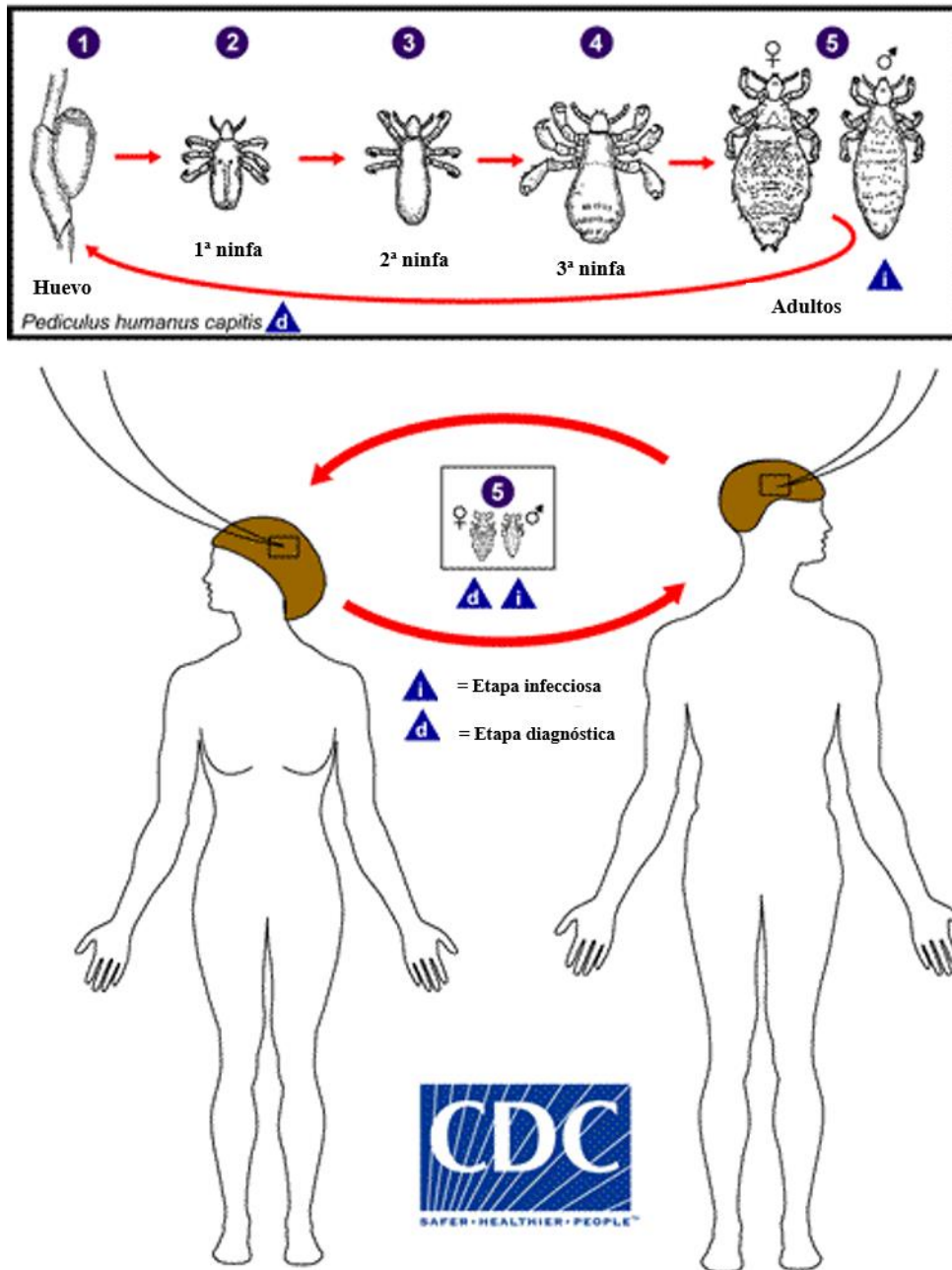


Fig. 6. Ciclo biológico del piojo de la cabeza. Modificado de CDC - DPDx (2017).

(1) El ciclo biológico inicia cuando los huevos son depositados por la hembra, cementándolos a la base del cabello, lo más cercano al cuero cabelludo (menos de 1 mm) para maximizar el desarrollo y la eclosión (Bohl et al., 2015; Fu et al., 2022). Los huevos miden de 0,8 mm por 0,3 mm. Son ovalados, generalmente de color amarillo a blanco (Laguna & Risau-Gusman, 2011). A menudo, son difíciles de ver y se confunden con caspa o gotas de aerosol. Los huevos tardan

aproximadamente una semana en eclosionar (rango de 6 a 9 días). Los huevos viables generalmente se encuentran dentro de los 6 mm del cuero cabelludo (CDC - DPDx, 2017).

- (2) El huevo eclosiona para liberar una ninfa de primera etapa (Linardi et al., 1987). Posteriormente, la cáscara del huevo se vuelve de un amarillo opaco más visible, permaneciendo adherida al tallo del cabello. La toma de sangre de las ninfas se facilita por compuestos químicos con propiedades anticoagulantes y vasodilatadoras presentes en su saliva (Fu et al., 2022).
- (3) Las ninfas maduran después de tres mudas consecutivas (Fu et al., 2022).
- (4) Posteriormente se convierten en adultos, lo que lleva entre 9 y 12 días (Fu et al., 2022; CDC - DPDx, 2017).
- (5) Los piojos adultos son de color canela a blanco grisáceo. Las hembras suelen ser más grandes que los machos (Bohl et al., 2015). Los piojos adultos pueden vivir hasta 30 días en la cabeza de una persona, para ello necesitan alimentarse constantemente. Fuera del hospedador el piojo muere entre 1 y 2 días (Fu et al., 2022; CDC - DPDx, 2017). Información más detallada se muestra en las secciones **1.9** y **1.10**.

1.6. Manifestaciones clínicas

La mayoría de las infestaciones de piojos de la cabeza son asintomáticas, pero cuando existen síntomas, pueden incluir una sensación de cosquilleo en la cabeza y prurito causado por la reacción alérgica a la saliva de los piojos (CDC - DPDx, 2017). Tanto la saliva como la materia fecal de los piojos pueden provocar reacción inflamatoria del cuero cabelludo (Eisenhower & Farrington, 2012). Puede existir irritabilidad y dificultad para dormir debido a que los piojos están más activos durante la noche (Bohl et al., 2015). Además del prurito, se puede producir urticaria papular, excoriaciones y linfadenopatía cervical/occipital (Coates et al., 2020). El prurito normalmente se intensifica de 3 a 4 semanas después de la infestación inicial, pero en pacientes con infestaciones repetidas el prurito aparecerá dentro de 1 a 2 días después de la exposición al parásito (Bohl et al., 2015). Sin embargo, el prurito puede continuar durante semanas después del tratamiento (Eisenhower & Farrington, 2012). En infestaciones prolongadas, la piel se puede volver liquenificada e hiperpigmentada (Bohl et al., 2015). Una infección bacteriana secundaria puede ser una complicación (CDC - DPDx, 2017).

1.7. Diagnóstico

La infestación por piojos generalmente se diagnostica mediante la detección visual de las etapas ninfales o adultas (Durdén, 2002). Se puede considerar que un individuo está infestado si se encuentran piojos vivos en la inspección del cuero cabelludo (Bohl et al., 2015). Las hembras suelen depositar sus huevos en cabellos individuales en el área de la nuca o detrás de las orejas, sin embargo, en infestaciones intensas los huevos pueden depositarse en cualquier región del cuero cabelludo (Durdén, 2002), o incluso poner más de un huevo por cabello (O'Donel Alexander, 1984). Los huevos ubicados a menos de los 6 cm del cuero cabelludo deben llamar la atención (Fu et al., 2022). Su presencia dentro de esta proximidad debe aumentar el índice de sospecha del investigador y alentar una búsqueda minuciosa de piojos vivos (Bohl et al., 2015).

Cabe destacar que los huevos eclosionados pueden permanecer adheridos al cabello (Bohl et al., 2015). La presencia de estos huevos o cáscaras de huevos a menudo se usa erróneamente para el diagnóstico, aunque no necesariamente indican una infestación activa (Fu et al., 2022; Bohl et al., 2015). Algunos autores sugieren que el término "liendre" debe utilizarse solo para referirse a la cáscara de huevo vacía (Mumcuoglu et al., 2021).

La duración de una infestación se puede estimar midiendo la distancia entre los huevos y la base del cabello y extrapolando la cantidad de tiempo que tarda el cabello en crecer esa distancia (Durdén, 2002). Los huevos tardan entre 6 y 10 días en eclosionar y el cabello crece 0,4 mm por día (Fu et al., 2022), por lo tanto los huevos se alejan gradualmente del cuero cabelludo, a medida que el cabello crece (Linardi et al., 1987). Los huevos viables se observan camuflados con el pigmento del cabello (Devore & Schutze, 2015). Inicialmente son translúcidos y están adheridos pero después de la eclosión, los huevos vacíos se vuelven blancos y más visibles (Roberts, 2002).

La comprobación de la infestación por piojos debe realizarse mediante inspección visual directa con la ayuda de un peine de dientes finos (Fu et al., 2022). Un peine para piojos o liendres mejora dramáticamente el proceso de diagnóstico al 'filtrar' efectivamente los piojos y los huevos (Mumcuoglu et al., 2021).

1.8. Tratamiento y prevención

Las opciones de tratamiento para la enfermedad parasitaria se centran principalmente en agentes tópicos y dispositivos mecánicos (Phadungsaksawasdi et al., 2021). Actualmente, hay disponibles diferentes tratamientos para los piojos de la cabeza basados en diversos mecanismos de acción (Martínez de Murguía Fernández et al., 2021). Sin embargo, el uso de muchos pediculicidas está limitado por razones de seguridad en grupos de edad más jóvenes (Eisenhower & Farrington, 2012). Los pediculicidas de venta libre tienen acción neurotóxica y actúan inhibiendo el transporte neuronal de sodio, lo que provoca parálisis respiratoria en larvas y piojos adultos (Woods et al., 2022). Los insecticidas neurotóxicos tópicos tradicionales están bajo revisión; algunos ingredientes activos se han prohibido debido a problemas de seguridad, mientras que otros han perdido eficacia a causa de la creciente resistencia (Martínez de Murguía Fernández et al., 2021). Se recomienda el tratamiento simultáneo para todos los miembros del hogar y contactos cercanos con evidencia de infestación activa (CDC, 2020). Algunos expertos creen que el tratamiento profiláctico es prudente para las personas que comparten la misma cama con personas infestadas activamente (CDC, 2020).

En EEUU, los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) recomiendan como tratamiento de primera línea a la permetrina y las piretrinas sinérgicas (piretrinas/butóxido de piperonilo) que son de venta sin receta (CDC, 2020; Eisenhower & Farrington, 2012). La ivermectina oral se puede utilizar para el tratamiento de los piojos de la cabeza, especialmente en personas con infestaciones recurrentes (Fu et al., 2022; Phadungsaksawasdi et al., 2021). Otros tratamientos aprobados por los CDC y la FDA, pero que requieren receta, incluyen loción de alcohol bencílico al 5 %, loción de ivermectina al 0,5 %, loción de malatión al 0,5 %, suspensión tópica de spinosad al 0,9 %, y champú de lindano al 1 % (tratamiento de segunda línea) (CDC, 2020). Sin embargo, los riesgos del tratamiento con el malatión y el lindano a menudo superan los beneficios potenciales (Fu et al., 2022; Eisenhower & Farrington, 2012).

El fracaso del tratamiento puede atribuirse a la resistencia de los piojos o al uso incorrecto del producto, por ejemplo; tiempo de exposición demasiado corto, dosis insuficiente o la aplicación de la solución sobre el cabello mojado (Fu et al., 2022). Además, considerando

la baja eficacia ovicida de muchos compuestos, generalmente se recomienda una segunda aplicación tópica después de 7 a 10 días (Sonnberg et al., 2014), con la finalidad de matar a las ninfas recién nacidas (Fu et al., 2022). Los datos sobre la actividad ovicida de los pediculicidas son fundamentales para determinar la eficacia de los productos comerciales y definir los esquemas de aplicación (Sonnberg et al., 2014).

Debido al aumento de la resistencia a los tratamientos de primera línea, el abametapir se ha considerado una opción de tratamiento segura y eficaz para la infestación de piojos (Woods et al., 2022; Eisenhower & Farrington, 2012). Los aceites esenciales también se han utilizado para controlar los piojos de la cabeza (Fu et al., 2022). Pero al igual que con los agentes más antiguos, se debe enfatizar en la aplicación adecuada para garantizar que el tratamiento sea efectivo (Eisenhower & Farrington, 2012). Además, se deben tomar medidas no farmacológicas para evitar la reinfestación en el paciente y para prevenir la propagación de piojos a contactos personales cercanos (Eisenhower & Farrington, 2012). Por ejemplo, lavar a 50 °C o más, todos los paños y ropa de cama utilizados por una persona infestada o secarlos en secadora (Fu et al., 2022). En la escuela, es necesaria la separación de artículos personales como gorros y bufandas. Los padres y las enfermeras escolares también deben revisar regularmente a los niños para ver si tienen piojos (Fu et al., 2022).

El uso peines de dientes finos es una herramienta relevante para el diagnóstico, así como para mitigar una infestación eliminando piojos y huevos (Mumcuoglu et al., 2021). Parece que el éxito del peinado depende de la elección del peine (Hill et al., 2005). Un peine con dientes espaciados entre 0,20 y 0,30 mm es particularmente eficaz para ayudar en el diagnóstico inicial de una infestación de piojos y para verificar el éxito con un tratamiento pediculicida (Mumcuoglu et al., 2021; Roberts, 2012). No obstante, un peine con dientes espaciados entre 0,09 y 0,19 mm ejerce la tracción necesaria para eliminar los huevos y las liendres (Mumcuoglu et al., 2021). La preparación del cabello con abundante acondicionador antes del peinado, hace que peinar el cabello y eliminar los piojos/huevos sea más fácil que peinarlo en seco (Hill et al., 2005; Mumcuoglu et al., 2021). Además, la humedad ralentiza el movimiento de los piojos (Fu et al., 2022). El peinado debe centrarse en sitios como las sienes, detrás de las orejas y el cuello comenzando desde la raíz y peinando hasta la punta (Fu et al., 2002; Bohl et al., 2015). El peinado sistemático con peine de dientes finos se ha recomendado para desprender los huevos del cabello

(Durden, 2002). En este contexto, se ha sugerido que el peinado sistemático durante un período de 10 días, (tiempo en que el embrión completa su desarrollo dentro del huevo) puede ayudar a remediar una infestación (Mumcuoglu et al., 2021). Sin embargo, los pediculicidas siguen siendo el pilar en el tratamiento de los piojos, ya que únicamente la eliminación física mediante peinado húmedo no es lo óptimo para la total eliminación (Heukelbach & Feldmeier, 2004).

1.9. Morfología y biología de *Pediculus humanus*

Son insectos sin alas, más largos que ancho, con cabeza relativamente pequeña y estrecha (Mehlhorn, 2016). Las antenas tienen cinco segmentos y los ojos están fuertemente reducidos a dos grandes omatidios (Mehlhorn, 2016). Las piezas bucales están modificadas para perforar y succionar, ellas se invaginan en la cabeza (O'Donel Alexander, 1984). El haustelo está armado con dientes que se evierten cuando éste se extiende (O'Donel Alexander, 1984). El labrum envuelve los cuatro estiletes largos y delgados formados por los dos maxilares, el labio y la hipofaringe, este último contiene el canal salival. La sangre se ingiere a través del tubo formado por los maxilares (Mehlhorn, 2016). Su cuerpo queratinizado y aplanado dorsoventralmente les permite moverse fácilmente entre los pelos del hospedador (Núñez et al., 2017; Lehane, 2005; O'Donel Alexander, 1984). Poseen nueve segmentos abdominales (los dos primeros son rudimentarios) y seis espiráculos abdominales (O'Donel Alexander, 1984). Los segmentos torácicos están fusionados y las patas cortas tienen fuertes garras se adaptan de manera óptima al diámetro de los pelos del hospedador o a las fibras (Mehlhorn, 2016; Durden, 2002; O'Donel Alexander, 1984).

En condiciones naturales, la alimentación es frecuente e intermitente siendo de cuatro o cinco veces al día, comenzando desde el momento en que la primera ninfa emerge del huevo (O'Donel Alexander, 1984). Muchos piojos inclinan su cuerpo casi verticalmente hacia la superficie de la piel, esto parece atribuible al agarre de los dientes haustelares. Posteriormente utilizan las piezas bucales perforantes (Nuttall, 1917). Cuando encuentran y traspasan un vaso sanguíneo, el anticoagulante salival del piojo permite que la sangre fluya mientras es succionada hacia la faringe por la acción de la bomba cibarial. La acción de la bomba, evita el flujo inverso y el resultado es un llenado y vaciado rítmico en el intestino del insecto (O'Donel Alexander, 1984; Peacock, 1918; Nuttall, 1917).

Una hembra de *P. h. capitis* puede poner de 8 a 10 huevos diarios (Bohl et al., 2015), o entre 50 y 150 huevos durante su vida fértil que es de unos 16 días (Fu et al., 2022). La oviposición puede variar principalmente por la regularidad de la alimentación y la temperatura ambiental (O'Donel Alexander, 1984). Durante la oviposición, las hembras secretan un pegamento líquido que ponen primero en el tallo del cabello y lo esparcen usando los gonópodos para formar sitios de oviposición adecuados, posteriormente colocan el huevo (Kim et al., 2021). El espacio entre los gonópodos tiene el diámetro aproximado de un cabello pero es ajustable, sin estos órganos, no podrían sujetar el cabello y poner huevos en la alineación adecuada (Nuttall, 1917; O'Donel Alexander, 1984). El pegamento líquido es secretado por un par de glándulas accesorias conectadas al útero, en el que se han identificado dos proteínas adhesivas homólogas, denominadas proteína de la vaina de liendre del piojo LNSP 1 y LNSP 2 (del inglés, louse nit sheath protein) (Kim et al., 2021).

La oviposición tiene lugar generalmente en lugares con temperatura y humedad óptimas. Por ejemplo, los huevos de los piojos de la cabeza se encuentran en el cuero cabelludo, particularmente alrededor y detrás de las orejas (Fu et al., 2022). Los piojos son sensibles a la temperatura y la humedad, como se ha observado en los piojos del cuerpo que sobreviven mejor en un 79–90% de humedad y entre 29 y 32 °C, pero mueren rápidamente en un ambiente con humedad < 40% o temperatura > 50 °C (Fu et al., 2022).

1.10. Diferenciación morfológica entre machos y hembras de *Pediculus humanus*

Los piojos adultos son insectos de aproximadamente 2–4 mm de largo (Mehlhorn, 2016; O'Donel Alexander, 1984) con diferencias esenciales en la anatomía de los sexos (**Fig. 7**) (Nuttall, 1917). Los machos y las hembras se pueden distinguir por el tamaño del cuerpo, las garras, patrones en el tórax y la forma del abdomen (Mehlhorn, 2016). Tanto en los piojos del cuerpo como de la cabeza los machos son más pequeños que las hembras en una proporción de 5: 6 aproximadamente (O'Donel Alexander, 1984).

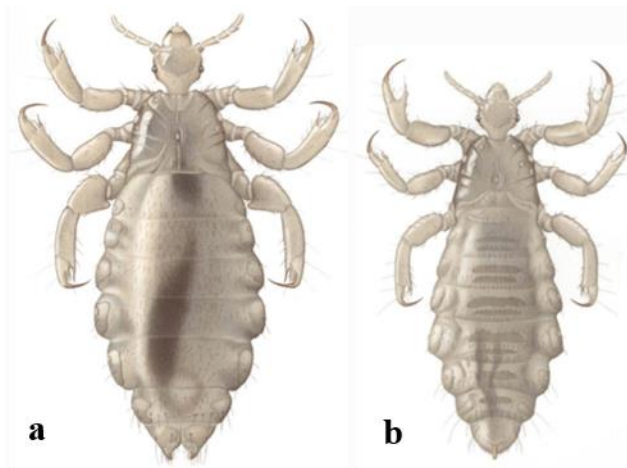


Fig. 7. Aspecto dorsal de ejemplares de *Pediculus humanus*. **(a)** Hembra. **(b)** Macho. Modificado de Keilin & Nutall (1930).

En el macho el abdomen es delgado, claramente segmentado y redondeado posteriormente. La superficie ventral se curva dorsalmente hacia arriba en la punta para que los orificios anal y sexual estén en la superficie superior (O'Donel Alexander, 1984; Nutall, 1917). Aunque ambos sexos muestran grados variables de pigmentación, el macho suele mostrar la coloración más profunda. En machos bien pigmentados, los tergitos abdominales aparecen como pares de bandas transversales oscuras, en la hembra la estructura tegumentaria difiere en esta región. En el macho, los pelos abdominales están dispuestos con bastante regularidad en filas correspondientes a los segmentos del cuerpo, mientras que en la hembra, la mayoría de los pelos están esparcidos de manera irregular excepto en los últimos segmentos (Nutall, 1917).

El ano es un orificio diminuto con una pequeña placa quitinosa situada ventralmente superpuesta por un pliegue tegumentario dorsal. Inmediatamente detrás de la placa anal se encuentra la abertura sexual de la que el dilatador puede o no sobresalir (**Fig. 8a**). Basalmente se observa la placa basal (interna) sobre la que se articula el dilatador (Nutall, 1917). La morfología de los genitales masculinos en los piojos se ha investigado previamente (Retana-Salazar & Rodríguez-Arrieta, 2016; Yoshizawa & Johnson, 2006; Nutall, 1917). Sin embargo, la homología de la estructura genital es sumamente difícil de establecer, incluso entre taxones relacionados de forma lejana, lo que restringe el uso de estos caracteres para el estudio filogenético de nivel superior (Yoshizawa & Johnson, 2006).

La forma de la garra dentro de una población de piojos tiene una importancia epidemiológica considerable (Ibarra, 1993). En el macho se observa una diferencia sexual muy marcada en la estructura del primer par de patas, donde se distingue un “pulgar” tibial y una garra tarsal más grande siendo estas más anchas, grandes y poderosas que las demás (**Fig. 8b**) (Ibarra, 1993; Nutall, 1917). En las etapas inmaduras, el primer par de patas no difiere estructuralmente de los otros dos pares (Nutall, 1917).

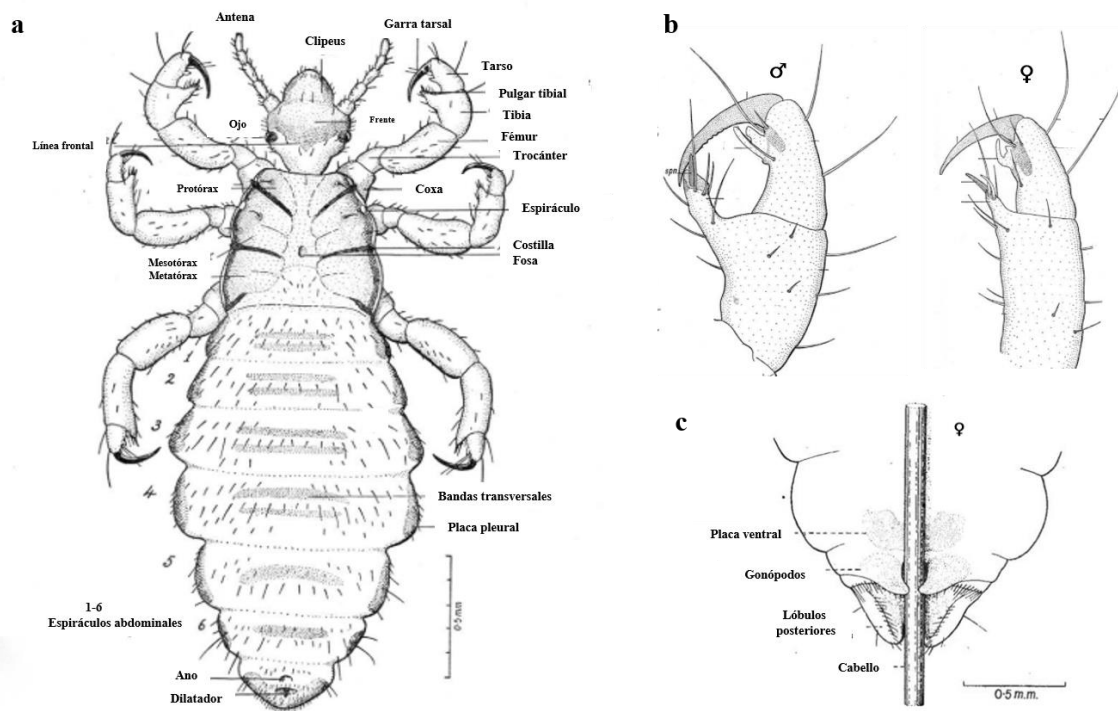


Fig. 8. Principales diferencias morfológicas externas entre el macho y la hembra de *Pediculus humanus*. (a) Aspecto dorsal del macho. (b) Parte terminal de la primera pata izquierda del macho y de la hembra; en el macho se observa la región tibio-tarsal y la garra tarsal muy desarrolladas en comparación con la hembra. (c) Parte ventral posterior del abdomen de la hembra, ilustrando la función de los gonópodos al sujetar el cabello para poner los huevos. Adaptado de Nuttall (1917) y Keilin & Nutall (1930).

En la hembra, el abdomen es más ancho que el del macho y termina en dos grandes lóbulos con gonópodos y un escudo central (O’Donel Alexander, 1984; Nutall, 1917). Ventralmente la abertura vaginal está protegida por dos gonópodos que están bordeados de pelos y conectados en la línea media por un pliegue del tegumento que rodea un espacio circular (**Fig. 8c**). Anterior a los gonópodos, que son más o menos pigmentados, un área

oscura quitinizada y engrosada marca la región ocupada debajo por la bolsa vaginal (Nutall, 1917).

En los últimos años, el conocimiento sobre los piojos ha evolucionado con la secuenciación del genoma de los piojos del cuerpo y el desarrollo de transcriptomas de piojos del cuerpo y de la cabeza (Amanzougaghene et al., 2020). Sin embargo, algunos aspectos de la morfología y biología funcional del piojo de la cabeza aún no se comprenden completamente y por lo tanto se requiere de más trabajos de investigación que ayuden a comprender mejor estas particularidades.

1.11. Objetivos

Dada la necesidad elucidar aspectos importantes del desarrollo de *P. h. capitis* en condiciones naturales de infestación, los objetivos de la presente Tesis Doctoral se centran en ampliar los conocimientos sobre su morfología y la epidemiología.

Para alcanzar estas metas, se abordan los siguientes objetivos específicos:

- A. Elucidar y describir la morfología de las estructuras que forman la genitalia masculina de *P. h. capitis* tanto en reposo como en cópula, aplicando una combinación de microscopía estereoscópica, microscopía de barrido láser confocal y microscopía electrónica de barrido.
- B. Actualizar la morfología del desarrollo embrionario mediante microscopía confocal y proponer novedosos marcadores externos para diferenciar entre huevos tempranos, medios y tardíos como herramienta de estandarización de los ensayos toxicológicos para la búsqueda de fármacos ovicidas.
- C. Aportar evidencia del patrón ecdisial de *P. h. capitis* en diferentes etapas de desarrollo en función de sus exoesqueletos, usando microscopía estereoscópica, microscopía de barrido láser confocal y microscopía electrónica de barrido.
- D. Determinar la prevalencia y los factores de riesgo asociados con la pediculosis capitis en estudiantes de una escuela pública en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, México.

CAPÍTULO II. MATERIAL Y MÉTODOS

2. Material y métodos

2.1. Población de estudio

Este trabajo se realizó de junio a diciembre de 2019 en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, México. La escuela primaria se eligió intencionadamente por su ubicación estratégica, al captar estudiantes de la zona urbana y periurbana de la ciudad. En este estudio se ofertó participar a todos los estudiantes matriculados en el turno matutino ($N = 656$), de la escuela primaria. Del total de la matrícula se excluyeron 193 (29,42 %) estudiantes por no tener disposición de participar, no presentar el consentimiento autorizado o por no haber asistido a clases.

La población de estudio fue de 463 (70,58 %) estudiantes con edades de 7 a 14 años y que presentaron el consentimiento firmado por sus padres o tutores. Los padres/tutores recibieron un cuestionario diseñado para obtener información sociodemográfica, socioeconómica y hábitos de higiene individual.

Este estudio se consideró anónimo, ya que no permitió identificar directa o indirectamente a los participantes individualmente.

2.2. Diagnóstico de infestación

De la población de estudio ($N = 463$), una subpoblación ($n = 87$) conformada por 76 niñas y 11 niños que tenían antecedentes de haber presentado pediculosis capitis, accedieron a participar en el diagnóstico de infestación y toma de muestra. Se excluyeron los participantes que padecieran alguna enfermedad dermatológica crónica o hubiesen usado pediculicidas o antibióticos en los últimos seis meses.

Para confirmar o descartar la infestación, se inspeccionó visualmente la cabeza de cada participante, principalmente detrás de las orejas y la nuca. El hallazgo de piojos adultos, estadios ninfales o huevos dentro de seis milímetros del cuero cabelludo, se consideró como infestación activa. De la subpoblación ($n = 87$), 50 niñas de 7 a 14 años fueron diagnosticadas con infestación activa, conformando así una sub-subpoblación para la toma de muestra. El diagnóstico de infestación y toma de muestra se realizaron de manera individual en el servicio médico de la escuela, con ayuda del personal médico y de servicio social adscrito a la misma institución.

2.2.1. Método de peinado para optimizar la obtención de muestras

Por conveniencia a esta investigación, el peinado se realizó en seco utilizando una manta blanca y dos tipos de peines de dientes finos metálicos: peines estándar con una distancia mínima entre dientes de 0,125 mm y peines de uso infantil con una distancia mínima entre dientes de 0,1 mm, además de una brocha pequeña (**Fig. 9**). La distancia entre los dientes fue verificada con ayuda de un ocular micrométrico calibrado a 4x (1 espacio = 25 μ m).

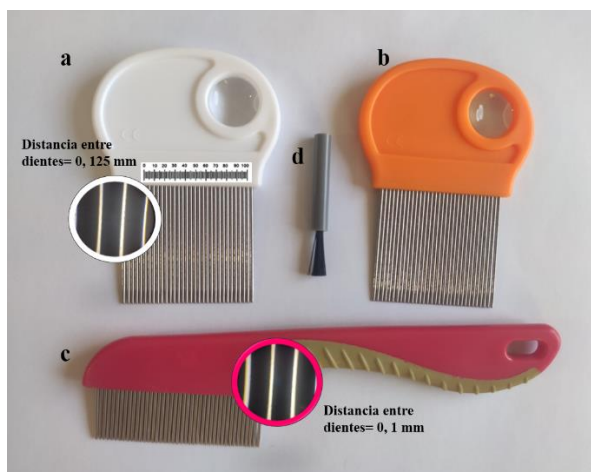


Fig. 9. Material para obtención de ejemplares de piojos. **(a, b)** Peine estándar con distancia mínima entre dientes de 0,125 mm. **(c)** Peine infantil con distancia mínima entre dientes de 0,1 mm. **(d)** Brocha de limpieza para retirar piojos y huevos atrapados en el peine.

El método para la obtención de las muestras consistió en peinar de manera sistemática cada cabeza, optimizando el tiempo y la recogida de ejemplares. En las niñas con cabellos medianos a largos (hasta 35 y 45 cm respectivamente), el cabello se dividió en cuatro secciones, numerándolas en sentido de las agujas del reloj, tomando como referencia la nuca. El cabello de cada sección se sujetó con una liga de goma. Posteriormente cada sección de cabello se enrolló formando un “chongo” (rodete o moño) (**Fig. 10a, b**).

El peinado inició soltando el cabello de la primera sección. Se peinó escrupulosamente de la raíz a las puntas, observando los dientes del peine en cada pasada (**Fig. 10c**). Cuando fue necesario, con ayuda de una brocha, se retiraron piojos adultos, ninfas o huevos atrapados entre los dientes del peine. Cuando se terminó de peinar la sección, el cabello se enrolló nuevamente. Para las secciones 2-4 se aplicó el mismo procedimiento que en la primera sección (**Fig. 10d, c**). En cabellos enredados, las secciones se peinaron de puntas a raíz para desenredar y posteriormente de raíz a puntas de manera habitual. Para

finalizar, se realizó un peinado general de la cabeza, con énfasis en la nuca y detrás de las orejas (**Fig. 10e, f**).



Fig. 10. Método sistemático de peinado para optimizar la obtención de muestras.

En los casos del cabello corto (25 cm), en los que no se logró sujetar los cabellos con ligas de goma, las secciones se trazaron de manera imaginaria y se peinó de igual manera que en el caso de cabellos medianos a largos. El método de peinado descrito en esta investigación tuvo una duración de entre 15 y 20 minutos por persona, dependiendo de la cantidad de cabello y su longitud, así como del grado de infestación. En infestaciones intensas con el cabello abundante y largo, el tiempo se prolongó más de 20 minutos.

2.3. Recolección y transporte de muestras

De cada participante se recolectaron tantos especímenes como fue posible. Todos los ejemplares se almacenaron de manera inmediata a su recolección, para evitar que ninfas o adultos migraran fuera de la manta ocasionando reinfestaciones. Los especímenes se

almacenaron en tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml con fijador Karnovsky (25 % paraformaldehído y 0,5 % glutaraldehído). Los tubos fueron etiquetados individualmente mediante códigos. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (entre 17° y 20° C). Para evitar derrames, los tubos se sellaron con parafilm y se colocaron en una gradilla con tapa hermética para su transporte y posterior identificación en el Laboratorio de Parasitología Sanitaria del Departamento de Parasitología de la Universidad de Valencia, España.

2.4. Material parasitológico

Se obtuvieron 2153 especímenes de *P. h. capitis*, incluyendo: hembras (N = 309), machos (N = 197), ninfas (N = 914), exoesqueletos (N = 11) y huevos (N = 722). A excepción de las hembras, que no fueron analizadas en este trabajo, todos los demás especímenes (N = 1844) fueron analizados por al menos una de tres técnicas microscópicas empleadas a saber: Microscopía Estereoscópica (SM), Microscopía de Barrido Láser Confocal (CLSM) y Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) (**Tabla 3**).

Para una mayor optimización de los ejemplares se aplicó la siguiente sistemática de trabajo. Así, en el caso de los machos (N = 197), primero se analizaron por SM, después se eligieron 10 ejemplares para analizarse por CLSM y posteriormente estos mismos 10 ejemplares se prepararon por secado a punto crítico para su análisis por SEM. De las ninfas (N = 914) analizadas por SM, se seleccionó un ejemplar para CLSM. Con los exoesqueletos (N = 11) se aplicó la misma sistemática de trabajo. A excepción de los huevos (N = 722) que se visualizaron solo por SM. Las muestras se prepararon según la metodología del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE).

Estadio	Microscopía Estereoscópica	Microscopía de Barrido Láser Confocal	Microscopía Electrónica de Barrido
Machos	197	10	10
Ninfas	914	1	
Exoesqueletos	11	1	2
Huevos	722		

Tabla 3. Número de especímenes utilizados en cada técnica microscópica.

2.5. Técnicas de microscopía

2.5.1. Microscopía Estereoscópica (SM)

Los especímenes se montaron individualmente en placas de Petri con fijador Karnovsky para evitar la deshidratación. Se utilizó un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ-U; Nikon Instruments, Tokio, Japón) (**Fig. 11a**), para visualizar los especímenes se utilizaron los objetivos 0.75X y 7.5X, con el foco y la iluminación ajustados para cada muestra. Se fotografiaron ejemplares completos de machos, ninfas, exoesqueletos y huevos de *P. h. capitis*. Además de las áreas de particular interés como la genitalia del macho, el contenido de los huevos y la abertura ecdisial entre otras zonas. Posteriormente todas las muestras se almacenaron en tubos Eppendorf con fijador Karnovsky nuevo, para su posterior preparación y visualización microscópica por otros métodos como se indicó en la **sección 2.4**.

2.5.2. Microscopía de Barrido Láser Confocal (CLSM)

Las muestras se montaron individualmente en placas de Petri con fijador de Karnovsky para evitar la deshidratación. Se utilizó un microscopio de barrido láser confocal Olympus FV1000-IX81 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) (**Fig. 11b**), con lente objetivo 10X2. Usando la autofluorescencia de las muestras, se escanearon las áreas de interés por espécimen. Se usaron las longitudes de onda correspondientes a los canales azul (excitación = 405 nm y emisión = 425–475 nm), verde (excitación = 488 nm y emisión = 500–545 nm) y rojo (excitación = 559 nm y emisión 557–675 nm). Se aplicaron el divisor de haz DM 405/488/559/635 y filtros entre los canales SDM490 y SDM560. La resolución del eje Z se fijó en pasos de 2 μm de espesor, cubriendo toda la muestra. Se utilizó el software FV viewer 4.2b para adquirir imágenes con una resolución de 1024 x 1024 píxeles. Las imágenes resultantes son una combinación de los tres canales (azul, verde y rojo). Se tomaron imágenes del área de interés y posteriormente los especímenes se almacenaron en tubos Eppendorf con fijador de Karnovsky nuevo, para su posterior visualización microscópica por otros métodos.



Fig. 11. Equipo de microscopía utilizado. (a) Microscopio estereoscópico Nikon SMZ-U. (b) Microscopio de barrido láser confocal Olympus FV1000-IX81 (tomado de SCSIE, 2022).

2.5.3. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Los especímenes se retiraron del fijador de Karnovsky y se lavaron en tampón fosfato durante 3 h a 22 ± 1 °C. Las muestras se posfijaron con Osmio al 2 %, se lavaron con agua destilada, luego se deshidrataron con etanol de concentración creciente (30, 50, 70, 90 y 100 %) y se secaron con CO₂ utilizando un secador de punto crítico Autosamdri-814 (Tousimis Research Corp., Rockville, MD), (**Fig. 12a**). Los especímenes se montaron sobre talones de aluminio utilizando cinta de carbón de doble cara. A continuación, las muestras se recubrieron con oro-paladio durante 4 minutos usando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica (Polaron SC7640; Quorum Technologies, Laughton, East Sussex, Reino Unido) (**Fig. 12b**). Para mejorar la conducción, a nueve especímenes se les añadió una película de partículas de plata ® (Agar Scientific OW52765459, Stansted, Essex, Reino Unido). Las muestras se examinaron con el microscopio electrónico de barrido Hitachi S4800 (Hitachi High-Technologies Corp., Tokio, Japón) (**Fig. 12c**), con un voltaje de aceleración de 10 kV y distancias de trabajo de 8,7 a 10,2 mm. Se adquirieron imágenes de 1280 x 960 píxeles de resolución. Se tomaron imágenes del espécimen completo y de las estructuras específicas.

2.5.3.1. Secado de punto crítico de muestras biológicas para SEM

Debido a que las muestras colocadas en el SEM se examinan al vacío, primero deben secarse completamente. El secado directo al aire puede resultar en una distorsión

considerable de la forma del espécimen debido a los efectos adversos de las fuerzas de tensión superficial. El secado de punto crítico (CPC), debido a su aplicabilidad a prácticamente todas las muestras, sigue siendo el método de referencia. El CPC se basa en el principio de que un líquido contenido en una cámara sellada se expandirá y evaporará simultáneamente cuando se someta a un aumento de temperatura. A medida que aumenta la energía cinética de las moléculas en la fase líquida, más de ellas pasan a la fase gaseosa, lo que da como resultado una disminución progresiva de la densidad del líquido y el consiguiente aumento de la densidad del gas. En cierta combinación de temperatura y presión, del punto crítico, las densidades de ambas fases son iguales y el límite entre ellas desaparece, reduciendo así la tensión superficial a cero (Bray, 2000).

El punto crítico del agua es tan alto (374 °C y 217,7 atmosferas) que las muestras biológicas serían destruidas en estas condiciones. Por lo tanto, es necesario reemplazar el agua con un disolvente de transición que tenga un punto crítico compatible con especímenes biológicos. Mantener un espécimen en el solvente de transición en su punto crítico, o por encima de él, mientras se expulsa gradualmente el solvente, da como resultado un espécimen seco que no ha sido sometido a los efectos nocivos de las fuerzas de tensión superficial. El disolvente de transición más utilizado es el CO₂ que tiene una temperatura y presión críticas razonables (31,1 °C y 72,9 atm). Dado que el agua y el CO₂ no son miscibles, se debe emplear un agente deshidratante que sea miscible con ambos. El etanol y la acetona son los dos agentes deshidratantes más utilizados. Después de la fijación, las muestras se deshidratan usando una serie graduada de cualquiera de los solventes (Bray, 2000).

La práctica común es fijar las muestras inicialmente con glutaraldehído o una combinación de glutaraldehído y formaldehído, seguido de una fijación posterior en tetraóxido de osmio (que a menudo se pasa por alto si la muestra se ha fijado durante el tiempo suficiente en los aldehídos) y luego a la serie de deshidratación (Bray, 2000).

En este trabajo todas las muestras fueron fijadas y conservadas en solución de Karnovsky y la deshidratación se realizó en una serie de etanol de concentración creciente de acuerdo con la metodología recomendada por el SCSIE de la Universidad de Valencia, España. Una vez completada la deshidratación al 100 %, las muestras se transfieren, junto con una pequeña cantidad de deshidratante, a la cámara de presión pre enfriada del secador de

punto crítico (Bray, 2000). En este trabajo se utilizó el secador de punto crítico, modelo Autosamdri-814 (Tousimis Research, Rockville, MD) (**Fig. 12a**).

Una vez que se cierra la puerta, un émbolo en la base del canal abre una válvula que drena el exceso de solvente deshidratante en el fondo de la cámara de presión donde se encuentra el drenaje. Luego se abre la válvula de entrada para admitir CO₂ líquido, y cuando la cámara está casi llena, tanto la válvula de ventilación como la de drenaje se abren durante un breve período para eliminar el disolvente deshidratante de la base. Este proceso de lavado se repite varias veces durante un período de 0,5 a 2 h, dependiendo del tamaño de la muestra, para eliminar todos los rastros del solvente deshidratante. Una vez el CO₂ se indica, para completarse la infiltración se cierran todas las válvulas y se aumenta gradualmente la presión pasando agua caliente a través de la camisa de agua. A medida que se acercan a la temperatura y la presión críticas, la línea límite entre las fases líquida y gaseosa se vuelve menos clara y finalmente desaparece. La temperatura también se puede monitorear, pero es un indicador deficiente debido al desfase entre la temperatura de la camisa de agua y la de la cámara de presión. Después de superar el punto crítico, la temperatura se mantiene muy por encima de 31,1 °C, mientras que la presión se reduce gradualmente a 1 atm al ventilar lentamente CO₂ (Bray, 2000).

En este trabajo, los especímenes se montaron sobre talones de aluminio utilizando cinta de carbón de doble cara. A continuación, las muestras se recubrieron con oro-paladio durante 4 min usando un dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica (**Fig. 12b**) (Polaron SC7640; Quorum Technologies, Laughton, East Sussex, Reino Unido).

Las muestras se examinaron con el microscopio electrónico de barrido (**Fig. 12c**) Hitachi S4800 (Hitachi High-Technologies Corp., Tokio, Japón) con un voltaje de aceleración de 10 kV y distancias de trabajo de 8,7 a 10,2 mm. Se adquirieron imágenes de 1280 X 960 píxeles de resolución.

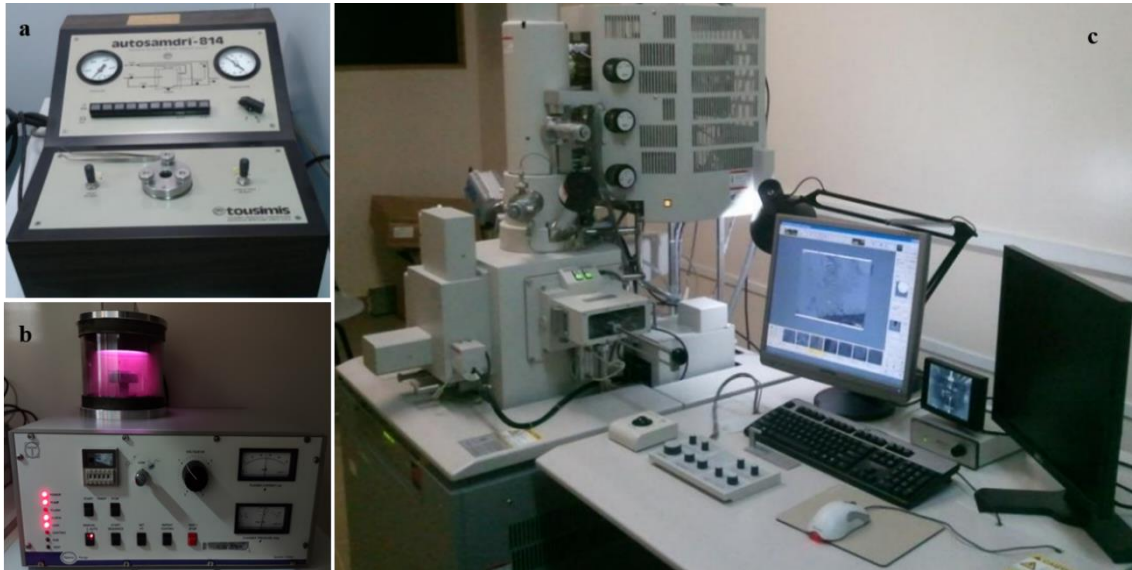


Fig. 12. Equipo utilizado en la preparación y observación de muestras biológicas para SEM. Secador de punto crítico Tousimis Autosamdri-814. (a) Dispositivo de recubrimiento por pulverización catódica Polaron SC7640. (b) Microscopio electrónico de barrido Hitachi S4800 (c) (tomado de SCSIE, 2022).

2.6. Solución de Karnovsky

Es un fijador que combina formaldehído-glutaraldehído que ha producido una excelente fijación de una amplia variedad de tejidos, para su uso en microscopía electrónica. (Karnovsky, 1965). La fórmula propuesta por Karnovsky en 1965, la cual lleva su nombre, ha sido empleada desde entonces en diversas investigaciones, por ejemplo para una mejor visualización del tegumento de nematodos (Krecek et al., 1988), o ejemplares completos de escarabajos o las partes disectadas, fijando proteínas y carbohidratos estructurales (Chacón Castro et al., 2009). Sin embargo el uso de la solución de Karnovsky se ha extendido a la microscopía de barrido láser confocal, donde se ha demostrado que la concentración de glutaraldehído en la solución fijadora tiene un papel determinante de la intensidad de la fluorescencia, ya que la formación de imágenes confocal se logró inmediatamente después de la perfusión con glutaraldehído al 5 % o de Karnovsky (Reynolds et al., 1994). Mostrando imágenes confocales notablemente superiores a la microscopía de fluorescencia convencional en términos de contraste, resolución aparente y resistencia al fotoblanqueo (Reynolds et al., 1994).

La preparación original formulada por Karnovsky, (1965), se detalla a continuación.

Se disuelven 2 g de polvo de paraformaldehído en 25 ml de agua calentando a 60-70 °C y agitando. Se agregan de una a tres gotas de NaOH 1N con agitación hasta que la solución

se aclare, aunque puede persistir una ligera lechosidad. La solución se enfría, se añaden 5 ml de glutaraldehído al 50 por ciento y se completa el volumen a 50 ml con tampón de cacodilato o fosfato 0,2 M, pH 7,4-7,6. El pH final es 7,2. Si se utiliza cacodilato, se añaden 25 mg de CaCl₂ anhidro.

La osmolalidad de este fijador es de aproximadamente 2010 miliosmoles por kg. A pesar de esta alta osmolalidad, la contracción es inusual, excepto cuando el fijador se perfunde o se aplica a monocapas y células que flotan libremente; entonces la dilución parece deseable (Karnovsky, 1965). Se supone que el formaldehído penetra más rápido que el glutaraldehído y estabiliza temporalmente las estructuras que posteriormente se estabilizan de manera más permanente por el glutaraldehído (Karnovsky, 1965). En este trabajo de investigación, para la conservación de las muestras, la solución de Karnovsky se ha utilizado con una concentración de paraformaldehído al 25 % y glutaraldehído al 0,5 %, de acuerdo con la metodología recomendada por SCSIE de la Universidad de Valencia, España.

2.7. Declaración ética y consentimiento para participar

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero, México (folio CB-009/19). Para la recolección de piojos se obtuvieron los permisos necesarios de las autoridades municipales y escolares (oficio 10/jun/2019). Se obtuvo el consentimiento informado de los padres antes de que sus hijos participaran en el estudio, y también se requirió el consentimiento verbal de los niños. La investigación se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la Declaración de Helsinki, Asamblea Médica Mundial, 2013 (World Medical Association, 2013).

**CAPITULO III. *PEDICULUS HUMANUS CAPITIS*: A
STUDY OF THE MALE GENITALIA USING A COMBINED
STEREOSCOPIC, CONFOCAL LASER SCANNING, AND
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY APPROACH**

3. *Pediculus humanus capitis*: a study of the male genitalia using a combined stereoscopic, confocal laser scanning, and scanning electron microscopy approach

3.1. Introduction

In insects, sexual reproduction plays a major role in the evolution of body structures, sexual relationships, and behavior (Tryjanowski et al., 2009). In beetles, the study of male (and, less frequently, female) genitalia has often been included in taxonomic and phylogenetic research (Zunino, 2014). In the Pediculidae, the male genitalia have been the target structures of multiple studies, with the genitalia of the Anoplura being used as one of the most common research models (Retana-Salazar & Rodríguez-Arrieta, 2016). The male phallic organ of lice is a highly complex structure; it is stored in the genital chamber and, therefore, is not exposed to the external environment (Yoshizawa & Johnson, 2006). This hinders detailed study of the microstructure of the male genitalia.

In the seminal work of Nutall, published in 1917, the copulatory apparatus of the male and the copulation process were described for living specimens of body lice. Visual representations of other anatomical parts were also published (Nutall, 1917). According to Nutall, the principal structures of the extruded genital apparatus are the dilator, the vesica of the penis, the support of the penis, the penis, and the ejaculatory duct. In 1983, Hatsushika et al, investigated the external anatomy of male and female *P. h. capitis* by scanning electron microscopy (SEM). In that work, a sclerotic structure was documented, which the authors called a pseudopenis (and Nutall called the dilator), without delving into its description (Hatsushika et al., 1983).

However, there is no standardized nomenclature for the structures of the male genitalia of the order Phthiraptera (Retana-Salazar & Rodríguez-Arrieta, 2016). Furthermore, structures of great morphological significance, as described by Nutall in 1917 are either no longer mentioned in studies or there is no conclusive evidence that they have been studied (Ewing, 1932).

For many species of sucking lice, the structure, and relationships, of the finer parts of the genitalia have not been described, and homologies have not been defined or only very weakly established (Ewing, 1932). Currently, the information available on the male

genitalia of *P. h. capitis* is limited to that on a few structures such as the basal plate and the main sclerites. The shape of the subgenital plate is of taxonomic importance at the species level, while the shape, length, and thickness of the parameres play important roles at both the genus and species level (Kim & Ludwing, 1978). The limited morphological descriptions that have so far been obtained through the use of modern microscopic approaches and techniques hinder the integration of knowledge on the male genitalia of lice. The use of state-of-the-art techniques can positively impact the taxonomic and phylogenetic research on insects.

The objective of this chapter is to investigate and describe the morphology of the structures that form the male genitalia of *P. h. capitis* both at rest and at copulation. We also want to compare and confirm the terminology and morphology described here with that from other investigations on lice. For this, a combination of SM, CLSM and SEM was applied to our knowledge for the first time, to the study of the male genitalia of lice.

3.2. Material and methods

3.2.1. Specimens

For this study, 197 males were analyzed. Of the total samples of male lice, 187 presented genitalia at rest, while 10 had extruded genitalia at different stages. A stereomicroscope (Nikon SMZ-U; Nikon Instruments, Tokyo, Japan), a confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000-IX81; Olympus, Tokyo), and a scanning electron microscope (Hitachi S4800; Hitachi High-Technologies, Tokyo) were used for the morphological characterization of the specimens.

3.2.2. Stereoscopic microscopy

First, the 197 specimens were individually mounted on Petri dishes with Karnovsky fixative to prevent dehydration. Genitalia at rest were identified in 187 of the specimens. Extruded genitalia at different stages (two at pre-copulation and eight at copulation stages) were identified for 10 specimens. The entire body and the genitals were photographed. All of the samples were stored in Eppendorf tubes with fresh Karnovsky

fixative. Subsequently, the 10 males with extruded genitalia were prepared for the two other microscopic visualization methods, CLSM and SEM.

3.2.3. Confocal laser scanning microscopy

The 10 male samples were individually mounted on Petri dishes with Karnovsky fixative to avoid dehydration. A confocal laser scanning microscope was used and the areas of interest of each sample were scanned. Images of the genital area were taken, and the samples were subsequently stored in Eppendorf tubes with Karnovsky fixative.

3.2.4. Scanning electron microscopy

The male lice were removed from the Karnovsky fixative and washed in phosphate buffer for 3 h at 22 ± 1 °C. Samples were prepared by critical point drying and analyzed under scanning electron microscopy. Images of the complete specimens and the specific structures of the genital area were taken. The samples were examined under a scanning electron microscope at an accelerating voltage of 10 kV and working distances of 8,7–10,2 mm. Images of 1280 × 960-pixel resolution were acquired.

More detailed methodology is described in sections 2.4, 2.5, 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3, 2.5.3.1, 2.6.

3.3. Results

3.3.1. Specimens at rest versus specimens at the copulation stage

Under SM, the genitalia of the specimens at rest were maintained within the genital chamber, with the apical part of the dilator being visible. In contrast, the specimens in the process of copulation had a visible dorso-ventral inclination on abdominal segment VII and a translucent white pouch that protruded dorsally from abdominal segment IX. In this region, we identified the penis and two structures, namely the “vesica stem” and the “vesica” (**Fig. 13a, b**).

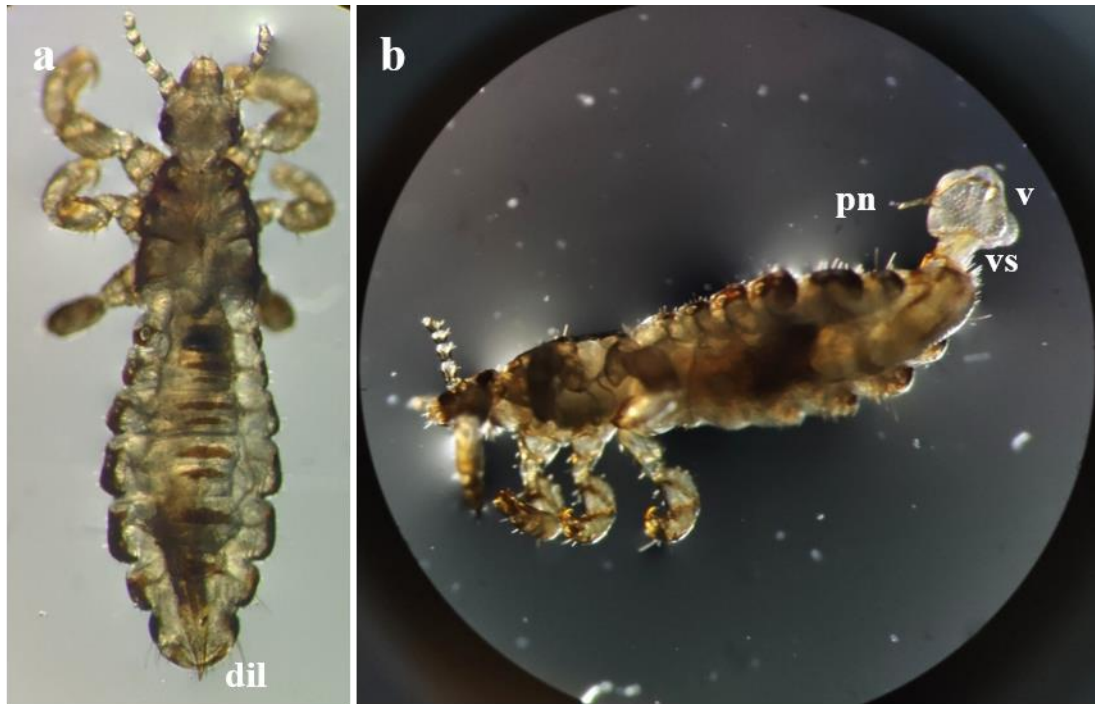


Fig. 13. Male specimen of *P. h. capitis* under SM. (a) Dorsal view of the distal end of the dilator (dil) at rest. (b) Male in copulation position; the vesica stem (vs), vesica (v), and penis (pn) can be observed. Abbreviations: dil, dilator; vs, vesica stem; v, vesica; pn, penis.

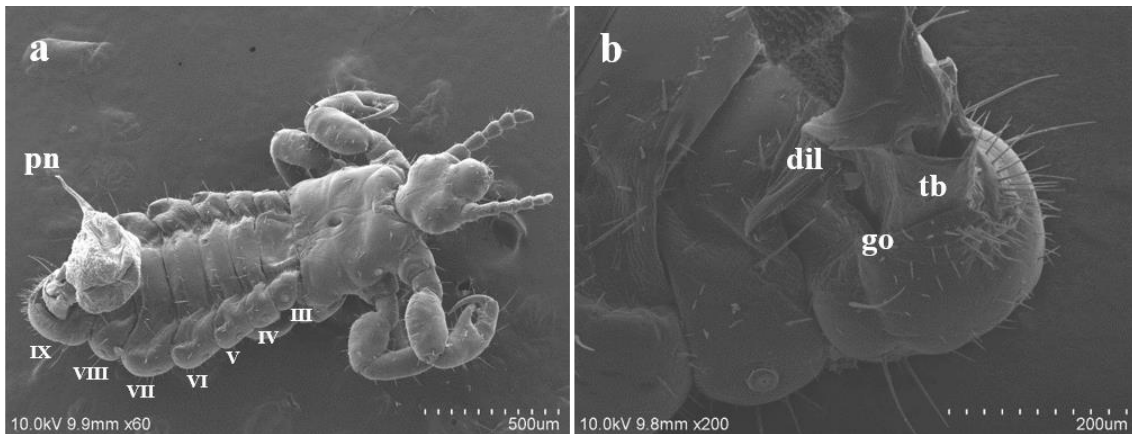


Fig. 14. Male specimen of *P. h. capitis* under SEM. (a) Panoramic view of the extruded genitalia and abdominal segments III–IX. (b) Detail of segment IX showing the genital opening (go), the distal part of the tunica basalis (tb), and the dilator. For other abbreviations, see **Fig. 13**.

3.3.2. Characteristics of the specimens at the copulation stage

At copulation, the male genitalia emerge through a horizontal opening, for which we propose the term “genital opening,” which is located dorsally to segment IX (**Fig. 14a, b**). This opening connects to the genital chamber, corresponding to abdominal segments

VII– IX (**Fig. 15a**). The genital aperture had thick and smooth edges and was externally surrounded by setae. Short setae covered the anterior border, while those of varied sizes covered almost the entire posterior segment. Long setae were medial to the edge of the genital opening (**Fig. 14b**). In specimens at the initial stage of copulation, the dilator was anterodorsally inclined, which, combined with the relaxed genital aperture, allowed the genitalia to extrude (**Fig. 15b**).

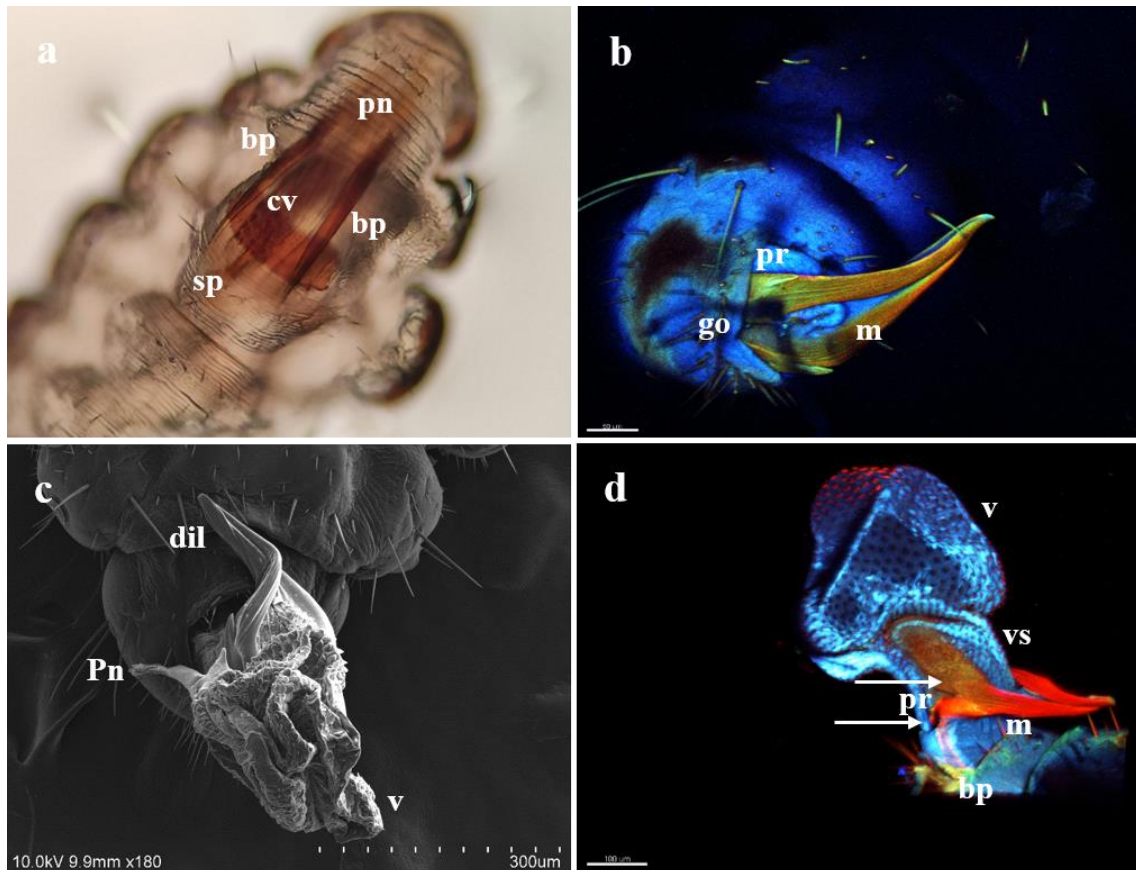


Fig. 15. Structures of the male genitalia of *P. h. capitis* studied under SM, CLSM, and SEM. (a) Ventral view of the genital chamber of a male at rest (SM microphotograph) showing the basal plate (bp), the contracted vesica (cv), the support of the penis (sp), and the penis, though the latter is less evident. (b) Male at the initial phase of copulation under CLSM. The relaxed genital opening, the mesomeres (m), and the parameres (pr) can be observed as a result of the position of the dilator. Scale 50 μm . (c) Detail of the position of the dilator during copulation, as seen under SEM. (d) Articulation of the parameres and the basal plate (bottom arrow), attachment of the mesomere to the vesica stem (top arrow), the vesica stem, and the vesica, as seen under CLSM. Scale 100 μm . For other abbreviations, see **Figs. 13** and **14**.

3.3.3. Structures that compose the genitalia

The male genitalia mainly consisted of the following structures:

1. The tunica basalis, a membrane with the aspect of a muscle that lines the genital chamber. We propose the term “tunica basalis” to describe this muscle-like membrane (**Fig. 14b**).
2. The basal plate, which is composed of a pair of rods positioned in a U shape at their proximal ends, and has thickenings laterally anchored to the tunica basalis (**Fig. 15a**).
3. The dilator, a structure formed by two arms, each of which is composed of a long mesomere partially fused with a short lateral paramere. The parameres are oriented to the posterior end of the basal plate. In the mesomeres, we observed attachments that are fixed laterally to the vesica stem. The arms of the dilator were found to fuse distally, forming a functional V-shaped structure with rounded ends. Posterior to the fusion point is a slightly left-oriented torsion that forms an angle with the penis. Ridges of variable size and depth are positioned lengthwise along the dilator (**Fig 15b, d**).
4. The vesica stem, the structure that serves as a supportive base for the vesica and the penis. It is muscular and equipped with short, narrow spines (**Figs. 15d, 16a, b**).

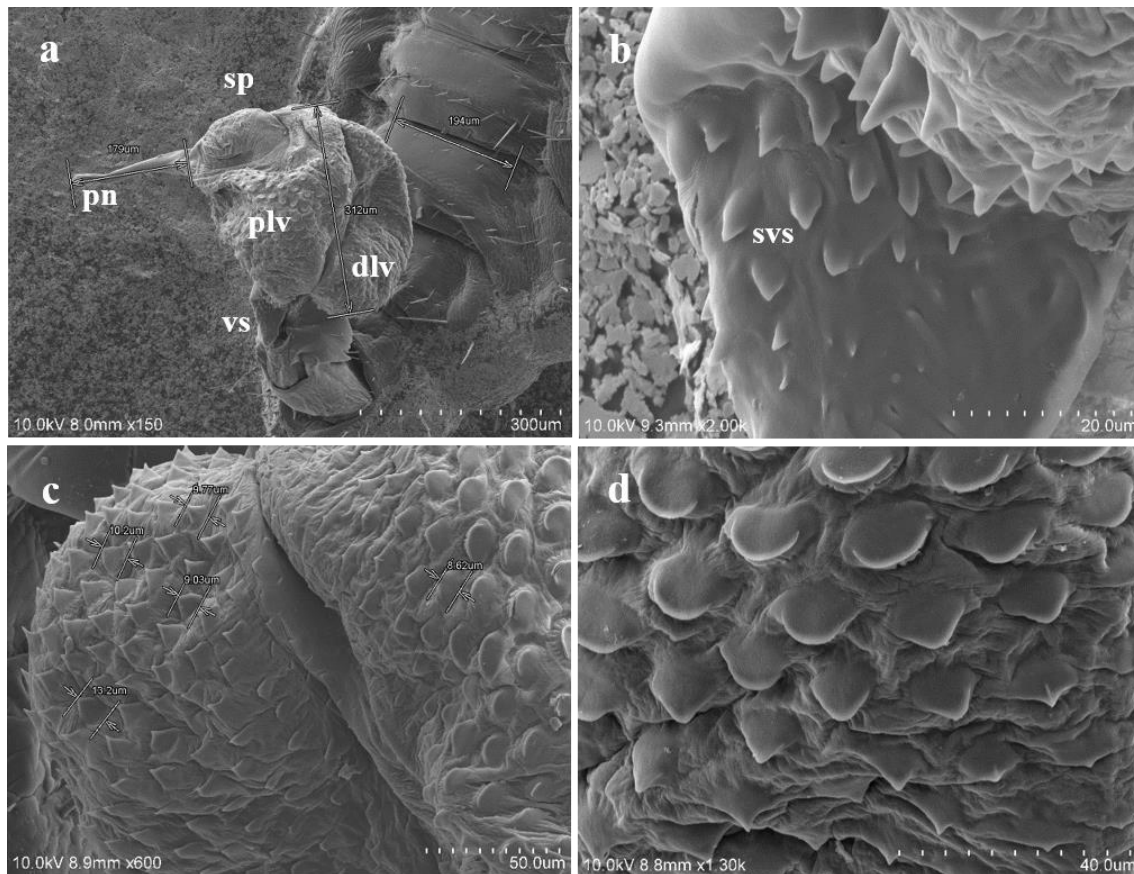


Fig. 16. Detail of the structures of *P. h. capitis* under SEM. **(a)** General view of the genitalia: vesica stem, proximal lobe of the vesica (plv), distal lobe of the vesica (dlv), support of the penis, and penis. **(b)** Detail of the spines of the vesica stem (svs). **(c, d)** Details of the spines and scales of the vesica. For other abbreviations, see **Figs 13, 14** and **15**.

5. The vesica, a structure composed of two lobes that are separated from each other by a fissure with heterogeneous borders with an average height of 312 μm . The proximal lobe (PLV) and the distal lobe (DLV) of the vesica are named according to their position relative to the penis (**Fig. 16a**). Two types of ornamentation were identified in the vesica: spine- and scale-like structures (average height 10.16 μm) with variable surface areas. The short and narrow spines are mainly distributed at the edges of the fissure that separates the two lobes of the vesica. Long and broad sharp-tipped or round-tipped scales are randomly distributed within the PLV and DLV. The round-tipped scales are predominantly located at the posterior medial region of the PLV, have a wavy base, and resemble a tongue (**Figs 16a, c, d**). These ornamentations are partially visible when the vesica is contracted within the genital chamber (**Fig. 15a**).

6. The support of the penis, located on the dorsal part of the PLV. It is a hairpin-shaped structure free of spines or scales, lined with a contractile-like tissue, which serves as a

supportive tissue for the penis (**Figs 16a, 17a**). The presence of two interconnected thick ducts was verified by CLSM; these probably contribute to the stiffness of the penis. They run alongside the ejaculatory duct inside the PLV posterior wall and pass under the hairpin to reach the penis (**Fig. 17b**).

7. The penis, a smooth tubular structure, with the tip slightly curved upwards (average total length 179 μm). An extension was identified at its proximal end with the shape of an inverted crest with a gland-like portion. There, 11 shallow circular depressions with no apparent exit orifice were documented (**Fig. 17c, d**). Toward the apical end, a flat area with an average length of 2.07 μm was identified; it has 14–16 exit orifices of undetermined depth (**Figs 17c, 18a, b**). The apical end of the penis has horizontal folds and terminates with a trifurcation that is leaf-like in shape. Cross-sections of the penis and the trifurcation revealed the presence of a hollow space, which possibly serves in the expulsion of the contents of the ejaculatory duct (**Fig. 18a, b, d**).

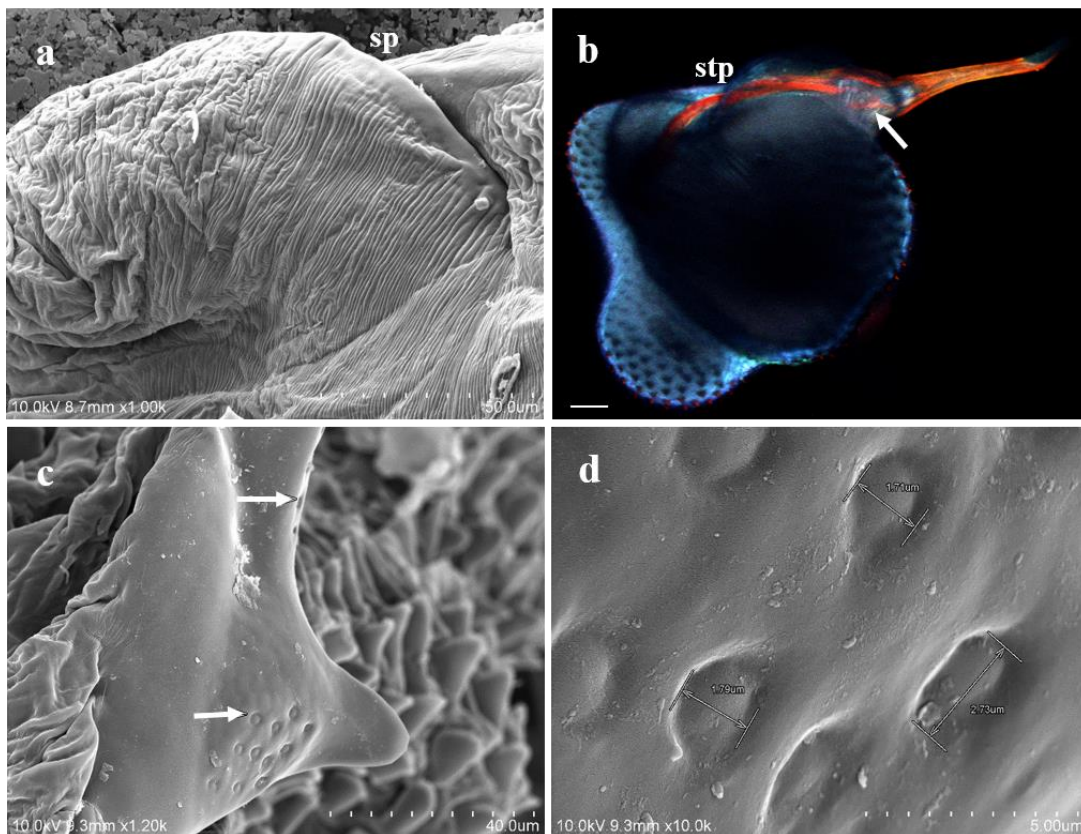


Fig. 17. Anatomical details of the penis of *P. h. capitis*. **(a)** Support of the penis observed under SEM. **(b)** Supporting tendons of the penis (stp), seminal canal (arrow) observed under CLSM. Scale 50 μm . **(c)** Inverted crest of the penis with 11 depressions (lower arrow), some of the 14–16 orifices (upper arrow) observed under SEM. **(d)** Magnification of the depressions of the inverted crests observed under SEM. For other abbreviations, see **Figs 13, 14** and **15**.

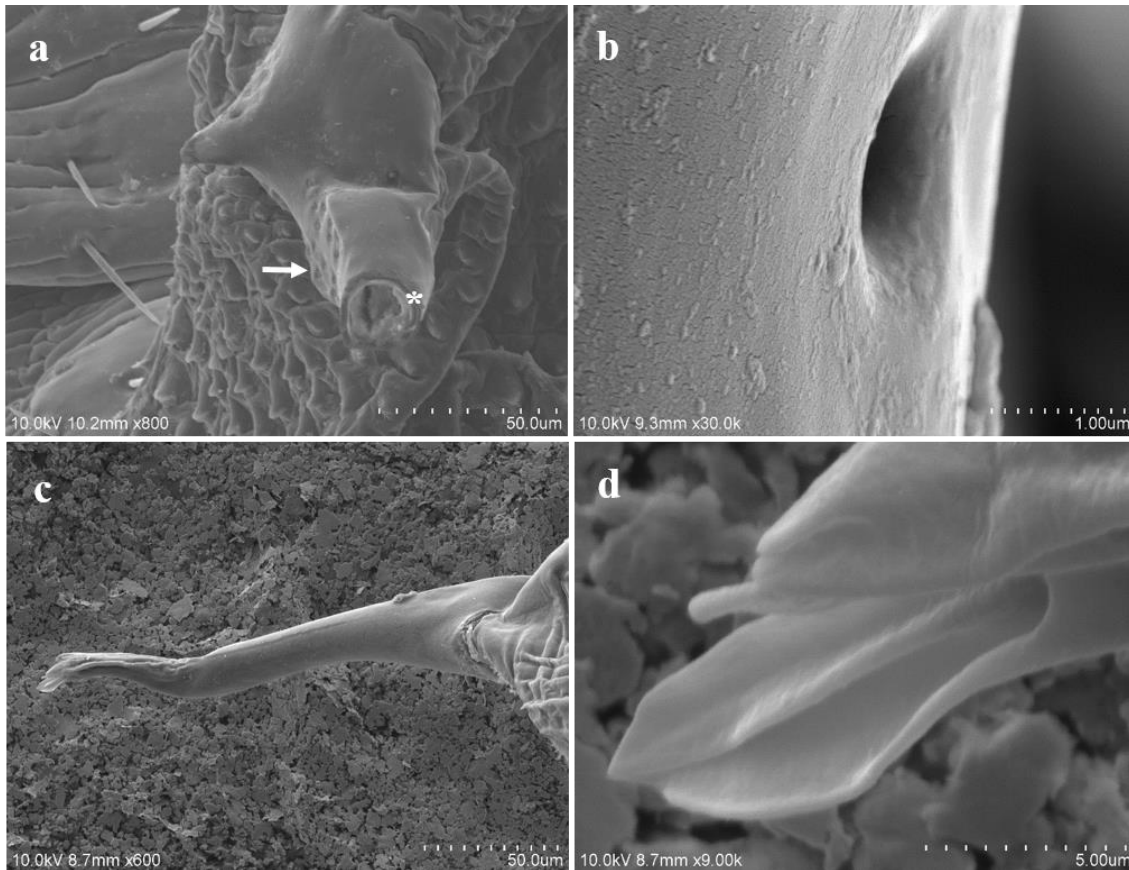


Fig. 18. Morphological details of the penis of *P. h. capitis* under SEM. **(a)** The flat area with 14–16 orifices (arrow) at a cross-section of the penis (asterisk). **(b)** Magnification of the orifices. **(c)** Dorsal part of the penis. **(d)** Details of the foliaceous trifurcate tip.

Our results show that the male genitalia of *P. h. capitis* are complex but well-preserved structures since the morphological characteristics described here were consistently found in all the specimens studied.

3.4. Discussion

In this chapter, we describe the structures of the male genitalia of *P. h. capitis* and establish the morphological differences between the genitalia at rest (inside the genital chamber) and when they are extruded to prepare for copulation. According to the microphotographs obtained with three different visualization methods, namely SM, CLSM, and SEM, the morphological evidence supports Nutall's observations for some of the studied structures. For this reason, we adopted his terminology, where appropriate, together with new terms that we have introduced to describe structures observed for the first time. The terms adopted from Nutall include the dilator, vesica stem, vesica, penis

support, and penis (Nutall, 1917). The terms we propose are the following: the tunica basalis; the proximal and distal lobes; the spines and scales of the vesica, which are microstructures; the spines of the vesica stem; the contractile lining that serves as a support for the penis; the inverted crest of the penis, which has 11 depressions; the flat area of the penis, which has 14–16 exit orifices; the foliaceous trifurcation at the apical end of the penis; and the hollow space that serves to expel the contents of the ejaculatory duct.

The term dilator is especially controversial due to the discrepancies that have been documented regarding its structure. It has been referred to by various terms, e.g., it was first called “dilator” (Nutall, 1917), and later “pseudopenis” (Ewing, 1932), “mesomere” (Yoshizawa & Johnson, 2006) and “mesomeric arch” (Retana-Salazar & Rodríguez-Arrieta, 2016). Nutall opted for the term dilator since this structure serves to dilate the female’s vagina before copulation. He described its structure as composed of parameres distally fused with the lateral spurs. Despite the correct use of this term with respect to this structure’s function, anatomically it is not the most accurate. However, even though, from the results of the present study, we can confirm the observations of Retana-Salazar concerning the existence of long mesomeres and short parameres, we still propose the use of the term dilator based on this structure’s function.

The basal plate is a structure that is widely conserved in the Psocodea. Since the position of this structure, as observed in our study, is homologous with that seen among different suborders of lice, we consider this term to be appropriate (Yoshizawa & Johnson, 2006).

A 1998 study by Cicchino that used SEM to examine the sucking louse of alpacas, *Microthoracius mazzai* (Phthiraptera: Anoplura), described a U- or V-shaped structure that the authors called a “protruding pseudopenis with a pointed appendix” and a second structure that they called a “rounded aedeagus” (Cicchino et al., 1998). Judging from their morphology, the pseudopenis and aedeagus of *M. mazzai* may correspond, respectively, to the anterodorsally tilted dilator and the partially extruded internal genitalia observed here in *P. h. capitis* (**Fig. 15b**).

Most studies on the genital structures of sucking and chewing lice provide illustrations of insects at rest (Naz et al., 2012; Durden et al., 2017), which makes comparison and the establishment of homologies among the Phthiraptera difficult. Therefore, the use of new microscopic techniques applied at different stages of copulation is necessary to obtain a clearer view of the morphology of these structures and to avoid errors in the interpretation

of their functions. The combined use of advanced microscopic methods allowed us to visualize a multitude of penis structures in great detail. These structures and their characteristics were observed in all the specimens analyzed, showing that they are highly conserved. To our knowledge, some of these structures have not been reported previously for any suborder of lice.

The described genital structures seem to participate synergistically in the copulation of *P. h. capitis*. It is possible that chemical signaling is involved, causing the dilator to respond and, at the same time, send signals to the structures within the genital chamber to prepare for extrusion. Supposing this signaling exists, the dilator, the vesica stem, and the vesica should present specialized sensory areas to receive this information. These sensory areas could be the spines and scales of the vesica stem and vesica. In addition, an internal pressure system and musculature that control the movement of the structures could also be involved.

The microscopic anatomy of the penis of *P. h. capitis* has several interesting aspects; for example, the inverted crest that possesses an area with a glandular appearance, which is possibly related to the supply of nutrients and control of the pH balance of the louse's semen. The flat area with the 14–16 exit holes probably plays a role in regulating the osmotic pressure exerted on the vesica which could ultimately lead to the expulsion of the semen from the penis. Our results revealed the complexity of the male genitalia of *P. h. capitis* when examined at different stages of copulation, and indicate that this should be taken into consideration in future investigations on the anatomy or the reproduction of similar species. In the present work, we provide the first description of the morphology of the male genitalia of *P. h. capitis* using a new approach that combines different modern visualization techniques, and propose a change to the paradigm of the study of genitalia in lice. The application of state-of-the-art microscopic techniques to anatomical descriptions will undoubtedly impact future taxonomic and phylogenetic research on insects.

**CAPÍTULO IV. EMBRYONIC DEVELOPMENT OF
PEDICULUS HUMANUS CAPITIS: MORPHOLOGICAL
UPDATE AND PROPOSAL OF NEW EXTERNAL
MARKERS FOR THE DIFFERENTIATION BETWEEN
EARLY, MEDIUM, AND LATE EGGS**

4. Embryonic development of *Pediculus humanus capitis*: Morphological update and proposal of new external markers for the differentiation between early, medium, and late eggs

4.1. Introduction

The diagnosis of head lice infestation is based on the finding of living lice in the hair of a person during any one of their developmental stages, i.e., egg, nymph, or adult (Pollack et al., 2000), with the egg being the most frequently detected form. The use of a fine-toothed detection comb improves the efficiency of lice sampling (Ibarra, 1988; Mumcuoglu et al., 2001; Balcioglu et al., 2008). Head lice infestation is relatively easy to treat with the use of topically applied agents that eliminate the insects and their eggs.

The adult female lives for about a month, when it produces approximately 300 eggs (Lehane, 2005) that are oviposited at the base of hair shafts (Amanzougaghene et al., 2020). The eggs' average size is 0,8 mm by 0,3 mm; they have an ovoid shape and generally present a shade of yellow or white (Laguna & Risau-Gusman, 2011). A vault-like operculum is found on the distal end of the egg (Burkhart et al., 1999). The operculum has 7 to 11 aeropyles that occupy half of its surface (Burkhart et al., 1999). During oviposition, females secrete a liquid that is then solidified, forming the nit sheath (Dutra et al., 2014). The nit sheath proteins LNSP1 and LNSP2 are essential for maintaining egg viability and also function as a glue (Kim et al., 2021). The only part of the egg free of glue is the operculum, which protects the embryo from asphyxiation during development (Burkhart & Burkhart, 2005; 2007).

In insects, the female must provide the eggs with sufficient nutrients to sustain embryogenesis (Oliveira et al., 2013). To this end, the fatty body synthesizes massive amounts of proteins that are secreted into the hemolymph to reach the ovaries, where they are incorporated into the developing oocytes (Oliveira et al., 2013). Once inside the oocyte, proteins accumulate in granules, called yolk granules (Oliveira et al., 2013). This process is called vitellogenesis and normally occurs only in the terminal oocyte; subsequently, the yolk membrane, chorion, and aeropyles are formed (Gillott, 1995).

Embryogenesis varies among insect groups or even among closely related species. In hemimetabolous species, it usually starts with the formation of the blastoderm and the

germ band and terminates with organogenesis (Belles, 2020). During the embryonic development of insects, events related to cellular differentiation, growth, and morphogenesis occur (Gilbert, 1997). Since these events are crucial, toxicokinetic and toxicodynamic processes are modified during embryogenesis. These toxicological variations have been reported in several species (Tahmisian, 1943; Smith & Wagenknecht, 1959; Smith & Salkeld, 1966; Smallman & Mansingh, 1969; de Villar et al., 1980). In the study of human lice, little research has focused on embryonic development (Nuttall, 1917; Cueto et al., 2006; Sonnberg et al., 2014). However, markers of embryonic development currently represent a new approach to assess the toxicity of insecticides against human lice eggs (Cueto et al., 2006).

Studies on the activity of pediculicidal products against eggs use different criteria to evaluate the effect on their development. In this context, viability criteria have been used to define eggs into the following categories: (a) alive, i.e., the egg is located at approximately < 1 cm from the scalp, the operculum is closed, the egg has a uniform ovoid shape and density, and an “eye spot” may appear depending on the age of the egg, (b) dead, i.e., the egg has a misshapen, shriveled, indented, or irregular shape, or the egg has a non-uniform density with parts of the egg being clear, whereas other parts of the egg are opaque, or (c) hatched, i.e., the operculum is open and the nymph is not in the egg (Barker & Altman, 2011).

Other studies on the efficacy of pediculicides are based on embryological development criteria such as changes in the appearance of *P. h. capitis* embryos assessed at different stages (Cueto et al., 2006). Based on the color of the ocular spots and the appearance of appendages, the developing eggs of head and body lice were previously divided into three stages: early, medium, and late. Early eggs are characterized by the absence of external markers, while medium eggs present reddish eyes and outlines of the appendages, and late eggs have developed black eyes and visible appendages (Cueto et al., 2006).

The objective of this chapter was to update the morphology of embryonic development and propose novel external markers to differentiate between early, medium, or late *P. h. capitis* eggs that were obtained by natural infestation. To this end, stereoscopic light-field microscopy was applied. The updated morphological characteristics of the egg will facilitate the standardization of toxicological assays in the quest for ovicidal drugs.

4.2. Materials and methods

4.2.1. Specimens

For this study, 651 eggs detached from the hair and 71 eggs attached to the hair ($N = 722$) were analyzed.

4.2.2. Stereoscopic microscopy

The 722 eggs were individually mounted in Petri dishes with Karnovsky fixative to avoid dehydration. To visualize the specimens, the $\times 0.75$ and $\times 7.5$ objectives were used, with the focus and light individually adjusted to observe the external morphology of the egg and through the chorion to search for embryonic development characteristics. The eggs were classified into three developmental stages according to previously reported characteristics of human lice (Nuttall, 1917; Cueto et al., 2006; Barker & Altman, 2011; Sonnberg et al., 2014; Al-marjan et al., 2015; Bowles et al., 2017) and the cricket *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect used as a study model in neurobiology, physiology, and genetics (Donoughe & Extavour, 2016). All eggs were photographed and subsequently stored in Eppendorf tubes with fresh Karnovsky fixative.

More detailed methodology is described in sections **2.1, 2.2, 2.2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.5.1**.

4.3. Results

Of the total number of eggs ($N = 722$), 550 (76, 17 %) were considered viable based on a complete external morphology and the presence, to a greater or lesser extent, of some embryogenesis characteristics. Of the remaining 172 eggs, 168 (23,26 %) had hatched and 4 (0,55 %) had an intact external morphology. However, they did not contain yolk. Thus, these eggs were non-viable by default. Hereinafter, these are called defective/non-viable eggs.

The viable eggs ($N = 550$) were grouped into three developmental stages according to their individual characteristics: early ($N = 138$; 19,11 %), medium ($N = 208$; 28,80 %), and late ($N = 204$; 28,25 %) eggs. The eggs presented a semi-transparent, amber coloration that permitted the observation of the external morphology and characteristics.

4.3.1. Egg morphology

The eggs of *P. h. capitis* had an ovoid shape with an operculated anterior pole and a posterior pole presenting a blunt termination. The ventral side was semi-flattened, and the dorsal side was concave. The last third of the eggs was ventrally attached to the hair, forming nit sheaths of variable length that partially surrounded the hair (Fig. 19a). In some cases, the glue was more abundant on the apical part of the egg. The operculum, with a defined opercular edge, was convex and presented 10 round protuberant cells with a central orifice, known as aeropyles. The aeropyles were arranged concentrically on the ventral side of the egg (Fig. 19b-c). The surface of the chorion was smooth and undecorated. Except for the operculum, no other orifices corresponding to micropyles were observed. In most of the participants with mild or moderate infestations, one egg per hair was found. However, in the case of severe infestation, two viable or hatched eggs per hair were found (Fig. 19d).

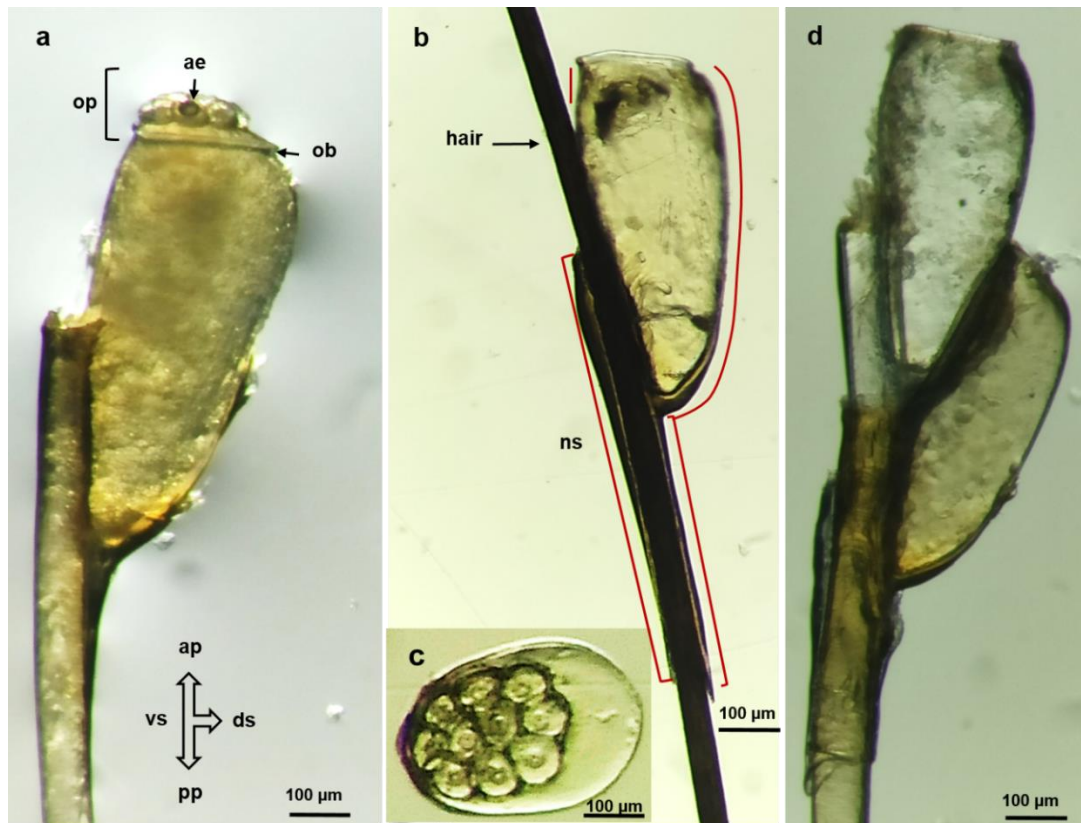


Fig. 19. Morphology the *P. h. capitis* egg under SM. (a) Fertile egg with visible the ventral (vs) and dorsal sides (ds), the anterior (ap) and posterior poles (pp), opercular pole (op), the opercular border (ob), the operculum (op), and the aeropyles (ae). 100x magnification. (b) Hatched egg. The nit sheath (ns) can be observed, most notably in the apical part of the egg, beside the hair (orange lines). 100x magnification. (c) Detail of the operculum with 10 aeropyles. 100x magnification (d) Hair with two hatched eggs. 100x magnification.

4.3.2. Defective/non-viable eggs

These eggs presented the external morphology of a viable egg, without differences on a macroscopic level. Nevertheless, no internal structures were visible: the eggs appeared empty and without yolk. The defective/non-viable eggs presented a sealed operculum (**Fig. 20a**), unlike the hatched eggs (**Fig. 19d**).

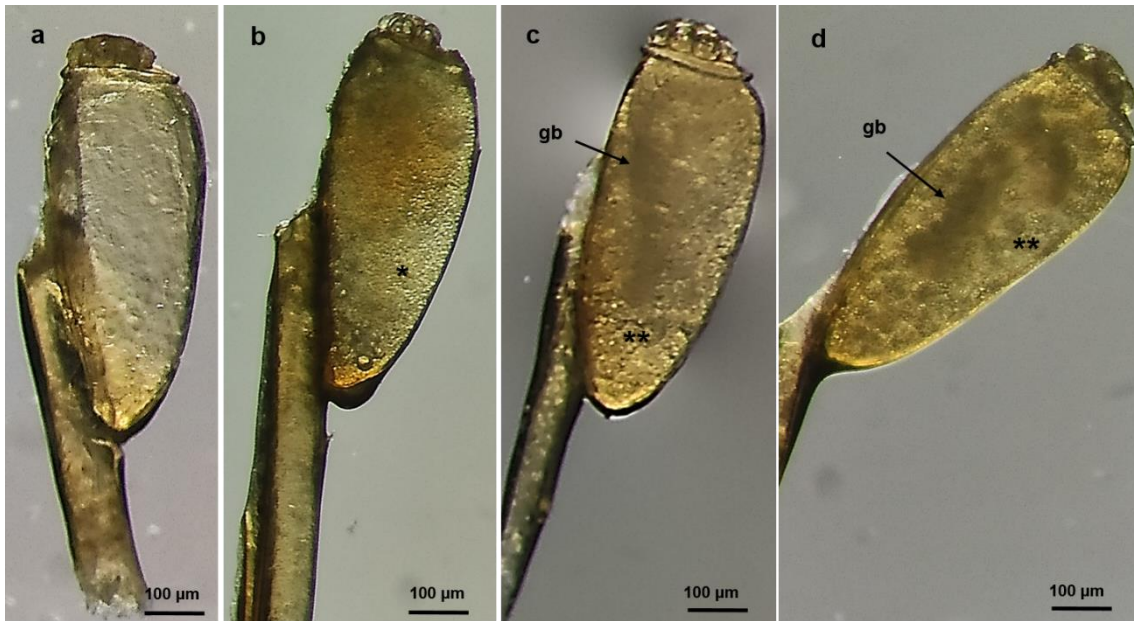


Fig. 20. Morphology of defective/non-viable and early *P. h. capitis* eggs under SM. **(a)** The defective/non-viable egg does not present yolk. 100x magnification. **(b–d)** Early eggs. **(b)** Egg with abundant fine yolk granules (*). 100x magnification. **(c)** Egg with multiple yolk granules of variable size (**) and a forming germ band (gb). 100x magnification **(d)** Egg with yolk granules relocated to the center (**) and an evident germ band (gb). 100x magnification.

4.3.3. Morphology of the embryogenesis

4.3.3.1. Early eggs

At this developmental stage, the eggs presented qualities corresponding to early embryogenesis. Eggs with abundant fine yolk granules (**Fig. 20b**), eggs with multiple yolk granules of variable size with a forming germ band (**Fig. 20c**), and eggs with yolk granules relocated to the center and an evident germ band (**Fig. 20b– d**) were analyzed. The presence of fine yolk granules allowed the differentiation between defective and early eggs (**Fig. 20a-b**).

4.3.3.2. Medium eggs

At this stage, the eggs presented an embryonic rudiment formed from the germ band. The embryonic rudiment was found in the ventral part of the eggs and appeared as a large opaque area surrounded by yolk granules (**Fig. 21a**). Subsequently, a partially differentiated embryo was formed, presenting two distinct areas: in the larger and more opaque anterior area, two small anterodorsal points representing the eye outlines were observed, while the posterior area of the embryo was darker. The yolk granules started to fade as they concentrated in the embryo while this was defined (**Fig. 21b**).

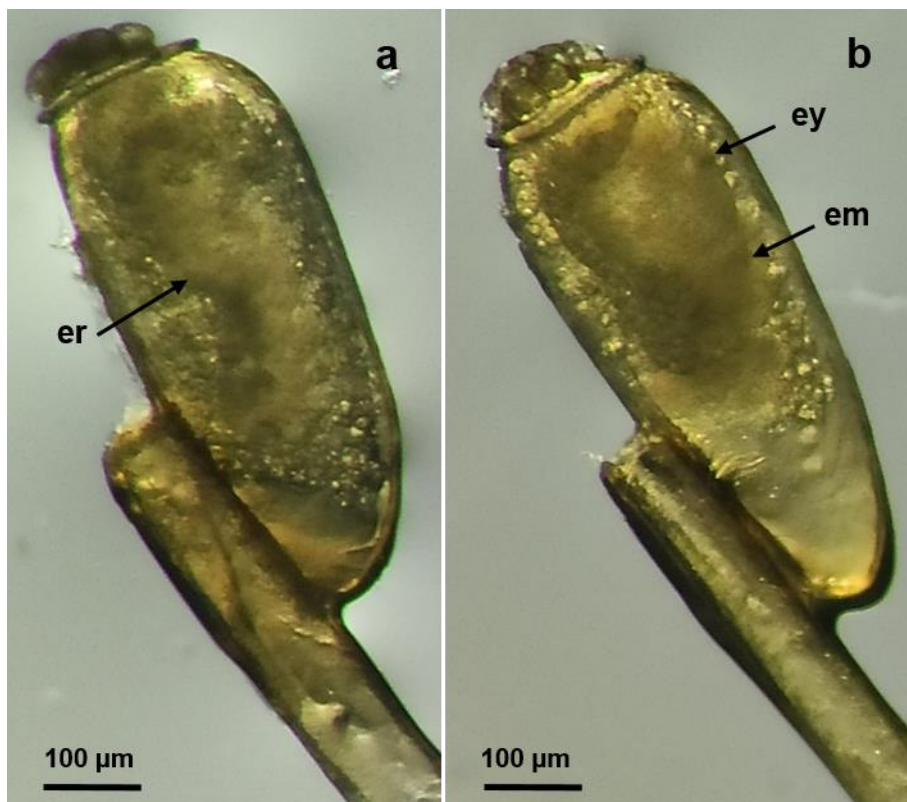


Fig. 21. Morphology of medium *P. h. capitis* eggs under SM. **(a)** Egg with an embryonic rudiment (er). A large opaque area surrounded by yolk granules can be observed. 100x magnification. **(b)** Egg with a partially differentiated embryo (em). The eye outlines (ey) and less visible yolk granules can be observed. 100x magnification.

4.3.3.3. Late eggs

In the eggs of this stage, increased organogenesis was observed, with the embryos presenting differentiation and growth. The yolk granules were no longer visible around the embryo as this began to grow and become morphologically defined. In the cephalic area, the mouth primordium was observed, and the eyes appeared as two lateral red dots (**Fig. 22a**). Gradually, the developing structures, like the mouth cavity and the limbs, were

visible (**Fig. 22b**). The embryo occupied approximately 70 % of the egg. The orientation of the embryo followed the dorsal-ventral axis of the egg (**Fig. 22a-b**).

All segments continued differentiating as the embryo increased in size. The three segments corresponding to the head, thorax, and abdomen were visible. On the head, two pigmented large eyes and the ventrally folded antennae were distinguished. The thorax presented three pairs of well-developed legs with visible tarsal claws (**Fig. 22c**). On the abdomen, six lateral points that corresponded to the spiracles were identified. In the final phase of development, the embryo occupied approximately 95 % of the egg, with a free space in the apical part. The cuticle was dark, and the insect had acquired the morphology of the nymph I stage with the ability to hatch (**Fig. 22d**).

All the eggs were observed at different angles. However, observation from the side provided greater and more consistent morphological information, possibly coinciding with the position that the larva adopts during its development.

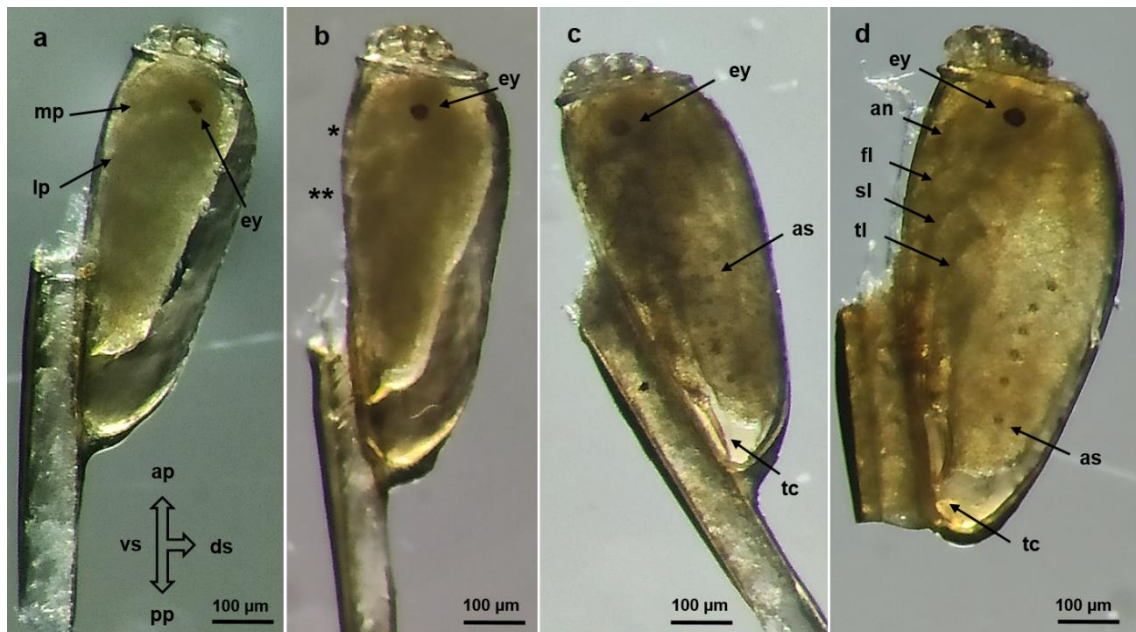


Fig. 22. Morphology of late *P. h. capitata* eggs under SM. **(a–d)** The cephalic area, mouth primordium (mp), red eyes (ey), and leg primordium (lp) can be seen. 100x magnification. **(b)** The mouthparts (*) and legs in development (**) are visible, while the yolk granules surrounding the embryo can no longer be observed. 100x magnification. **(c–d)** Two large, pigmented eyes (ey), the antennae (an), the first-to-third pairs of folded legs (fl, sl, tl), and the tarsal claw (tc) can be observed. 100x magnification. **(d)** In the final developmental stage (nymph I stage), all structures and segments are defined: the cuticle is dark and six pairs of marked abdominal spiracles (as) are visible. The nymph I is ready to hatch.

4.4. Discussion

Using stereoscopic microscopy, the external morphology of *P. h. capitis* eggs was described, and many fine morphological characteristics of the embryo were identified through the chorion. The studied sample included empty hatched eggs and non-hatched eggs with a content ranging from fine yolk granules to a developed embryo or, at a low percentage, defective eggs without content. These results highlight the need for large magnification to evaluate the eggs' development and viability.

In the analyzed sample, 23,26 % of the eggs had hatched. As the hair grows, empty eggshells accompany it moving away from the scalp, where nits, a term proposed to refer to the empty eggshell (Maunder, 1983), become easier to detect. Although these shells are harmless, they are cosmetically inappropriate according to the modern rules of esthetics. They also indicate prior lice infestation, which can result in stigmatization.

In this study, both viable and defective/non-viable eggs presented an operculum with 10 aeropyles, confirming previous reports (Mehlhorn et al., 2011; Burkhart et al., 1999). In almost all insects, spermatozoa enter the eggs through micropyles (Gillott, 1995), with some eggs presenting multiple micropyles (Resh & Cardé, 2009). However, in this study, no such structure was identified, following the lack of evidence that exists in the *P. h. capitis*-related literature regarding this structure. This highlights the need to employ other microscopic techniques to study the possible existence, number, and position of micropyles in the egg.

The finding of defective/non-viable eggs could be related to the age of the females. It has been reported that many of the eggs of *P. h. capitis* females that are older than two weeks are not viable (Lehane, 2005). In *Musca domestica*, when an ovary has mature eggs, an oostatic hormone is produced to prevent the release of developmental neurosecretory hormone from the egg necessary for vitellogenesis (Gillott, 1995). This suggests that the older females of *P. h. capitis* could activate chemical signals that affect protein synthesis by the fatty body, impeding vitellogenesis in some eggs. Consequently, factors such as the age of female *P. h. capitis* and the possible activation of chemical signals could partially explain the presence of defective/non-viable eggs. Moreover, the low percentage of defective/non-viable eggs in our study could be due to the fact that the sample was oviposited by females of different ages. It should be noted that this is the first study to document these eggs. Future research should consider this finding and conduct novel investigations to clarify the true percentage of defective/non-viable eggs oviposited by

females of different ages. In this context, the need for further investigation to elucidate the physiological mechanisms underlying this phenomenon in *P. h. capitis* is crucial.

Embryogenesis has been studied mostly in holometabolous insects, including the fruit fly, (*Drosophila melanogaster*), the beetle of the flour, (*Tribolium castaneum*), and the moth silk (*Bombyx mori*) (Panfilio, 2008). The morphological characteristics of *P. h. capitis*' embryonic development described here permit the general comparison with the cricket's (*G. bimaculatus*) development (Donoughe & Extavour, 2016). However, several physiological events in head louse development may be specific to their hematophagous nature.

Here, new markers are proposed for the differentiation between the three embryogenesis stages. As for the early eggs, some virgin females of *P. h. capitis* have been considered to lay eggs without fertilization (Kim et al., 2021), similar to females that have mated (Nuttall, 1917). Consequently, we added viability and fecundity markers to this stage. The viability markers involved assessing the external integrity of the egg and its content, i.e., yolk granules, which are the main reserve of nutrients during embryonic development. The fecundity marker is the development of the germ band, which indicates that the egg was fertilized before oviposition. These markers can be observed between days 1–2 post-oviposition (Nuttall, 1917). Previously, it was believed that this stage is devoid of markers (Cueto et al., 2006). However, in this study, we consider that this stage is crucial for the progression of embryogenesis, provided there is an optimal microenvironment for it (**Table 4**).

Egg classification	Previously proposed embryonic development markers	Proposed embryonic development markers and markers of viability and fecundity in this study
Early eggs	<ul style="list-style-type: none"> • Fine yolk-granule content • Formation of yolk masses of variable size ¹ • Absence of external markers ² 	<ul style="list-style-type: none"> • Abundant fine yolk granules • Multiple yolk granules of variable size and a forming germ band * • Yolk granules in the center of the egg and an evident germ band * • <i>Viability marker</i>: external integrity of the egg and yolk granule content * • <i>Fecundity marker</i>: development of germ band *
Medium eggs	<ul style="list-style-type: none"> • Milky, slightly opaque areas • Limb formation ¹ • Reddish eyes and apendages outlines ² 	<ul style="list-style-type: none"> • Embryonic rudiment: large opaque area surrounded by yolk granules * • Partially differentiated embryo. Anterior area: opaque and larger, with two small anterodorsal spots (outlines of the eyes); posterior area: darker.
Late eggs	<ul style="list-style-type: none"> • The body and the limbs are more clearly defined ¹ • The eyes are visible and appear as two pink anterolateral spots ¹ • Black eyes and visible apendages ² 	<ul style="list-style-type: none"> • Defined embryo • The yolk granules are not visible around the embryo * <p data-bbox="810 954 1018 1032">The embryo occupies approximately 70% of the egg *</p> <div data-bbox="1038 898 1246 1088" style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Cephalic area, red eyes, mouth primordium, leg primordium, mouthparts, and developing legs</p> </div> <p data-bbox="810 1256 1018 1335">The embryo occupies approximately 95% of the egg *</p> <div data-bbox="1038 1144 1310 1447" style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>Head: large pigmented eyes, ventrally folded antennae</p> <p>Thorax: three pairs of well-developed legs, tarsal claws</p> <p>Abdoment: six pairs of spiracles, dark cuticle</p> </div>

Table 4. Markers of embryonic development proposed in previous works and the present study. Data taken from Nuttall (1917)¹ and Cueto et al. (2006)². Markers proposed *

The finding of defective/non-viable eggs allowed the establishment of morphological differences with early eggs that present fine yolk granules. Theoretically, embryogenesis will not be carried out in defective/non-viable eggs due to the apparent absence of yolk, contrary to early eggs. Usually, all eggs that are located at < 1 cm from the scalp are considered alive (Barker & Altman, 2011). This should be taken with caution, and the possibility of finding defective/non-viable and infertile eggs should be contemplated when testing ovicidal drugs.

As for the strengths of this study, it provides a novel description of the embryonic development stages of *P. h. capitis* while confirming the morphological characteristics of medium and late eggs presented in previous reports (Cueto et al., 2006; Nuttall, 1917). Furthermore, we propose additional biomarkers (e.g., the presence of the mouth primordium, spiracles and antennae, the development of tarsal claws, and the proportion of the egg occupied by the embryo) to facilitate the differentiation between stages. These morphological characteristics appear between days 3–4 (medium egg) and 5–7 (late egg) post-oviposition (Nuttall, 1917). In this context, it should be noted that the development and hatching rate of the eggs is influenced by the environmental conditions (e.g., temperature and relative humidity), with registered variations dependent on the conducted experiments (Nuttall, 1917; Sonnberg et al., 2014; Al-marjan et al., 2015; Devore & Schutze, 2015). Due to the lack of a standardized in vitro system for the breeding of head lice, morphological markers of embryonic development are a better reference regardless of the age of the eggs.

Like any study, this work is not devoid of weaknesses, such as the possible bias of information concerning the origin and transport of the samples. As for the origin, we could not collect more data on the environmental and individual variables of the parasitized participants due to the low number of cases. Regarding the transport, after reviewing all transport phases, we found no justification for the presence of these defective/non-viable eggs.

Research on ovicidal activity has made it necessary to update the morphological characteristics of embryogenesis in *P. h. capitis*. Considering that susceptibility to insecticides may vary depending on the embryonic developmental stage (Sonnberg et al., 2014), this update could be useful and facilitate the standardized evaluation of new drugs with ovicidal activity. In this vein, ovicides could be classified as broad-spectrum, when interrupting the embryogenesis process at all stages, or selective-spectrum, when they intervene in specific developmental stages. The majority of studies evaluating drugs for insect control have focused on the adult or immature stage, overlooking the egg stage, resulting in an increase in insecticide resistance. Indeed, this has been observed during the recent emergence of bed bug infestation, *Cimex lectularius*, and the presence of populations resistant to pyrethroid insecticides (Gonzalez-Morales & Romero, 2019). Such resistance has been also documented in insects like triatomine bugs (Fabro et al., 2012). In agriculture plagues, resistance to common insecticides has increased during the last eight decades (Pérez et al., 2000; Metcalf, 1989). Although some oral medications

for human use can affect fecundity and mortality of hematophagous insects, such as *C. lectularius*, the required dosage in most studies reaches the maximum permitted concentration in plasma (Sheele et al., 2017). Therefore, our findings highlight the relevance of studying embryogenesis as a potential target for ovicidal drugs. This focus could also be applied to other insects of sanitary or agricultural interest, as a strategy for managing and controlling these populations.

The classification of embryonic developmental stages could be used as a reference for toxicological tests to facilitate the standardized evaluation of the ovicidal activity of new drugs. Our results highlight the need to delve into the description of eggs at a structural and physiological level for a better understanding of embryogenesis. Since the morphological information in the scientific literature is still limited, future studies that elaborate on relevant information concerning embryonic development are necessary for related toxicological tests.

**CAPÍTULO V. ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL PATRÓN
ECDISIAL DE *PEDICULUS HUMANUS CAPITIS* EN
EXOESQUELETOS COMBINANDO TRES TÉCNICAS
MICROSCÓPICAS DE ÚLTIMA GENERACIÓN**

5. Análisis morfológico del patrón ecdisial de *Pediculus humanus capitis* en exoesqueletos combinando tres técnicas microscópicas de última generación

5.1. Introducción

En insectos y otros artrópodos, el crecimiento físico y los cambios morfológicos están restringidos por la cutícula rígida (Roller et al., 2010). Esta limitación se supera mediante la producción periódica de un nuevo exoesqueleto cuticular que reemplaza al anterior, en un proceso denominado muda o ecdisis (Roller et al., 2010; Smith & Rybczynski, 2012). Cada etapa de desarrollo se caracteriza por la alternancia entre la alimentación y la ecdisis (Smith & Rybczynski, 2012). El desprendimiento de la cutícula vieja se divide en tres fases: pre-ecdisis, ecdisis y post-ecdisis (Truman, 2005; Dušan Žitňan & Daubnerová, 2016).

Las señales hormonales que inician este proceso conllevan un aumento de ecdisteroides que son los principales reguladores de la muda y la metamorfosis (Lozano & Belles, 2011). Estos incluyen ecdisona, 20-hidroxicdisona y otros análogos de ecdisona hidroxilados, así como la hormona juvenil que inhibe estos cambios dependiendo de la especie de insecto (Lozano & Belles, 2011). Los ecdisteroides actúan directamente sobre neuronas específicas del sistema nervioso central (Žitňan et al., 2003). La regulación endocrina de la metamorfosis y la ecdisis ha sido documentada en varios insectos holometábolos como *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, y *Bombyx mori* (Žitnan & Adams, 2012).

En modelos de insectos, la pre-ecdisis consiste en contracciones de numerosos músculos que aflojan, anclan y abren la cutícula vieja (Žitnan & Adams, 2012). En los grillos adultos, esto comienza con el acicalamiento, la locomoción y las flexiones, y luego se acompaña de contracciones longitudinales sincrónicas del abdomen para aflojar y abrir la vieja cutícula a lo largo de la línea ecdisial dorsal (Žitnan & Adams, 2012). La línea ecdisial representa ciertas regiones de la cutícula externa que no se cruzan y, por lo tanto, son puntos débiles y fáciles de romper de donde emerge el insecto (Truman, 2005). La post-ecdisis se asocia con la expansión y endurecimiento de la nueva cutícula (Žitnan & Adams, 2012). Sin embargo, en las cucarachas (Dictyoptera: Blattodea), la expansión de la nueva cutícula comienza durante la pre-ecdisis (Truman, 2005).

Después de la etapa de huevo y antes de la edad adulta, hay tres etapas de ninfa seguidas de tres etapas de muda, respectivamente (Nuttall, 1917; Durden, 2019). La ecdisis ha sido descrita en piojos del cuerpo y documentada con iconografías (Nuttall, 1917). Fisiológicamente consiste en una división longitudinal del exoesqueleto a lo largo del tórax hasta el vértice de la cabeza. Inicialmente, la parte posterior del tórax sobresale. Luego, el primer par de patas presiona hacia abajo y ayuda a liberar la cabeza. Finalmente, aparecen el segundo y tercer par de patas y eliminan la muda empujándola hacia atrás (Nuttall, 1917). A pesar de la descripción detallada de Nuttall en 1917, todavía existe un vacío en la literatura sobre la descripción de este proceso mediante técnicas de microscopía de última generación. Hasta donde sabemos, a diferencia del caso de los insectos holometábolos, no existen estudios que investiguen la ecdisis en los piojos humanos a nivel morfológico o fisiológico.

El presente estudio analiza la morfología de exoesqueletos mudados naturalmente del piojo de la cabeza *P. h. capitis*. El objetivo es aportar evidencia del patrón ecdisial de *P. h. capitis* en diferentes etapas de desarrollo en función de sus exoesqueletos. Usando SM, CLSM y SEM, proporcionamos datos morfológicos relevantes sobre la ecdisis en los piojos de la cabeza. Esta información servirá como línea de base para futuros estudios sobre la caracterización fisiológica y regulación del desarrollo en insectos hemimetábolos.

5.2. Material y métodos

5.2.1. Especímenes

Se analizaron ejemplares de *P. h. capitis* que consistieron en 914 ninfas y 11 exoesqueletos de muda natural. Las muestras se prepararon según la metodología utilizada por el Área de Microscopía del SCSIE de la Universidad de Valencia.

5.2.2. Microscopía estereoscópica

Primero, las 914 ninfas y los 11 exoesqueletos fueron identificados y separados de acuerdo a su etapa de desarrollo, clasificándolos como ninfa I, ninfa II y ninfa III (Keilin

& Nutall, 1930). Se utilizaron objetivos de 0.75× y 7.5× para visualizar las muestras después de ajustar el enfoque y la iluminación para cada espécimen. Se tomaron fotografías de cuerpo entero de los especímenes. Todas las muestras se volvieron a almacenar en tubos Eppendorf con fijador Karnovsky.

5.2.3. Microscopía de barrido láser confocal

Se montó un exoesqueleto de etapa III en una placa de Petri con fijador de Karnovsky para evitar la deshidratación. Se utilizó un microscopio de barrido láser confocal Olympus FV1000-IX81 (Olympus Corporation, Tokio, Japón) con un objetivo de 10x. Utilizando la autofluorescencia de la muestra, se escaneó la parte ventral de la muestra con los láseres correspondientes al azul, verde y rojo. La imagen adquirida es una fusión de todos los canales (azul, verde y rojo). Se tomó una única imagen de la zona ventral del exoesqueleto.

5.2.4. Microscopía electrónica de barrido

Se retiraron dos exoesqueletos de la etapa III del fijador de Karnovsky y se lavaron en una solución tampón de fosfato durante 3 horas a 22 ± 1 °C. Las muestras se prepararon para su posterior observación por microscopía electrónica de barrido, como se describió en las secciones **2.5.3, 2.5.3.1**.

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido Hitachi S4800. Se adquirieron imágenes de especímenes completos e imágenes del sistema traqueal con una resolución de 1280 × 960 píxeles. Mas detalles de la metodología se describen en las secciones **2.4, 2.5, 2.5.1, 2.5.2, 2.5.3, 2.5.3.1, 2.6**.

5.3. Resultados

Según lo evaluado con SM, entre las ninfas de *P. h. capitis* (N = 914), 266 se clasificaron como ninfa I, 332 como ninfa II y 316 como ninfa III. En cuanto a los exoesqueletos (N = 11), uno era compatible con la ninfa I (**Fig. 23a, b**), siete con la ninfa II (**Fig. 23c, d**) y tres con la ninfa III (**Fig. 23e, f**).

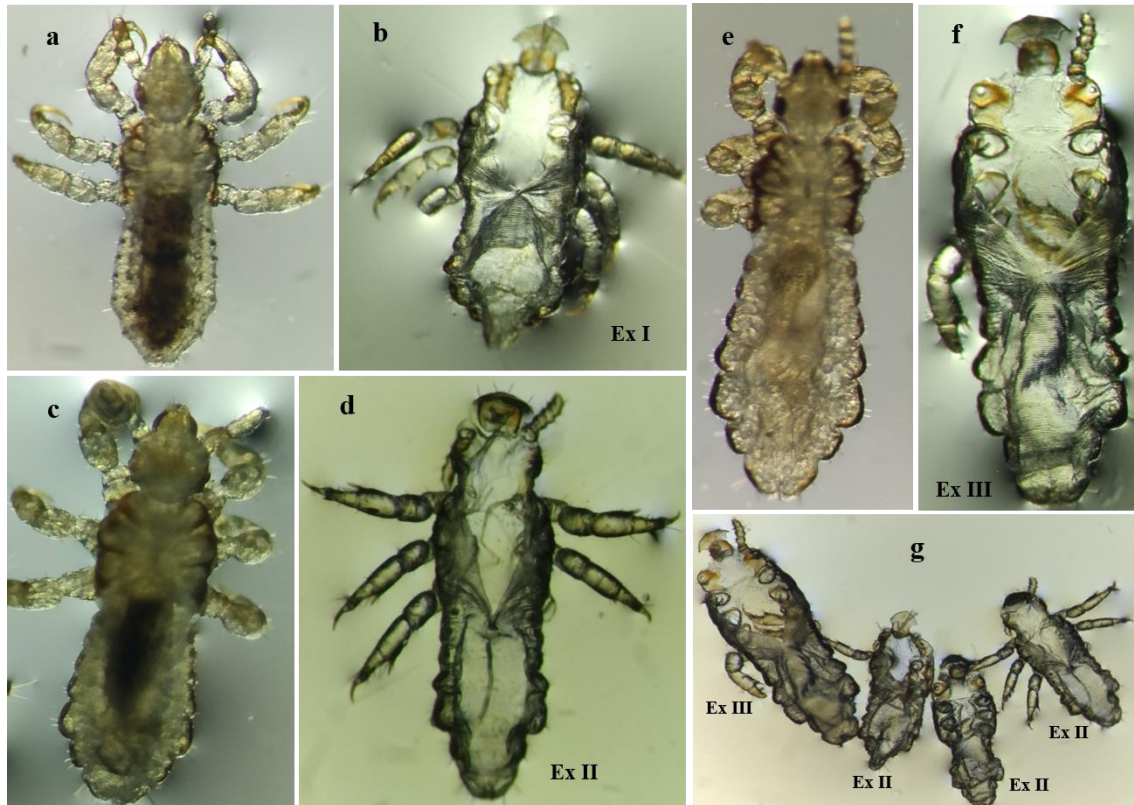


Fig. 23. Morfología comparativa de las etapas de desarrollo y exoesqueletos de *P. h. capitis* observados bajo SM (a) Ninfa I. (b) Exoesqueleto I. (c) Ninfa II. (d) Exoesqueleto II. (e) Ninfa III. (f) Exoesqueleto III. (g) Comparación de los tamaños de los exoesqueletos Nymph II y III. Abreviaturas: Ex I, exoesqueleto I; Ex II, exoesqueleto II; Ex III, exoesqueleto III.

5.3.1. Descripción de las ninfas

En general, todas las ninfas presentaron cabeza, tórax y abdomen. En la cabeza eran visibles el aparato bucal, las antenas y los ojos. En el tórax estaban presentes los tres pares de patas y en el abdomen se observaban seis segmentos (del III al IX) y seis pares de espiráculos, aunque menos visibles en el estadio de ninfa I (Fig. 24a-c). En 17 ninfas (NI=3, NII=7 y NIII=9), el exoesqueleto estaba levemente dilatado en la región abdominal, hallazgo que fue más evidente en el segmento IX de los ejemplares de ninfa III. Esta dilatación permitió distinguir la formación de la nueva cutícula del antiguo exoesqueleto. No se encontraron genitales externos desarrollados. Sin embargo, en 7 ejemplares de ninfa III, la expansión del exoesqueleto permitió por primera vez observar diferenciación genital en machos y hembras, incluso sin muda completa (Fig. 24c).

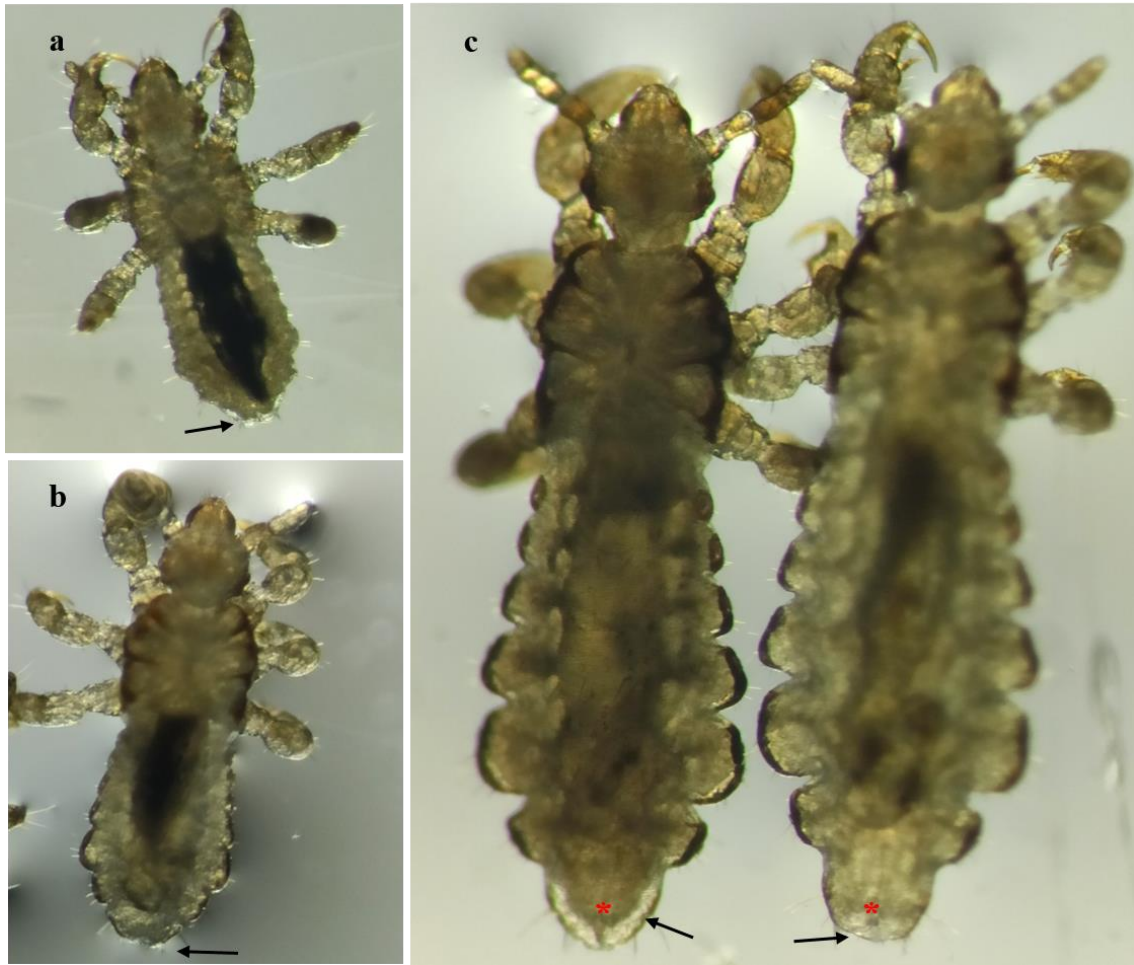


Fig. 24. Morfología de las etapas ninfales de *P. h. capitis* observadas bajo SM. (a) Ninfa I y (b) ninfa II en la etapa inicial de expansión del exoesqueleto (flecha). (c) Dos especímenes de ninfa III en la etapa inicial de expansión del exoesqueleto (flecha), donde la diferenciación sexual es evidente. A la izquierda se ven los genitales externos masculinos, mientras que a la derecha se observan los genitales externos femeninos (*).

5.3.2. Descripción del exoesqueleto

En los especímenes de exoesqueleto de todos los estadios ninfales (I, II y III), se identificaron tres áreas correspondientes a la cabeza, tórax y abdomen. La cabeza y el tórax se expandieron lateral y verticalmente. Según lo evaluado con SM, todos los exoesqueletos se caracterizaron por una tonalidad translúcida y refractiva con un tono marrón en las áreas de las antenas y las patas. Mediante SM y CLSM, cuatro especímenes presentaron estructuras completas, mientras que los otros siete presentaron solo cavidades y estructuras como la coxa y el escapo (**Fig. 25a-f**).

5.3.3. Patrón de ecdisis

La Fig. 24a-c muestran la expansión abdominal en el estadio de ninfa III, donde es visible la separación de la cutícula nueva y la vieja. En todos los especímenes se observó una abertura dorsal desde la cabeza hasta el metatórax (Fig. 25a, b, d). En la parte dorsal del exoesqueleto faltaba la zona correspondiente a la cabeza (Fig. 25b, d). En algunos especímenes se identificaron parte de estructuras como el occipucio y epicráneo, pero en otros solo se reconoció una pieza aplanada en forma de punta de lanza, correspondiente a la parte ventral de estas estructuras (Fig. 25b). Mediante CLSM se observó ventralmente un espécimen, en el que se reconoció el clípeo y el haustelo (Fig. 25f).

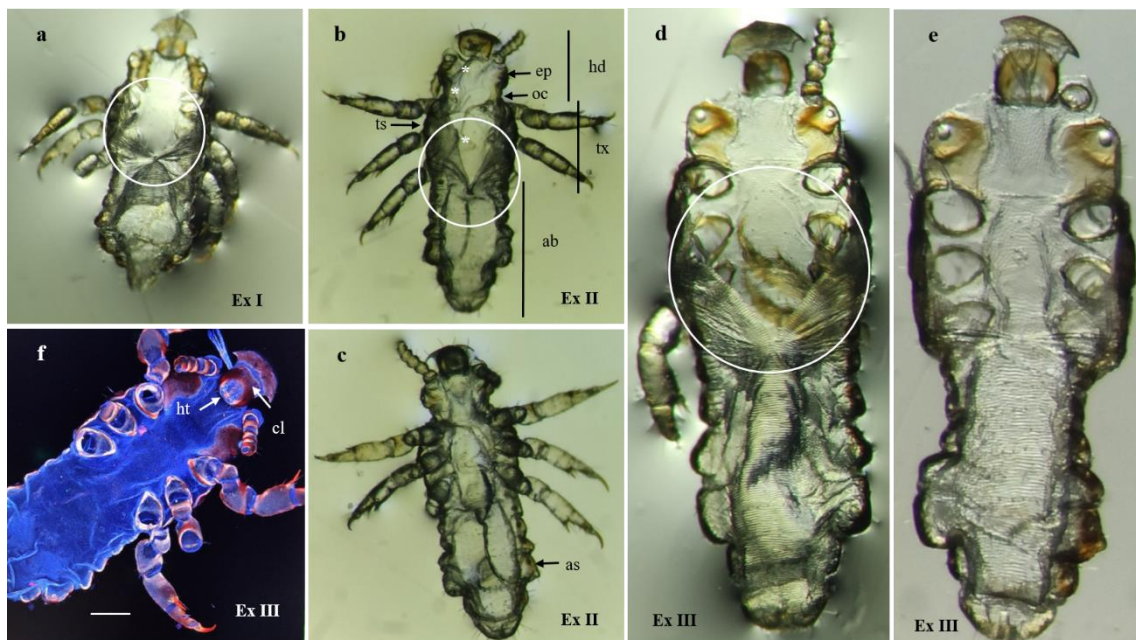


Fig. 25. Morfología de exoesqueletos de *P. h. capitis*. (a- e) Observados bajo SM y (f) CLSM. (a) Vista dorsal de un exoesqueleto en etapa I (Ex I), donde se puede observar la abertura ecdisial dentro del círculo. (b) Vista dorsal de un exoesqueleto en etapa II (Ex II), donde la cabeza (hd), el tórax (tx), el abdomen (ab), el epicráneo (ep), el occipucio (oc), el espiráculo torácico (ts), partes de se observa el sistema traqueal (*) y la abertura ecdisial (círculo). (c) Vista ventral de un exoesqueleto en etapa II (Ex II), que presenta los espiráculos abdominales (as). (d) Vista dorsal de un exoesqueleto en etapa III (Ex III), con los espiráculos y la abertura ecdisial (círculo). (e) Vista ventral de un exoesqueleto en etapa III (Ex III). (f) Vista ventral de un exoesqueleto en etapa III, que presenta el clípeo (cl) y el haustelo (ht); la barra de escala representa 100 μm .

En la línea dorsal medial del tórax se observó una abertura que se extendía lateralmente al protórax, sin traspasar sus límites. La abertura seguía la línea medial hacia la parte posterior, estrechándose a lo largo del mesotórax hasta llegar al metatórax, donde terminaba en el vértice. Había una solapa a cada lado de la abertura, parecida a una

cremallera (**Figs. 25a, b, d, 26a**). En la parte ventral de los ejemplares no se observó división inducida por muda (**Fig. 25c, e, f**).

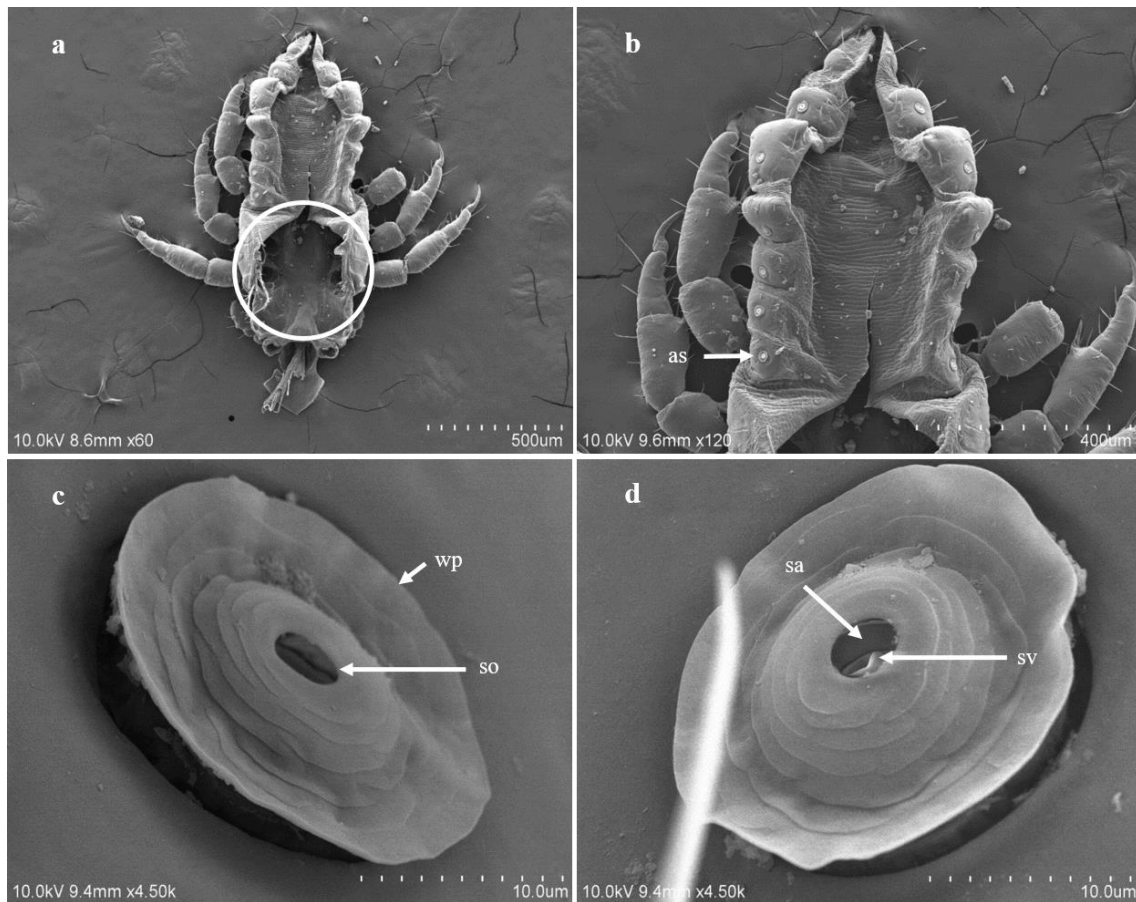


Fig. 26. Sistema respiratorio adherido a exoesqueleto de etapa III de *P. h. capitis*, observado bajo SEM. **(a)** Microfotografía de todo el cuerpo del espécimen que muestra la apertura ecdisial (círculo). **(b)** Se puede observar el abdomen y los seis pares de espiráculos abdominales (as). **(c, d)** La morfología de los espiráculos abdominales desde el exterior hacia el interior. El peritrema ondulado concéntrico (wp), el orificio espiracular (so), el atrio espiracular (sa) y la válvula espiracular (sv) son visibles.

5.3.4. Sistema respiratorio

Parte del sistema respiratorio, compuesto por espiráculos torácicos y abdominales, tráqueas y traqueolas, estaba adherido al exoesqueleto. Según lo evaluado por SEM, estaban presentes seis pares de espiráculos abdominales, un espiráculo a cada lado de los segmentos abdominales III a VIII. En los espiráculos destacaba un peritrema circular con formas onduladas concéntricas a modo de roseta. Dentro del orificio circular de los espiráculos se observó el atrio y una estructura lisa que correspondía a una válvula espiracular (**Fig. 26b-d**). No se encontraron setas ni dentro ni fuera de los espiráculos.

Confirmamos la morfología de algunas tráqueas y traqueolas horizontales en la región torácica (**Fig. 27a, b**). Las tráqueas, donde estaban presentes las taenidias, eran tubos de mayor diámetro interno que las traqueolas. Por el contrario, las traqueolas eran tubos que se originaban en la tráquea con un diámetro interno pequeño (**Fig. 27c-d**).

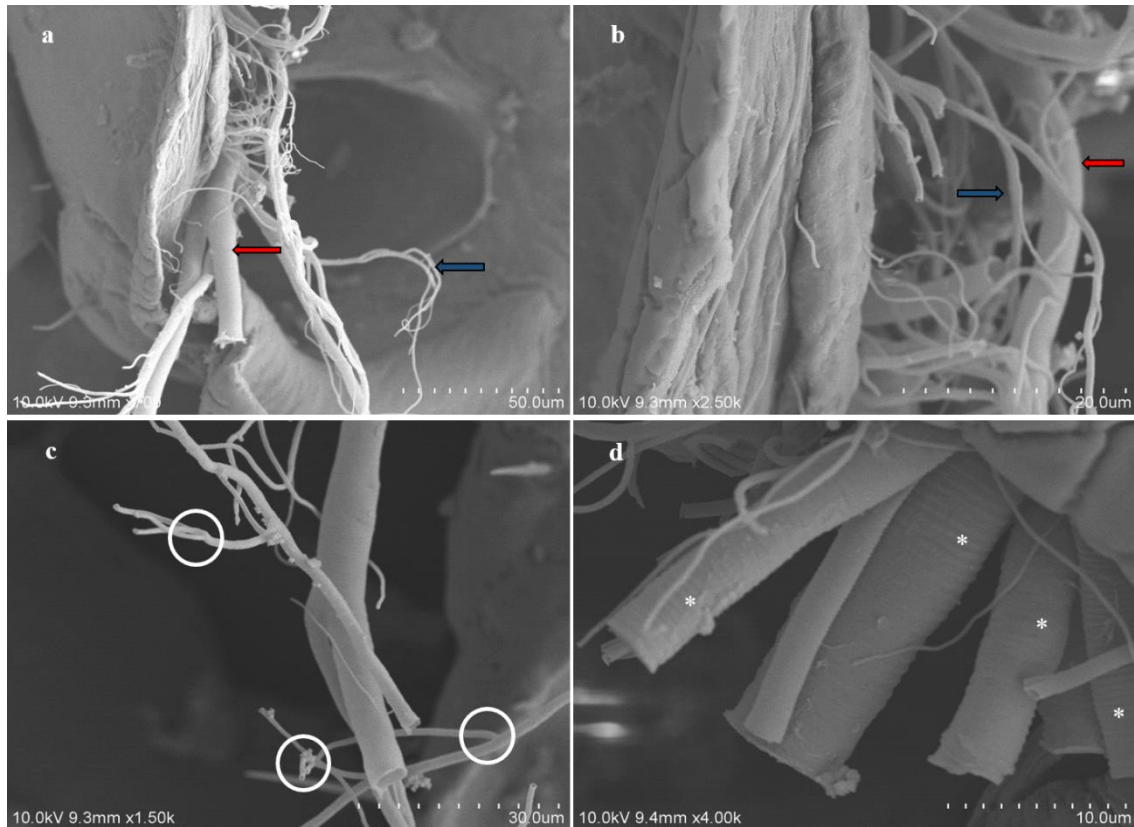


Fig. 27. Tráqueas y traqueolas en un exoesqueleto en etapa III de *P. h. capitis* observadas bajo SEM. **(a, b)** Vista dorsal del tórax, donde se aprecian las tráqueas (flecha roja) y las traqueolas (flecha azul). **(c)** Origen de las traqueolas (círculo). **(d)** Ampliación de las tráqueas donde se aprecian tenidios (*) en forma de espiral.

5.4. Discusión

En el presente capítulo, describimos la morfología de las ninfas de *P. h. capitis* y sus exoesqueletos mudados naturalmente. La dilatación inicial del segmento IX abdominal nos permitió evidenciar por primera vez la diferenciación genital temprana en ninfas III de *P. h. capitis*. Aparentemente, este fenómeno les permitirá estar fisiológicamente listos para copular tan pronto como se desprendan de su exoesqueleto.

La expansión de los exoesqueletos, principalmente en las áreas correspondientes a la cabeza y el tórax, sugiere que las ninfas de *P. h. capitis* desarrollan y expanden la nueva

cutícula durante la pre-ecdisis, lo que provoca la expansión del antiguo exoesqueleto que aún conservan. Esto genera la presión necesaria para romper la línea ecdisial y que la ninfa emerja. Este mecanismo concuerda con lo descrito previamente en cucarachas (Truman, 2005). Sin embargo, esta es la primera vez que se evidencia morfológicamente este fenómeno en *P. h. capitis*. El patrón de ecdisis fue consistente en todas las muestras y confirma que los piojos de la cabeza pasan de una etapa de desarrollo ninfal a la siguiente al iniciarse la muda en el área dorsal de la cabeza y el tórax.

Utilizando SM y CLSM se confirmó que además de las patas, otras estructuras más finas de la cabeza como el occipucio, epicráneo, clépeo y el haustelo, acompañan a la vieja cutícula.

El análisis por SEM también confirmó que en cada etapa de ecdisis, los espiráculos, las tráqueas y las traqueolas se adhirieron al exoesqueleto antiguo. La presencia de espiráculos torácicos y el grado de conservación de las estructuras peritrema, atrio y las válvulas de los espiráculos abdominales confirmaron que estas estructuras se mudan completamente durante la ecdisis. El reemplazo de los revestimientos de la cutícula del sistema traqueal durante la muda se ha observado previamente en insectos holometábolos (Truman, 2005; Snelling et al., 2011).

La principal diferencia entre las tráqueas y las traqueolas es el tamaño, teniendo estas últimas un diámetro interno inferior a 2 μm (Snelling et al., 2011) y originadas en las tráqueas más grandes. Aunque en los insectos, las tráqueas y las traqueolas presentan taenidias y micro-taenidias, respectivamente (Snelling et al., 2011), aquí solo observamos taenidias en las tráqueas. Se requieren estudios de microestructura adicionales para investigar la presencia de micro-taenidias en las traqueolas.

La apertura simétrica que se encuentra en todos los exoesqueletos de las etapas ninfales I, II y III sugiere que el procedimiento de ecdisis no es aleatorio y depende de la línea ecdisial que conduce con éxito a un patrón consistente de moldeado. Sin embargo, sería interesante estudiar el patrón de apertura ecdisial en otros piojos del orden Phthiraptera y posteriormente entre otros insectos hemimetábolos para establecer similitudes y variaciones entre ellos.

**CAPÍTULO VI. PREVALENCIA DE PEDICULOSIS
CAPITIS EN ESTUDIANTES DE UNA ESCUELA
PRIMARIA DE CHILPANCINGO, GUERRERO, MÉXICO**

6. Prevalencia de pediculosis capitis en estudiantes de una escuela primaria de Chilpancingo, Guerrero, México

6.1. Introducción

La pediculosis capitis (PC) se ha documentado desde la antigüedad y sigue siendo una infestación muy extendida en el mundo (Gulgun et al., 2013). En muchos países desarrollados existe un estigma significativo, ocasionando que los niños sean marginados por sus amigos, escuelas y otros eventos sociales (Devore & Schutze, 2015). Es poco probable prevenir todas las infestaciones por piojos ya que los niños pequeños están en contacto frecuentemente (Devore & Schutze, 2015) y aun teniendo la infección, posiblemente no lo sepan debido a la alta tolerancia al parásito que conduce a la ausencia de síntomas (Paredes et al., 1997).

Aunque la prevalencia es mayor en niñas y niños, en los países en vías de desarrollo también los adultos pueden estar infestados (Birkemoe et al., 2016), siendo las madres de familia las más afectadas ya que con frecuencia son las encargadas de examinar y tratar a las niñas y niños infestados (Mumcuoglu et al., 1990).

La afectación por piojos es un proceso dinámico que puede propagarse híper geoméricamente en entornos cerrados como las escuelas y comunidades (Falagas et al., 2008). El contacto con una persona infestada, compartir ropa, cepillos para el cabello, sombreros, toallas u otros artículos personales (Djohan et al., 2020), así como el hacinamiento facilita la transmisión de la pediculosis (Gulgun et al., 2013). Las infestaciones ocurren independientemente del estado socioeconómico (Falagas et al., 2008; Dehghanzadeh et al., 2015) sin embargo, este factor parecen ser un indicador de la magnitud de la infestación (Falagas et al., 2008).

En países de América Latina como Chile, se han encontrado prevalencias 55,2 % y 23 % en niñas y niños de 7 a 12 años respectivamente (Gazmuri B. et al., 2014) y para Argentina, que la prevalencia general fue del 61,4 % (niñas: 79 %; niños: 44 %) en niños de 6 a 8 años (Catalá et al., 2005). En México, se han reportado prevalencias 28 % (niños) y de 33,7 % (niñas), en Nuevo León (Molina-Garza & Galaviz-Silva, 2017). Para el estado de Guerrero, Paredes et al. (1997) informaron una prevalencia del 22% en niños escolares (Paredes et al., 1997). Sin embargo, la información epidemiológica en México sigue siendo escasa y en general desactualizada. El objetivo de este trabajo es determinar

la prevalencia y los factores de riesgo asociados con la pediculosis capitis en estudiantes de una escuela pública en la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, México.

6.2. Material y métodos

6.2.1. Población de estudio y protocolo

El presente estudio es un diseño de tipo transversal, descriptivo. El criterio de inclusión fueron todos los estudiantes matriculados en el turno matutino menores de 14 años, a los que sus padres firmaron la autorización para la realización de este estudio (N = 656). De una escuela primaria. El criterio de exclusión fueron todos los estudiantes que no quisieran participar en el estudio.

Del total de la matrícula (N = 656), se excluyeron 193 estudiantes por no tener disposición de participar, no presentar el consentimiento autorizado o por no haber asistido a clases.

Se incluyeron en el estudio 463 estudiantes de 7 a 14 años que cumplieron con el criterio de inclusión. Los padres/tutores de los participantes recibieron y contestaron un cuestionario diseñado, a tal fin “add hoc”, para recopilar información que permitió recoger información de tipo epidemiológica.

El cuestionario constaba de 22 preguntas que estaban dirigidas a conocer información sociodemográfica, socioeconómica, prevalencia de la pediculosis en los niños, hábitos de higiene personal de los niños y la composición familiar, así como los posibles factores que influyen en la distribución de la pediculosis. Así como se realizó una recogida de muestras de pelo parasitado, lo que permitió analizar el tipo de cabello y el parásito. Este estudio se consideró anónimo, mediante un sistema de codificación alpha-numérico que nos permitía vincular la información recogida mediante encuesta a padres y niños con la muestra de pelo parasitado recogido, este sistema no permitió identificar directa o indirectamente a los participantes. La metodología más detallada se describe en la sección 2.1.

6.2.2. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software SPSS versión 26.0. Las variables categóricas se describieron como frecuencias absolutas y porcentajes, y las variables

cuantitativas como medias y desviaciones estándar (DE). Para el análisis comparativo se utilizó la prueba chi-cuadrado o exacta de Fisher en variables categóricas, y la prueba t en variables cuantitativas para comparar variables cualitativas se utilizó la prueba chi-cuadrado y para comparar variables cuantitativas se utilizó la prueba ANOVA. Se calculó la Odds Ratio (OR) y el intervalo de confianza del 95 % del riesgo de infestación. $P < 0,05$ se consideraron significativos. Para encontrar una asociación entre variables categóricas se utilizó el método de crecimiento de CHAID.

6.3. Declaración ética y consentimiento para participar

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad Autónoma de Guerrero, México. Se obtuvo el consentimiento informado de los padres antes de que sus hijos participaran en el estudio y también se requirió el consentimiento verbal de los niños (más detalles en la sección **2.7**).

6.4. Resultados

La muestra final fue de 463 estudiantes, 110 niños (48,5 %) y 117 niñas (51,5 %), $p > 0,05$, sin diferencia significativa en cuanto a la participación según género. El número de niños que declararon sufrir PC en los últimos 12 meses fue de 126 (prevalencia de 50,6 niños por cada 100 estudiados en los últimos 12 meses), 19 niños y 107 niñas, frente a 232 (prevalencia de 49,4 niños por cada 100 estudiados en algún momento de su vida), 66 niños y 166 niñas, que la padecieron hace más de 12 meses. Hubo predominio de niñas sobre niños, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,001$) (**Tabla 4**).

Además, en cuanto a características del cabello, el riesgo de PC fue mayor en aquellos que tenían el cabello color castaño oscuro (34,4 %) ($p = 0,002$) y longitud, de medio (40,6 %) a largo (40,5 %) ($p = 0,001$). Para el tipo de cabello, el riesgo fue mayor en cabello seco (66,7 %) y cabello ondulado y grasoso. La frecuencia de lavados en el cabello, la presencia de alergias, asma, y la convivencia con animales no estuvo relacionado con la PC. Los problemas capilares como dermatitis y la presencia de hongos parece aumentar el riesgo de PC ($p = 0,001$).

La PC estuvo más relacionada con la adquisición en la escuela y con el uso de cepillos para el cabello infestados. Las infestaciones de PC en otros miembros de la familia y la edad de la madre (menores de 30 años) aumentó el riesgo ($p = 0,001$).

El nivel educativo y el sector profesional de los padres/tutores tampoco mostraron relación con la PC. Sin embargo, los niños con madres menores de 30 años, presentaron mayor presencia de PC y a medida que aumentó la edad de la madre, la frecuencia de infestación disminuyó (**Tabla 4**).

Se realizó un árbol de decisiones por el método de crecimiento de CHAID como modelo predictivo de la PC (**Fig. 28**). Para ello se utilizó como variable dependiente la presencia de piojos en los últimos 12 meses, se recogieron todas las variables independientes (**Tabla 5**) y se interrelacionaron para detectar un mayor poder de predicción. Debido al tamaño de la muestra, el modelo se ajustó por Bonferroni.

Se encontraron tres predictores estadísticamente significativos; en primer lugar la variable más predictora es tener casos en la familia (nodo 1), la segunda es el sexo (ser niña) (nodo 3) y la tercera es la edad de la madre, en las que tener una madre con menos de 30 años representó mayor riesgo (nodo 5) (**Fig. 28**). Combinando las variables más predictivas como es tener casos en la familia, el género y la edad de la madre podemos predecir la presencia de PC en un 84,9 % (**Tabla 6**).

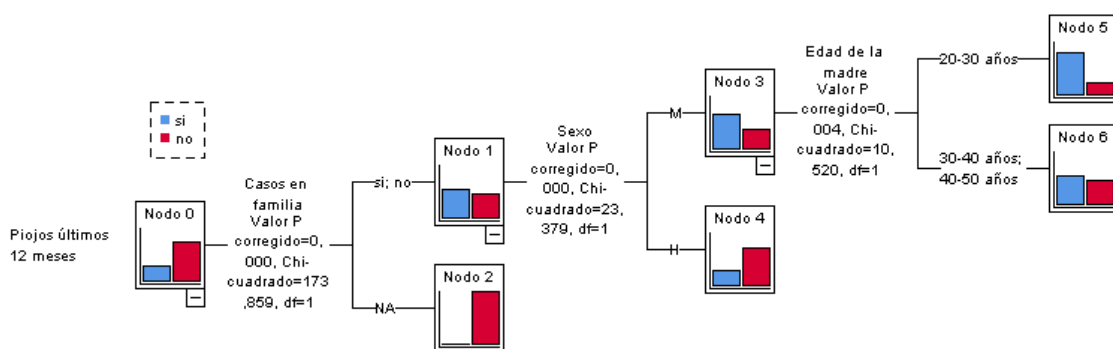


Fig. 28. Árbol de clasificación por el método de CHAID.

Sample (n 463)												
		<i>Pediculosis never</i>			<i>Pediculosis in the last year</i>				<i>Pediculosis more than 12 months ago</i>			
		(230, 49,7%)			(126, 26.8%)				(232, 49.4%)			
Characteristics		No. of examination	Prevalence (%)	p-Value *†	No. of examination	No. of infestations	Prevalence (%)	p-Value *†	No. of examination	No. of infestations	Prevalence (%)	p-Value *†
Sex	Boys	66	32,5	0,001	203	19	9,4	0,001	203	66	32,5	0.001
	Girls	167	64,2		260	107	41,2		260	166	63,8	
Age	< 8 years old	99	45,6	0,063	217	65	30,00%	0,25	217	98	45,2	0.051
	> 8 years old	134	54,5		246	61	24,80%		246	134	54,5	
Hair color	Black	78	39,2	0.001	199	38	19,1	0,002	199	77	38,7	0.001
	Dark brown	130	58,0		224	77	34,4		224	130	58	
	Light brown	25	62,5		40	11	27,5		40	25	62,5	
	Blonde	0	0		0	0	0		0	0	0	
	Other	0	0		0	0	0		0	0	0	
Hair length	Short	114	41,0	0.001	278	51	18,3	0,001	278	113	40,6	0.001
	Medium	89	62,2		143	58	40,6		143	89	62,2	
	Long	30	71,4		42	17	40,5		42	30	71,4	
Hair type	Straight	174	47,5	0.062	366	86	23,5	0,001	336	173	47,3	0.057
	Curly	18	60,0		30	9	30		30	18	60	
	Wavy and oily	38	59,4		64	29	45,3		64	38	59,4	
	Dry	3	100.0		3	2	66,7		3	3	100.0	
Hair problems	Dermatitis	6	85,7	0,022	7	6	85,7	0,001	7	6	85,7	0.021
	Malassezia	0	0		0	0	0		0	0	0	
	Mushrooms	22	66,7		33	12	36,4		33	22	66,7	
	Keloid folliculitis nape	0	0		0	0	0		0	0	0	
	Ringworm	0	0		0	0	0		0	0	0	
	Other	0	0		0	0	0		0	0	0	
	None	205	48,5		423	108	25,5		423	204	48,2	
Frecuency of hair washing	Once a week	11	73,3	0,143	15	5	33,3	0,584	15	11	73,3	0,137
	Twice a week	10	54,8		17	3	17,6		17	10	58,8	
	Three times or more per week	212	49,2		431	118	27,4		431	211	49	
Allergies	Yes	30	54,5	0,566	55	14	25,5	0,872	55	30	54,5	0.566
	None	203	49,8		408	112	27,5		408	202	49,5	

Asthma	Yes	5	55,6	0,508	9	4	44,4	0,263	9	5	55,6	0,999
	None	228	50,2		454	122	26,9		454	227	50	
Live with animals	Yes	163	49,8	0,750	327	85	26	0,362	327	163	49,8	0,919
	None	70	51,5		136	41	30,1		136	69	50,7	
Animals Type	Dogs	160	49,8	0,376	321	82	25,5	0,094	321	160	49,8	0,387
	Cats	3	75,0		4	1	75		4	3	75	
	Others (farm)	0	0		2	0	0		2	0	0	
Where you think acquired parasitazion	School	NA			193	104	53,9		193	192	99,5	0,001
	Travel	NA			3	0	0,0		3	3	100,0	
	Public pool	NA			5	0	0,0		5	5	100,0	
	Private pool	NA			4	2	50,0	0,001	4	4	100,0	
	Relatives	NA			17	8	47,1		17	17	100,0	
	Uses of brushes infested	NA			9	7	77,8		9	9	100,0	
Are there more cases in the family / close environment?	Yes	NA			116	66	56,9		0,001	116	116	100,0
	None	NA			115	60	52,2	115		114	99,1	
Age of parent or guardian	20 -30 years	57	52,3	0,179	109	35	32,1	0,167	109	56	51,4	0,191
	30 -40 years	126	47,0		268	64	23,9		268	126	47	
	40 -50 year	50	58,1		86	27	31,4		86	50	58,1	
Level of studies parent / legal guardian	Primary	55	45,1	0,070	122	33	27	0,714	122	55	45,1	0,07
	Secondary	59	61,5		96	28	29,2		96	59	61,5	
	Bachelor / training	10	66,7		15	6	40		15	10	66,7	
	professional Education higher or graduate	72	51,4		140	37	26,4		140	72	51,4	
Professional sector's father	Home	13	48,1	0,916	27	6	22,2	0,433	27	13	48,1	0,916
	Primary (worker, driver)	62	55,4		112	31	27,7		112	62	55,4	
	Secondary (businessman)	33	54,1		61	15	24,6		61	33	54,1	
	Tertiary (government, education)	87	52,7		165	55	33,3		165	87	52,7	

Age of mother or guardian	20 -30 years	83	52,9	0,602	157	59	37,6	0,001	157	82	52,2	0,661
	30 -40 years	127	48,3		263	59	22,4		263	127	48,3	
	40 -50 year	23	50,3		43	8	18,6		43	23	53,5	
Level of studies mother/legal guardian	Primary	60	53,1	0,996	113	31	27,4	0,445	113	60	53,1	0,996
	Secondary	62	53,0		117	38	32,5		117	62	53	
	Bachelor / training professional	4	50,0		8	2	25		8	4	50	
	Education higher or graduate	76	53,9		141	33	23,4		141	76	53,3	
Professional sector's mother	Home	80	47,3	0,225	169	41	24,3	0,092	169	80	47,3	0,225
	Primary (worker, driver)	36	58,1		62	22	35,5		62	36	58,1	
	Secondary (businessman)	48	55,8		86	22	25,6		86	48	55,8	
	Tertiary (government, education)	39	60,0		65	25	38,5		65	39	60	
If the school advises them that there are lice in general, Do you treat your child in a preventive?	Yes	227	50,8	0,598	447	120	26,8	0,222	447	226	50,6	0,384
	None	6	42,9		14	6	42,9		14	6	42,9	
In case of treatment, What product has used?	Shampoo	160	51,8	0,781	309	80	25,9	0,427	309	159	51,5	0,783
	Lotion	27	55,1		49	18	36,7		49	27	55,1	
	Foam	2	33,3		6	2	33,3		6	2	33,3	
	Other (vinegar)	44	50,6		87	26	29,9		87	44	50,6	
Do you use a comb?	Yes	155	53,1	0,671	292	84	28,8		292	154	52,7	0,4
	None	63	50,8		124	34	27		124	63	50,8	

Tabla 5. Factores socioeconómicos de la pediculosis capitis. * p- Value < 0.05 considerada estadísticamente significativa (prueba de Fisher bilateral).

†Comparación entre diferentes opciones. ‡Comparación entre prevalencia en el último año vs pediculosis de más de un año.

<i>Tabla de árbol</i>													
Nodo	Si		No		Total		Categoría pronosticada	Nodo padre	Variable	Variable independiente primaria			
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje				Sig. ^a	Chi-cuadrado	gl	Valores de división
0	126	27,2%	337	72,8%	463	100,0%	No						
1	126	54,5%	105	45,5%	231	49,9%	Si	0	Casos en familia	,000	173,859	1	Sí; No
2	0	0,0%	232	100,0%	232	50,1%	No	0	Casos en familia	,000	173,859	1	NA
3	107	64,5%	59	35,5%	166	35,9%	Si	1	Sexo	,000	23,379	1	M
4	19	29,2%	46	70,8%	65	14,0%	No	1	Sexo	,000	23,379	1	H
5	53	79,1%	14	20,9%	67	14,5%	Si	3	Edad de la madre	,004	10,520	1	20-30 años
6	54	54,5%	45	45,5%	99	21,4%	Si	3	Edad de la madre	,004	10,520	1	30-40 años 40-50 años

Tabla 6. Tabla de árbol. Método de crecimiento CHAID. Variable dependiente: Piojos últimos 12 meses.

^a Bonferroni ajustado

<i>Riesgo</i>	
Estimación	Desv. Error
,168	,017

Método de crecimiento: CHAID
Variable dependiente: Piojos últimos 12 meses

<i>Clasificación</i>			
Observado	Pronosticado		
	Si	No	Porcentaje correcto
Si	107	19	84,9%
No	59	278	82,5%
Porcentaje global	35,9%	64,1%	83,2%

Método de crecimiento: CHAID
Variable dependiente: Piojos últimos 12 meses

Tabla 7. Porcentaje de predicción de la pediculosis.

Resumen del modelo	
Método de crecimiento	CHAID
Variable dependiente	Piojos últimos 12 meses
Variables independientes	Edad, Sexo, Nacionalidad, Color cabello, Longitud cabello, Tipo cabello, Problemas capilares, Alergias, Asma, Días lavado cabello, Convivencia animales, Tipo de animales, Adquisición piojos, Casos en familia, Edad del padre, Nivel de estudios padre, Sector profesional padre, Edad de la madre, Nivel estudios madre, Sector profesional madre, Da tratamiento preventivo, Tratamiento utilizado, Uso peine lendrera
Validación	Ninguna
Máxima profundidad del árbol	3
Casos mínimos en nodo padre	100
Casos mínimos en nodo hijo	50
Variables independientes incluidas	Casos en familia, Sexo, Edad de la madre
Número de nodos	7
Número de nodos terminales	4
Profundidad	3

6.5. Discusión

Estudios previos muestran a la PC como una parasitosis común en niños, siendo los de edad comprendida entre 3-12 años los que suelen presentar mayor prevalencia, ya que se incrementa la posibilidad de interactuar entre sí, particularmente en la escuela (Ko & Elston, 2004). En México, la PC ha recibido poca atención, a pesar de ser una infestación recurrente en la población escolar. En este estudio realizado en Chilpancingo, Guerrero, se ha estimado una prevalencia de 50,6 % en niñas y niños que han padecido PC en los últimos 12 meses y de 49,4 % en niñas y niños que la padecieron antes de los 12 últimos meses. Un estudio anterior realizado en escuelas públicas de Acapulco, Guerrero, hace 25 años, reportó una prevalencia de 22 % (Paredes et al., 1997).

A pesar de que los trabajos de prevalencia por PC realizados en México son escasos (Molina-Garza & Galaviz-Silva, 2017), a través de medios periodísticos y televisivos se han informado brotes de piojos en jardines de niños, primarias y secundarias de Estados como Sonora, Jalisco, Nuevo León, Tamaulipas, Tabasco, Guerrero, Veracruz, Estado de México y Ciudad de México (Valle-Barbosa et al., 2017). Sin embargo, en estos brotes no existen datos estadísticos que permitan conocer la magnitud del problema (Valle-Barbosa et al., 2017).

En este sentido, se necesitan más estudios sobre PC que permitan comparar las prevalencias a nivel estatal y en el país. Por lo tanto este trabajo representa un esfuerzo por actualizar la información epidemiológica de la PC en Guerrero.

En este estudio se encontró una diferencia significativa en cuanto a sexo, donde la infestación por PC es mayor en niñas que en niños. Esto coincide con lo observado en escolares de México (Molina-Garza & Galaviz-Silva, 2017) y otros países como Chile (Gazmuri et al., 2014), Costa de Marfil (Djohan et al., 2020), Iraq (Hama-karim et al., 2022). La mayor prevalencia de PC en niñas comparada con los niños puede justificarse debido a que las niñas tienen más probabilidades de entrar en contacto cercano (AlBashtawy & Hasna, 2012).

En la mayoría de las escuelas de educación básica de México, se recomienda que los niños mantengan con el cabello corto, a diferencia de las niñas. Esta condición explica la tendencia de infestación en este estudio. En otros países, la longitud del cabello se ha señalado como factor de riesgo en la transmisión de PC (Djohan et al., 2020).

Diversos estudios ponen en relieve la importancia de la longitud del cabello en la transmisión de la PC (Rukke et al., 2014; Willems et al., 2005), pudiéndose vincular al necesario contacto entre cabeza y cabeza para la transmisión (Canyon et al., 2002) y el mayor riesgo general de que el cabello más largo entre en contacto con otros cabellos de humanos. El hecho de que las niñas tengan con más frecuencia PC que los niños (Heukelbach, 2010) también puede relacionarse con la longitud del cabello, pero las diferencias en el patrón de contacto social pueden también representar otra explicación. En estudios que combinan el sexo, la longitud del cabello y la agrupación de niños en clases, la longitud del cabello se mostró más importante que el sexo en un estudio (Willems et al., 2005) mientras que menos importante en otro (Counahan et al., 2004). El estudio efectuado por Birkemoe et al. (2016) indica que el pelo medio largo (desde la oreja al hombro) aumentan la posibilidad de tener PC más que el pelo largo. Esto indica que la longitud del cabello es más importante que sexo, ya que los chicos no suelen llevar el pelo largo mientras que el pelo medio se encuentra igualmente en ambos sexos. El pelo largo también se suele trenzar o atar en una cola de caballo, disminuyendo el riesgo de contacto de cabello a cabello en relación con pelo ligeramente más corto. El tener el cabello largo y castaño también ha sido reportado como factores de riesgo para la infestación de piojos en niños (Willems et al., 2005). De acuerdo con lo anteriormente mencionado, nuestros resultados muestran que las niñas con cabello de longitud media a larga tuvieron mayor riesgo a la infestación, en comparación con el cabello corto. Esto puede deberse, tal y como se ha comentado previamente, a que los cabellos largos favorecen el contacto entre hospedadores, lo cual facilita el paso de adultos y ninfas del piojo de un humano a otro y, por tanto, la transmisión. Además, a diferencia de los niños, las niñas tienen hábitos de convivencia más cercana entre ellas, lo que aumenta el riesgo de transmisión (Fu et al., 2022; Doroodgar et al., 2014).

La adquisición de piojos en las escuelas y el uso de cepillos infestados fueron significativos en este trabajo. Estos factores se han documentado como factores de riesgo importantes en muchos países (Hama-karim et al., 2022; Djohan et al., 2020; Doroodgar et al., 2014). Los problemas capilares como infecciones bacterianas y micóticas se han relacionado como resultado de la alimentación por *P. h. capitis* (Al-Quraishy et al., 2015). Sin embargo, a diferencia de los problemas dermatológicos, las infestaciones de piojos de la cabeza están a menudo descuidadas (Inanir et al., 2002).

En este estudio, no se encontró relación entre la parasitosis y la frecuencia de lavados en el cabello, alergias, asma, o la convivencia con animales. El nivel educativo y el sector profesional de los padres/tutores tampoco mostraron relación con respecto a la presencia de PC en la población analizada. Sin embargo, mientras algunos estudios concuerdan con esto (Doroodgar et al., 2014) otros autores sugieren lo contrario (Ghofleh Maramazi et al., 2019).

En este trabajo las variables como tener más casos de PC en la familia, ser niña y que la madre de familia tuviera menos de 30 años, fueron las variables más predictoras. Utilizando estas variables, se pudo predecir mediante el modelo de crecimiento CHAID que el 84,9% de los niños padecieron pediculosis durante los últimos 12 meses. La identificación de estos factores puede plantearse en programas de actuación sobre esta parasitación ya que permitirían identificar grupos de riesgo en los que sería más probable encontrar niños parasitados, incrementando la eficacia y efectividad de los programas de prevención y tratamiento.

Tener más casos de PC en la familia y ser niña son factores que aumentan el riesgo de contagio, como se ha observado previamente (Ghofleh Maramazi et al., 2019). Sin embargo, la edad de la madre (menor de 30 años), es un factor que merece la pena considerar, ya que en el caso de la población estudiada, es común que en la mayoría de los hogares mexicanos la madre sea la encargada del cuidado de los hijos. Por lo tanto, cuando varios casos de infestación en la familia, la eliminación de la pediculosis se vuelve una tarea complicada para una madre que quizá por su edad no tenga la experiencia suficiente.

6.5.1. Limitaciones del estudio

Las infestaciones de piojos de la cabeza continúan siendo tema de vergüenza y angustia entre los niños escolares y sus padres. Esta fue la razón principal de rechazo para participar en este estudio. Solo en una escuela primaria se logró la aceptación a participar ya que contaban con personal médico que ayudó a sensibilizar a los participantes. A pesar de la amplia matrícula de la escuela, el tamaño de muestra se redujo por los participantes que no cumplieron el criterio de inclusión. Respecto a las encuestas, no se pudo recoger toda la información planeada ya que algunas encuestas fueron devueltas con preguntas sin contestar o algunas marcadas con doble respuesta, invalidando la pregunta por lo que fueron excluidas del estudio. Algunas otras respuestas eran inconsistentes entre sí. Al

tratarse de una encuesta anonimizada, no fue posible tener certidumbre de la información recogida. Los fallos mencionados se tradujeron en resultados poco significativos.

CAPÍTULO VII. CONCLUSIONS

The conclusions obtained from this work are numerous and vary according to the different contents. For ease of presentation, they are listed according to the objectives.

A. Regarding the male genitalia of *P.h. capitis*, we can conclude:

1. The male genitalia are composed of highly complex structures and microstructures, which are observable to a greater or lesser degree depending on whether the male is at rest or preparing for copulation.
2. At rest, the genitalia are found inside the genital chamber, with only the apical part of the dilator, the most commonly observed structure, being visible.
3. During the process of copulation, the penis, the vesica stem, and the vesica are extruded. These structures are difficult to observe both under normal developmental and in *in vitro* conditions.
4. The structures of the genital chamber, the structures and microstructures of the stem, the vesica, and the penis are synergistically involved in the process of copulation, and some of them had not been previously reported for any suborder of lice.
5. The results of this study raise new questions about the function of some male genitalia structures of *P. h. capitis* and their underlying mechanisms.
6. Future research should aim to unravel whether structures such as the dilator and the vesica spines or scales present sensory sensitivity to chemical signals involved in sexual activity, which could imply their participation in mating processes and associated rituals.
7. Other structures of interest that need to be further studied are the inverted crest of the penis and the exit orifices of the flat area, which due to their location are possibly related to the nutrient ratio and the pH balance of the louse semen.
8. Detailed descriptions of the physiological functions and signaling mechanisms of each structure would allow the complete description of the male reproductive system of *P. h. capitis*.

B. Regarding the embryonic development of *P. h. capitis*, we can conclude:

9. An update on the morphology of the eggs of *P. h. capitis* and the features of embryonic development that are visible through the chorion using stereoscopic microscopy are described.

10. This study proposes the evaluation of characteristics such as viability, fecundity, and novel external markers of embryonic development in the eggs of *P. h. capitis*.
11. External markers of embryonic development facilitate the differentiation between early, medium, and late eggs, complementing the previously established characteristics.
12. The classification of the stages of embryonic development could be used as a reference for toxicological tests to facilitate the standardized evaluation of the ovicidal activity of new drugs.
13. Our results highlight the need to further describe the eggs at a structural and physiological level for a better understanding of embryogenesis.
14. Since the morphology-related information in the scientific literature is still limited, future studies are needed that will elaborate on relevant information about embryonic development for related toxicological tests.

C. Regarding the morphological analysis of the ecdysial pattern of *P. h. capitis*, we can conclude:

15. This work is the first to study the microstructure of the naturally molded exoskeleton of *P. h. capitis* combining SM, CLSM, and SEM.
16. The study of the ecdysis process showed for the first time an early genital differentiation in nymphs III of *P. h. capitis*.
17. Ecdysis is not a random process and depends on the ecdysial line that successfully leads to a consistent pattern of molding.
18. At each stage of ecdysis, the respiratory system is attached to the molded exoskeleton, completely molting with it.
19. These findings serve as the basis for future research on the physiological characterization and regulation of the morphological development and ecdysis in lice or other hemimetabolous insects.

D. Regarding the analysis of the prevalence of pediculosis capitis (PC), we can conclude:

20. PC continues being a recurrent problem in students at basic education schools in Mexico. However, epidemiological studies conducted in the country are scarce.
21. This is the first study carried out in Chilpancingo, providing an approach to unravel the current epidemiological situation and risk factors for PC.

22. In this study, a higher PC infestation was identified in girls than in boys, and the risk increased at the presence of other infested family members and when the mother of the family was younger than 30 years old.
23. In most basic education schools in Mexico, it is recommended that boys have short hair, unlike girls. This condition could explain the infestation trend identified in this study.
24. The children and parents' resistance to participate in the study indicates that there is still a lot of informative dissemination initiatives about pediculosis to be organized, involving educational, health, and government authorities for the control of infestation.
25. It is also important to define research protocols according to the study region, considering the season, type of climate, and other variables that may influence infestation.
26. Regional studies of this nature are important to determine the current situation of pediculosis and define the type of intervention required in each case.

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS

A

1. Adjemian, V., Galassi, F. G., Picollo, M. I. & González-Audino, P. (2022). The attractivity of the head louse, *Pediculus humanus capitis* (Pediculidae: Anoplura) to isolated compounds and blends of human Skin. *Journal of Medical Entomology*, 59(4), 1171–1176. (<https://doi.org/10.1093/jme/tjac041>)
2. Al-marjan, K., Koyee, Q. & Abdullah, S. M. A. (2015). In vitro study on the morphological development of eggs (nits) and other stages of head lice *Pediculus humanus capitis* De Geer, 1767. *Zanco Journal of Pure and Applied Sciences*, 27(3), 35–40. (<https://zankojournal.su.edu.krd/index.php/JPAS/article/view/162>)
3. Al-Quraishy, S., Abdel-Ghaffar, F. & Mehlhorn, H. (2015). Head louse control by suffocation due to blocking their oxygen uptake. *Parasitology Research*, 114(8), 3105–3110. (<https://doi.org/10.1007/s00436-015-4528-6>)
4. AlBashtawy, M. & Hasna, F. (2012). Pediculosis capitis among primary-school children in Mafraq Governorate, Jordan. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 18(1), 43–48. (<https://doi.org/10.26719/2012.18.1.43>)
5. Amanzougaghene, N., Fenollar, F., Davoust, B., Djossou, F., Ashfaq, M., Bitam, I., Raoult, D. & Mediannikov, O. (2019). Mitochondrial diversity and phylogeographic analysis of *Pediculus humanus* reveals a new Amazonian clade “F.” *Infection, Genetics and Evolution*, 70, 1–8. (<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.006>)
6. Amanzougaghene, N., Fenollar, F., Raoult, D. & Mediannikov, O. (2020). Where are we with human lice? A review of the current state of knowledge. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(474), 1–16. (<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00474>)
7. Araújo, A., Ferreira, L. F., Guidon, N., Maues Da Serra Freire, N., Reinhard, K. J. & Dittmar, K. (2000). Ten thousand years of head lice infection. *Parasitology Today*, 16(7), 269. ([https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01694-X](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01694-X))
8. Arriaza, B., Orellana, N. C., Barbosa, H. S., Menna-Barreto, R. F. S., Araújo, A. & Standen, V. (2012). Severe head lice infestation in an Andean mummy of Arica, Chile. *Journal of Parasitology*, 98(2), 433–436. (<https://doi.org/10.1645/ge-2903.1>)
9. Arriaza, B., Standen, V., Núñez, H. & Reinhard, K. (2013). Study of archaeological nits/eggs of *Pediculus humanus capitis* by scanning electron microscopy. *Micron*, 45(1), 145–149. (<https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.10.018>)

B

10. Balcioglu, C., Burgess, I. F., Limoncu, M. E., Şahin, M. T., Ozbel, Y., Bilaç, C., Kurt, O. & Larsen, K. S. (2008). Plastic detection comb better than visual screening for diagnosis of head louse infestation. *Epidemiology and Infection*, 136(10), 1425–1431. (<https://doi.org/10.1017/S0950268807000118>)
11. Barker, S. C. & Altman, P. M. (2011). An ex vivo, assessor blind, randomised, parallel group, comparative efficacy trial of the ovicidal activity of three pediculicides after a single application - melaleuca oil and lavender oil, eucalyptus oil and lemon tea tree oil, and a “suffocation” pediculicide. *BMC Dermatology*, 11(1), 1–7. (<https://doi.org/10.1186/1471-5945-11-14>)
12. Belles, X. (2020). The hemimetabolan development. In X. Belles (Ed.), *Insect Metamorphosis*, 47-70. Academic Press. (<https://doi.org/10.1016/c2016-0-04530-8>)
13. Beutel, R. G., Friedrich, F., Ge, S.-Q. & Yang, X.-K. (2014). *Insect morphology and phylogeny: a textbook for students of entomology*. Walter de Gruyter.
14. Birkemoe, T., Lindstedt, H. H., Ottesen, P., Soleng, A., Næss, Ø. & Rukke, B. A. (2016). Head lice predictors and infestation dynamics among primary school children in Norway. *Family Practice*, 33(1), 23–29. (<https://doi.org/10.1093/fampra/cmz081>)
15. Bohl, B., Evetts, J., McClain, K., Rosenauer, A. & Stellitano, E. (2015). Clinical practice update: pediculosis capitis. *Pediatric Nursing*, 41(5), 227–234.
16. Bowles, V. M., Yoon, K. S., Barker, S. C., Tran, C., Rhodes, C. & Clark, M. J. (2017). Ovicidal efficacy of abametapir against eggs of human head and body lice (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology*, 54(1), 167–172. (<https://doi.org/10.1093/jme/tjw132>)
17. Bray, D. (2000). Critical point drying of biological specimens for scanning electron microscopy. In W. J.R & C. A.A (Eds.), *Supercritical Fluid Methods and Protocols. Methods In Biotechnology*, 235–243. Humana Press. (<https://doi.org/10.1385/1-59259-030-6:235>)
18. Burkhart, C .N., Burkhart, C. G., Gunning, W. T. & Arbogast, J. (1999). Scanning electron microscopy of human head louse (Anoplura: Pediculidae) egg and its clinical ramifications. *Journal of Medical Entomology*, 36(4), 454–456. (<https://doi.org/10.1093/jmedent/36.4.454>)

19. Burkhart, Craig N, & Burkhart. C. G. (2005). Head lice: Scientific assessment of the nit sheath with clinical ramifications and therapeutic options. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(1), 129–133. (<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.01.134>)
20. Burkhart, Craig N. & Burkhart, C. G. (2007). Fomite transmission in head lice. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(6), 1044–1047. (<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.10.979>)

C

21. Canyon, D. V., Speare, R. & Muller, R. (2002). Spatial and kinetic factors for the transfer of head lice (*Pediculus capitis*) between hairs. *Journal of Investigative Dermatology*, 119(3), 629–631. (<https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.00540.x>)
22. Catalá, S., Junco, L., & Vaporaky, R. (2005). *Pediculus capitis* infestation according to sex and social factors in Argentina. *Revista de Saude Publica*, 39(3), 438–443. (<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0034-89102005000300015>)
23. CDC. (2020). Head lice - Treatment. Centers for Disease Control and Prevention. (<https://www.cdc.gov/parasites/lice/head/treatment.html>). Accessed on 22 September 2022
24. CDC - DPDx. (2017). *Pediculosis*. Centers for Disease Control and Prevention. (<https://www.cdc.gov/dpdx/pediculosis/index.html>). Accessed on November 2019
25. Chacón Castro, R., Villalba Velásquez, V. & Moreira González, I. (2009). Descripción anatómica de los órganos genitales y glándulas secretoras abdominales del escarabajo *Ulomoides dermestoides* (fairmare 1893) (Coleoptera Tenebrionidae). *Tecnología En Marcha*, 22(4), 45–65. (https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/125)
26. Cicchino, A. C., Muñoz Cobeñas, M. E., Bulman, G. M., Diaz, J. C. & Laos, A. (1998). Identification of *Microthoracius mazzai* (Phthiraptera: Anoplura) as an economically important parasite of alpacas. *Journal of Medical Entomology*, 35(6), 922–930. (<https://doi.org/10.1093/jmedent/35.6.922>)
27. Coates, S. J., Thomas, C., Chosidow, O., Engelman, D. & Chang, A. Y. (2020). Ectoparasites: Pediculosis and tungiasis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 82(3), 551–569. (<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.05.110>)

28. Counahan, M., Andrews, R., Büttner, P., Byrnes, G. & Speare, R. (2004). Head lice prevalence in primary schools in Victoria, Australia. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 40(11), 616–619. (<https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2004.00486.x>)
29. Cueto, G. M., Zerba, E. & Picollo, M. I. (2006). Embryonic development of human lice: Rearing conditions and susceptibility to spinosad. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(3), 257–261. (<https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000300005>)

D

30. de Villar, M. I. P., Zerba, E. N., Wood, E. & de Licastro, S. (1980). Neurogenesis and occurrence of cholinesterase in eggs of *Triatoma infestans*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Comparative*, 65(1), 65–70. ([https://doi.org/10.1016/0306-4492\(80\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0306-4492(80)90047-7))
31. Dehghanzadeh, R., Asghari-Jafarabadi, M., Salimian, S., Asl Hashemi, A. & Khayat-zadeh, S. (2015). Impact of family ownerships, individual hygiene, and residential environments on the prevalence of pediculosis capitis among schoolchildren in urban and rural areas of northwest of Iran. *Parasitology Research*, 114(11), 4295–4303. (<https://doi.org/10.1007/s00436-015-4670-1>)
32. Devore, C. D. & Schutze, G. E. (2015). Head Lice. *Pediatrics*, 135(5), e1355–e1365. (<https://doi.org/10.1542/peds.2015-0746>)
33. Djohan, V., Angora, K. E., Miezán, S., Bédia, A. K., Konaté, A., Vanga-Bosson, A. H., Kassi, F. K., Kiki-Barro, P. C. M., Yavo, W. & Menan, E. I. (2020). Pediculosis capitis in Abidjan, Côte d’Ivoire: Epidemiological profile and associated risk factors. *Parasite Epidemiology and Control*, 11(1), e00159. (<https://doi.org/10.1016/j.parepi.2020.e00159>)
34. Donoughe, S. & Extavour, C. G. (2016). Embryonic development of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Developmental Biology*, 411(1), 140–156. (<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.04.009>)
35. Doroodgar, A., Sadr, F., Doroodgar, M., Doroodgar, M. & Sayyah, M. (2014). Examining the prevalence rate of *Pediculus capitis* infestation according to sex and social factors in primary school children. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(1), 25–29. ([https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60308-X](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60308-X))

36. Durden, L. (2019). Lice (Phthiraptera). In G. Mullen. & L. Durden (Eds.), *Medical and Veterinary Entomology*, 79–106. Academic Press. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00007-8>)
37. Durden, L. A. (1994). The sucking lice (Insecta, Anoplura) of the world: a taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographic distributions. *In Bulletin of the American Museum of Natural History*, 218, 1-90
38. Durden, L. A. (2002). Bittig and sucking lice. In R. P. Meyer & M. B. Madon (Eds.), *Arthropods of public health significance in California*, 37–44. MVC Association of California. (<http://www.mvcac.org>)
39. Durden, L. A., Blanco, M. B., Seabolt, M. H. & Ginsberg, H. (2017). Two new species of sucking lice (Phthiraptera: Anoplura: Polyplacidae) from endangered, hibernating lemurs (Primates: Cheirogaleidae). *Journal of Medical Entomology*, 54(3), 568–575. (<https://doi.org/10.1093/jme/tjw185>)
40. Dutra, J. M. F., Alves, A. D., Pessanha, T., Rachid, R., De Souza, W., Linardi, P. M., Ferreira, L. F., De Souza, S. M. & Araujo, A. (2014). Prehistorical *Pediculus humanus capitis* infestation: quantitative data and low vacuum scanning microscopy. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(2), 115–119. (<https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200005>)

E

41. Ehrenberg, J. P. & Ault, S. K. (2005). Neglected diseases of neglected populations: Thinking to reshape the determinants of health in Latin America and the Caribbean. *BMC Public Health*, 5(119), 1–13. (<https://doi.org/10.1186/1471-2458-5-119>)
42. Eisenhower, C. & Farrington, E. A. (2012). Advancements in the treatment of head lice in pediatrics. *Journal of Pediatric Health Care*, 26(6), 451–461. (<https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2012.05.004>)
43. Ewing, H. E. (1932). The male genitalia armature in the order Anoplura, or Sucking Lice. *Annals of the Entomological Society of America*, 25(4), 657–669. (<https://doi.org/10.1093/aesa/25.4.657>)

F

44. Fabro, J., Sterkel, M., Capriotti, N., Mougabure-Cueto, G., Germano, M., Rivera-Pomar, R. & Ons, S. (2012). Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 487–491. (<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.006>)
45. Falagas, M. E., Matthaiou, D. K., Rafailidis, P. I., Panos, G. & Pappas, G. (2008). Worldwide prevalence of head lice. *Emerging Infectious Diseases*, 14(9), 1493–1494. (<https://doi.org/10.3201/eid1409.080368>)
46. Feldmeier, H. & Heukelbach, J. (2009). Epidermal parasitic skin diseases: A neglected category of poverty-associated plagues. *Bulletin of the World Health Organization*, 87(2), 152–159. (<https://doi.org/10.2471/BLT.07.047308>)
47. Fu, Y.-T., Yao, C., Deng, Y.-P., Elsheikha, H. M., Shao, R., Zhu, X.-Q. & Liu, G.-H. (2022). Human pediculosis, a global public health problem. *Infectious Diseases of Poverty*, 11(1), 1–15. (<https://doi.org/10.1186/s40249-022-00986-w>)

G

48. Galassi, F. G., Fronza, G., Toloza, A. C., Picollo, M. I. & González-Audino, P. (2018). Response of *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) to volatiles of whole and individual components of the human scalp. *Journal of Medical Entomology*, 55(3), 527–533. (<https://doi.org/10.1093/jme/tjx243>)
49. Gazmuri B., P., Arriaza T., B., Castro S., F., González N., P., Maripan V., K. & Saavedra R., I. (2014). Estudio epidemiológico de la Pediculosis en escuelas básicas del extremo norte de Chile. *Revista Chilena de Pediatría*, 85(3), 312–318. (<https://doi.org/10.4067/S0370-41062014000300007>)
50. Ghofleh Maramazi, H., Sharififard, M., Jahanifard, E., Maraghi, E., Mahmoodi Sourestani, M., Saki Malehi, A. & Rasaei, S. (2019). *Pediculosis humanus capitis* prevalence as a health problem in girl's elementary schools, Southwest of Iran (2017-2018). *Journal of Research in Health Sciences*, 19(2), 1–6. (PMID:31278215)
51. Gilbert, S. F. (1997). *Developmental Biology*. S. F. Gilbert (Ed). Sinauer Associates Inc

52. Gillott, C. (1995). Reproduction. In C. Gillott (Ed.), *Entomology*, 540–567. Springer
53. Gonzalez-Morales, M. A. & Romero, A. (2019). Effect of synergists on deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of Economic Entomology*, 112(2), 786–791. (<https://doi.org/10.1093/jee/toy376>)
54. Grimaldi, D., & Engel, M. S. (2005). *Evolution of the Insects*. Cambridge University Press.
55. Gulgun, M., Balci, E., Karaoğlu, A., Babacan, O. & Türker, T. (2013). Pediculosis capitis: Prevalence and its associated factors in primary school children living in rural and urban areas in Kayseri, Turkey. *Central European Journal of Public Health*, 21(2), 104–108. (<https://doi.org/https://doi.org/10.21101/cejph.a3750>)

H

56. Hama-karim, Y. H., Azize, P. M., Ali, S. I. & Shahow, A. E. (2022). Epidemiological study of pediculosis among primary school children in Sulaimani Governorate, Kurdistan region of Iraq. *Jornal Arthropod-Borne Diseseases*, 16(1), 72–83. (<https://doi.org/10.18502/jad.v16i1.11195>)
57. Hatam-Nahavandi, K., Ahmadpour, E., Pashazadeh, F., Dezhkam, A., Zarean, M., Rafiei-Sefiddashti, R., Salimi-Khorashad, A., Hosseini-Teshnizi, S., Hazratian, T. & Otranto, D. (2020). Pediculosis capitis among school-age students worldwide as an emerging public health concern: a systematic review and meta-analysis of past five decades. *Parasitology Research*, 119(10), 3125–3143. (<https://doi.org/10.1007/s00436-020-06847-5>)
58. Hatsushika, R., Naramoto, S. & Miyoshi, K. (1983). Scanning electron microscope studies on head louse, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Kawasaki Medical Journal*, 9(2), 109–119. ([https://doi.org/https://doi.org/10.114882/kmj-e9\(2\)109](https://doi.org/https://doi.org/10.114882/kmj-e9(2)109))
59. Heukelbach, J. (2010). *Management and control of head lice infestations*. Heukelbach, J (Ed). Bremen, Germany. UNI-MED Verlag AG
60. Heukelbach, J. & Feldmeier, H. (2004). Ectoparasites - The underestimated realm. *The Lancet*, 363(9412), 889–891. ([https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15738-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15738-3))

61. Hill, N., Moor, G., Cameron, M. M., Butlin, A., Preston, S., Williamson, M. S. & Bass, C. (2005). Single blind, randomised, comparative study of the Bug Buster kit and over the counter pediculicide treatments against head lice in the United Kingdom. *British Medical Journal*, 331(7513), 384–386. (<https://doi.org/10.1136/bmj.38537.468623.E0>)

I

62. Ibarra, J. (1988). How to detect head lice: the changing emphasis in health education. *Health at School*, 3(4), 109–112
63. Ibarra, J. (1993). Lice (Anoplura). In R. P. Lane & R. W. Crosskey (Eds.), *Medical Insects and Arachnids*, 517–528. Springer. (https://doi.org/10.1007/978-94-011-1554-4_15)
64. Inanir, I., Turhan Şahin, M., Gündüz, K., Dinç, G., Türel, A. & Serap Öztürkcan, D. (2002). Prevalence of skin conditions in primary school children in Turkey: Differences based on socioeconomic factors. *Pediatric Dermatology*, 19(4), 307–311. (<https://doi.org/10.1046/j.1525-1470.2002.00087.x>)

K

65. Karnovsky, M. J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal Cell Biology*, 27(2), 1A-149A.
66. Keilin, D. & Nutall, G. (1930). Iconographic studies of *Pediculus humanus*. *Parasitology*, 22(1), 1–10. (<https://doi.org/10.1017/S0031182000010921>)
67. Kim, J. H., Lee, D. E., Park, S., Clark, J. M. & Lee, S. H. (2021). Characterization of nit sheath protein functions and transglutaminase-mediated cross-linking in the human head louse, *Pediculus humanus capitis*. *Parasites & Vectors*, 14(1), 1–11. (<https://doi.org/10.1186/s13071-021-04914-z>)
68. Kim, K. C. & Ludwig, H. W. (1978). The family classification of the Anoplura. *Systematic Entomology*, 3(3), 249–284. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1978.tb00120.x>)
69. Kireççi, E. (2021). Investigation of morphological characteristics of pubic lice (*Pthirus pubis*, Linnaeus, 1758). *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 5(2), 305–311. (<https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.905025>)

70. Ko, C. J. & Elston, D. M. (2004). Pediculosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 50(1), 1–12. ([https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(03\)02729-4](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(03)02729-4))
71. Krecek, R. C., Van Niekerk, J. P. & Els, H. J. (1988). A comparison of fixatives suitable for scanning electron microscopy of *Habronema* spp. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 55(1), 63–65. (PMID3127769)

L

72. Laguna, M. F. & Risau-Gusman, S. (2011). Of lice and math: Using models to understand and control populations of head lice. *PLoS ONE*, 6(7), e21848-. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021848>)
73. Lehane, M. (2005). The blood-sucking insect groups. In M, Lehane (Ed.), *The Biology of Blood-Sucking in Insects*, 202–258. Cambridge University Press
74. Light, J. E., Smith, V. S., Allen, J. M., Durden, L. A. & Reed, D. L. (2010). Evolutionary history of mammalian sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *BMC Evolutionary Biology*, 10(292). (<https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-292>)
75. Linardi, P. M., Botelho, J. R., De María, M. & Cunha, H. C. (1987). O significado do sítio de aderência das lêndeas de *Pediculus capitis* em amostras de cabelos recolhidos do chão de barbearias. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 20(4), 209–212. (<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0037-86821987000400005>)
76. Louni, M., Mana, N., Bitam, I., Dahmani, M., Parola, P., Fenollar, F., Raoult, D. & Mediannikov, O. (2018). Body lice of homeless people reveal the presence of several emerging bacterial pathogens in northern Algeria. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(4), 1–18. (<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006397>)
77. Lozano, J. & Belles, X. (2011). Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. *Scientific Reports*, 1(1), 1–7. (<https://doi.org/10.1038/srep00163>)

M

78. Martínez de Murguía Fernández, L., Puig Algora, G., Bajona Roig, M. & Bacchini, G. (2021). Effectiveness and tolerability of a squalane and dimethicone-based treatment for head lice. *Parasitology Research*, 120(5), 1883–1890. (<https://doi.org/10.1007/s00436-021-07113-y>)

79. Maunder, J. W. (1983). The appreciation of lice. *Proceedings of the Royal Institution of Great Britain*, 55, 1–31.
80. Mehlhorn, H. (2016). Encyclopedia of Parasitology. In Mehlhorn, H (Ed), *Encyclopedia of Parasitology*. (<https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4>)
81. Mehlhorn, H., Abdel-Ghaffar, F., Al-Rasheid, K. A. S., Schmidt, J. & Semmler, M. (2011). Ovicidal effects of a neem seed extract preparation on eggs of body and head lice. *Parasitology Research*, 109(5), 1299–1302. (<https://doi.org/10.1007/s00436-011-2374-8>)
82. Metcalf, R. L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Pesticide Science*, 26(4), 333–358. (<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.2780260403>)
83. Molina-Garza, Z. J. & Galaviz-Silva, L. (2017). *Pediculus capitis* en niños de escuelas de la zona urbana de Nuevo León, México y análisis de factores asociados. *Biomedica*, 37(3), 333–340. (<https://doi.org/doi:https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3311>)
84. Mumcuoglu, K. Y., Friger, M., Ioffe-Uspensky, I., Ben-Ishai, F. & Miller, J. (2001). Louse comb versus direct visual examination for the diagnosis of head louse infestations. *Pediatric Dermatology*, 18(1), 9–12. (<https://doi.org/10.1046/j.1525-1470.2001.018001009.x>)
85. Mumcuoglu, K. Y., Miller, J., Gofin, R., Adler, B., Ben-Ishai, F., Almog, R., Kafka, D. & Klaus, S. (1990). Head lice in Israeli children: Parents' answers to an epidemiological questionnaire. *Public Health Reviews*, 18(4), 335–344.
86. Mumcuoglu, K. Y., Pollack, R. J., Reed, D. L., Barker, S. C., Gordon, S., Toloza, A. C., Picollo, M. I., Taylan-Ozkan, A., Chosidow, O., Habedank, B., Ibarra, J., Meinking, T. L. & Vander Stichele, R. H. (2021). International recommendations for an effective control of head louse infestations. *International Journal of Dermatology*, 60(3), 272–280. (<https://doi.org/10.1111/ijd.15096>)

N

87. Naz, S., Sychra, O. & Rizvi, S. A. (2012). New records and a new species of chewing lice (Phthiraptera, Amblycera, Ischnocera) found on Columbidae (Columbiformes) in Pakistan. *ZooKeys*, 174, 79–93. (<https://doi.org/10.3897/zookeys.174.2717>)

88. Núñez, H., Arriaza, B., Standen, V. & Aravena, N. (2017). Comparative study of the claws of *Pediculus humanus capitis* between archaeological and modern specimens. *Micron*, 95, 31–34. (<https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.01.007>)
89. Nuttall, G. (1917). Studies on *Pediculus*. I. The copulatory apparatus and the process of copulation in *Pediculus humanus*. *Parasitology*, 9(2), 293–324. (<https://doi.org/doi.org/10.1017/S0031182000006107>)
90. Nuttall, G. H. F. (1917). The biology of *Pediculus humanus*. *Parasitology*, 10(1), 80–185. (<https://doi.org/10.1017/S0031182000003747>)

O

91. O'Donel Alexander, J. (1984). Arthropods and Human Skin. In O'Donel Alexander, J. (Ed), *Arthropods and Human Skin*, 29-55. Springer. (<https://doi.org/10.1007/978-1-4471-1356-0>)
92. Oliveira, D. M. P., Gomes, F. M., Carvalho, D. B., Ramos, I., Carneiro, A. B., Silva-Neto, M. A. C., de Souza, W., Lima, A. P. C. A., Miranda, K. & Machado, E. A. (2013). Yolk hydrolases in the eggs of *Anticarsia gemmatalis* hubner (Lepidoptera: Noctuidae): A role for inorganic polyphosphate towards yolk mobilization. *Journal of Insect Physiology*, 59(12), 1242–1249. (<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.09.008>)
93. OPS. (2020). *Ectoparasitosis en la Región de las Américas. Componentes de la hoja de ruta para establecer la situación epidemiológica regional e identificar acciones para reducir su impacto. Informe de reunión (Belo Horizonte, 29 y 30 de julio del 2019)*. (<https://iris.paho.org/handle/10665.2/52417>)
94. OPS. (2022). Ectoparasitosis. Organización Panamericana de La Salud. (<https://www.paho.org/es/temas/ectoparasitosis>). Accessed on 18 September 2022

P

95. Panfilio, K. A. (2008). Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Developmental Biology*, 313(2), 471–491. (<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.004>)

96. Paredes, S. S., Estrada, R., Alarcon, H., Chavez, G., Romero, M. & Hay, R. (1997). Can school teachers improve the management and prevention of skin disease ? A pilot study based on head louse infestations in Guerrero, Mexico. *International Journal of Dermatology*, 36(11), 826–830. (<https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.1997.00282.x>)
97. Peacock, L. A. D. (1918). The structure of the mouthparts and mechanism of feeding in *Pediculus humanus*. *Parasitology*, 11(1), 98–117. (<https://doi.org/10.1017/S0031182000004121>)
98. Pérez, C. J., Alvarado, P., Narváez, C., Miranda, F., Hernández, L., Vanegas, H., Hruska, A. & Shelton, A. M. (2000). Assessment of insecticide resistance in five insect pests attacking field and vegetable crops in Nicaragua. *Journal of Economic Entomology*, 93(6), 1779–1787. (<https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.6.1779>)
99. Phadungsaksawasdi, K., Sunantaraporn, S., Seatamanoch, N., Kongdachalert, S., Phumee, A., Kraivichian, K., Sawaswong, V., Payungporn, S., Brownell, N. & Siriyasatien, P. (2021). Molecular analysis of mitochondrial cytb of *Pediculus humanus capitis* in Thailand revealed potential historical connection with South Asia. *PLoS ONE*, 16(9), 1–19. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257024>)
100. Pollack, R. J., Kiszewski, A. E. & Spielman, A. (2000). Overdiagnosis and consequent mismanagement of head louse infestations in North America. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 19(8), 689–693. (<https://doi.org/10.1097/00006454-200008000-00003>)

R

101. Resh, V., & Cardé, R. (2009). In Resh & R. Cardé (eds.), *Encyclopedia of Insects*. Academic Press. (<https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.X0001-X>)
102. Retana-Salazar, A. P. & Rodríguez-Arrieta, J. A. (2016). Estudio fotomicrográfico de la genitalia y estructuras accesorias de las formas del género *Pediculus* Linneo 1758 asociadas al hombre y los monos del Nuevo Mundo (Anoplura: Phthiraptera). *Revista Gadiatana de Entomología*, VII(1), 489–510. (<http://hdl.handle.net/10669/73739>)

103. Reynolds, R. J., Little, G. J., Lin, M. & Heath, J. W. (1994). Imaging myelinated nerve fibres by confocal fluorescence microscopy: individual fibres in whole nerve trunks traced through multiple consecutive internodes. *Journal of Neurocytology*, 23(9), 555–564. (<https://doi.org/10.1007/BF01262056>)
104. Roberts, R. J. (2002). Head Lice. *New England Journal of Medicine*, 346(21), 1645–1650. (<https://www.cdc.gov/parasites/lice/head/index.html>)
105. Roller, L., Žitňanová, I., Dai, L., Šimo, L., Park, Y., Satake, H., Tanaka, Y., Adams, M. E. & Žitňan, D. (2010). The ecdysis triggering Hormone signaling in arthropods. *Peptides*, 31(3), 429–441. (<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.11.022>)
106. Rukke, B. A., Soleng, A., Lindstedt, H. H., Ottesen, P., & Birkemoe, T. (2014). Socioeconomic status, family background and other key factors influence the management of head lice in Norway. *Parasitology Research*, 113(5), 1847–1861. (<https://doi.org/10.1007/s00436-014-3833-9>)

S

107. SCSIE. (2022). Microscopía. Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental. (<https://www.uv.es/uvweb/servicio-central-soporte-investigacion-experimental/es/organizacion/scsie-burjassot-paterna/microscopia/equipos-1285876928506.html>). Accessed on 29 November 2022
108. Sheele, J. M., Ridge, G. E., Du, W., Mallipeddi, N. & Vallabhaneni, M. (2017). A screen of pharmaceutical drugs for their ability to cause short-term morbidity and mortality in the common bed bug, *Cimex lectularius* L. *Parasitology Research*, 116(10), 2619–2626. (<https://doi.org/10.1007/s00436-017-5565-0>)
109. Smallman, B. N. & Mansingh, A. (1969). The cholinergic system in insect development. *Annual Review of Entomology*, 14(1), 387–408. (<https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.002131>)
110. Smith, E. H. & Salkeld, E. H. (1966). The use and action of ovicides. *Annual Review of Entomology*, 11(1), 331–368. (<https://doi.org/10.1146/annurev.en.11.010166.001555>)
111. Smith, E. H. & Wagenknecht, A. C. (1959). The ovicidal action of organophosphate insecticides. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(9), 1135–1144. (<https://doi.org/10.1139/o59-125>)

112. Smith, W. & Rybczynski, R. (2012). Prothoracicotropic Hormone. In L. I. Gilbert (Ed.), *Insect Endocrinology*, 1–62. Elsevier. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10001-9>)
113. Snelling, E. P., Seymour, R. S. & Runciman, S. (2011). Moulting of insect tracheae captured by light and electron-microscopy in the metathoracic femur of a third instar locust *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 57(9), 1312–1316. (<https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.06.006>)
114. Sonnberg, S., Oliveira, F. A., Araujo de Melo, I. L., de Melo Soares, M. M., Becher, H., & Heukelbach, J. (2014). Ex Vivo Development of Eggs from Head Lice (*Pediculus humanus capitis*). *The Open Dermatology Journal*, 4(1), 82–89. (<https://doi.org/10.2174/1874372201004010082>)

T

115. Tahmisian, T. N. (1943). Enzymes in ontogenesis: Choline-esterase in developing *Melanoplus differentialis* eggs. *Journal of Experimental Zoology*, 92(2), 199–213. <https://doi.org/10.1002/jez.1400920205>
116. Tovar-Corona, J. M., Castillo-Morales, A., Chen, L., Olds, B. P., Clark, J. M., Reynolds, S. E., Pittendrigh, B. R., Feil, E. J., & Urrutia, A. O. (2015). Alternative splice in alternative lice. *Molecular Biology and Evolution*, 32(10), 2749–2759. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv151>
117. Truman, J. W. (2005). Hormonal control of insect ecdysis: endocrine cascades for coordinating behavior with physiology. *Vitamins and Hormones*, 73(05), 1–30. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)73001-6](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)73001-6)
118. Tryjanowski, P., Adamski, Z., Dylewska, M., Bulkai, L., & Rózsa, L. (2009). Demographic correlates of sexual size dimorphism and male genital size in the lice *Philopterus coarctatus*. *Journal of Parasitology*, 95(5), 1120–1124. <https://doi.org/10.1645/ge-1966.1>

V

119. Valle-Barbosa, M., Muñoz-de la Torre, A., Vega-López, M., González-Pérez, G. & Flores-Villavicencio, M. (2017). La pediculosis en México : una historia que no concluye. *Revista Médico-Científica de La Secretaría de Salud Jalisco*, 4(3), 185– (<http://191. bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=76855>)

120. Veracx, A. & Raoult, D. (2012). Biology and genetics of human head and body lice. *Trends in Parasitology*, 28(12), 563–571. (<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2012.09.003>)

W

121. Willems, S., Lapeere, H., Haedens, N., Pasteels, I., Naeyaert, J. & De Maeseneer, J. (2005). The importance of socio-economic status and individual characteristics on the prevalence of head lice in schoolchildren. *European Journal of Dermatology*, 15(5), 387–392.
122. Woods, A. D., Porter, C. L. & Feldman, S. R. (2022). Abametapir for the treatment of head lice: a drug review. *Annals of Pharmacotherapy*, 56(3), 352–357. (<https://doi.org/10.1177/10600280211027968>)
123. World Medical Association. (2013). Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 310(20), 2191–2194. (<https://doi.org/10.1001/jama.2013.281053>)
124. Wu, N., Zhang, H. & Sun, F. Y. (2017). Phthiriasis palpebrarum: A case of eyelash infestation with *Pthirus pubis*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(5), 2000–2002. (<https://doi.org/10.3892/etm.2017.4187>)

Y

125. Yoshizawa, K., & Johnson, K. P. (2006). Morphology of male genitalia in lice and their relatives and phylogenetic implications. *Systematic Entomology*, 31(2), 350–361. (<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00323.x>)

Z

126. Zitnan, D. & Adams, M. E. (2012). Neuroendocrine Regulation of Ecdysis. In *Insect Endocrinology*, 253–309. Elsevier. (<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384749-2.10007-X>)
127. Žitňan, D., Žitňanová, I., Spalovská, I., Takáč, P., Park, Y. & Adams, M. E. (2003). Conservation of ecdysis-triggering hormone signalling in insects. *Journal of Experimental Biology*, 206(8), 1275–1289. (<https://doi.org/10.1242/jeb.00261>)

128. Žitňan, Dušan, & Daubnerová, I. (2016). Ecdysis Triggering Hormone. In Y. Takei, H. Ando. & K. Tsutsui (Eds.), *Handbook of Hormones*, 461-e77-3. Academic Press. (<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801028-0.00077-5>)
129. Zunino, M. (2014). About dung beetles (Coleoptera: Scarabaeoidea) genitalia: some remarks to a recent paper. *Acta Zoológica Mexicana*, 30(2), 439–443. (<https://doi.org/10.21829/azm.2014.302121>)

ANEXO. PUBLICACIONES

RESEARCH

Open Access



Pediculus humanus capitis: a study of the male genitalia using a combined stereoscopic, confocal laser scanning, and scanning electron microscopy approach

Blanca E. Álvarez-Fernández^{1,2}, María Morales-Suárez-Varela^{3,4*} , Benjamín Noguera-Torres⁵ and M. Adela Valero¹

Abstract

Background: The male genital structures of arthropods are key features in the taxonomic and phylogenetic study of these organisms. The male genitalia of the head louse *Pediculus humanus capitis* are complex organs which are partly composed of structures that dynamically extrude during copulation.

Methods: Here, we describe the morphology of the genitalia of *P. humanus capitis* at the copulation stage, and at rest, by using stereoscopic microscopy, confocal laser scanning microscopy (CLSM), and scanning electron microscopy (SEM).

Results: CLSM and SEM images revealed that the vesica is composed of two distinct anatomical parts, the proximal lobe and the distal lobe. Both lobes have short and narrow spines, as well as long and wide scales with either sharp or rounded tips. The rounded scales vary in size and have a wavy base and rounded tips, and thus resemble a tongue in appearance. We identified a gland-like area on the penis with 11 shallow circular depressions, and a flat area with 14–16 exit orifices. The apical end of the penis has a foliaceous trifurcation and serves to expel the contents of the ejaculatory duct. These characteristics were recorded for all the specimens analyzed, indicating that these structures are highly conserved; to our knowledge, they have not been previously reported for any suborder of lice.

Conclusions: To the best of our knowledge, our results reveal for the first time the morphological details, and complexity, of the male genitalia of the head louse *P. humanus capitis* at different stages of copulation. The new approach described here provided information that should be taken into consideration in future research on the genitalia of lice. Application of this approach will also impact the taxonomic and phylogenetic study of other insect taxa.

Keywords: Copulation, Genital chamber, Dilator, Genitalia, *Pediculus humanus capitis*, Vesica, Confocal laser scanning microscopy, Scanning electron microscopy

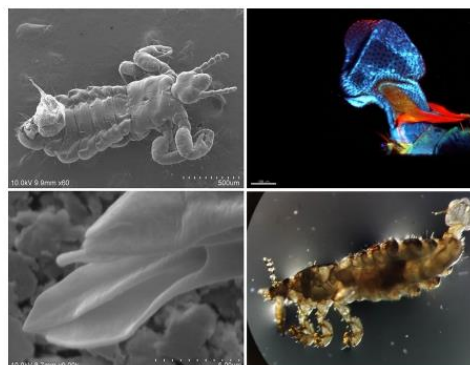
*Correspondence: maria.m.morales@uv.es

³ Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia, Avenida Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2021. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Graphical Abstract**Background**

Lice are ectoparasites of birds and mammals which spend their entire life cycle on the host's body [1]. Lice of the family Pediculidae, suborder Anoplura, include two ecotypes that exclusively infest humans [2–4]: *Pediculus humanus capitis*, described by De Geer in 1778; and *Pediculus humanus humanus*, described by Linnaeus in 1758. *Pediculus humanus capitis* is a cosmopolitan ectoparasite that causes pediculosis, one of the most common diseases caused by arthropods [5]. *Pediculus humanus capitis* inhabits the scalp, while *P. humanus humanus* is limited to the body; even though these species of lice are ecologically different, they are morphologically and biologically similar [6].

Sexual reproduction plays a major role in the evolution of body structures, sexual relationships, and behavior [7]. In beetles, the study of male (and, less frequently, female) genitalia has often been included in taxonomic and phylogenetic research [8]. In the Pediculidae, the male genitalia have been the target structures of multiple studies, with the genitalia of the Anoplura being used as one of the most common research models [9]. The male phallic organ of lice is a highly complex structure; it is stored in the genital chamber and, therefore, is not exposed to the external environment [1]. This hinders detailed study of the microstructure of the male genitalia.

In the seminal work of Nutall, published in 1917 [10], the copulatory apparatus of the male and the copulation process were described for living specimens of body lice. Visual representations of other anatomical parts were also published [10]. According to Nutall [10], the principal structures of the extruded genital apparatus are the dilator, the vesica of the penis, the support of

the penis, the penis, and the ejaculatory duct. In 1983, Hatsushika et al. [11] investigated the external anatomy of male and female *P. humanus capitis* by scanning electron microscopy (SEM). In that work, a sclerotic structure was documented, which the authors called a pseudopenis (and Nutall called the dilator), without delving into its description [11].

However, there is no standardized nomenclature for the structures of the male genitalia of the order Phthiraptera [9]. Furthermore, structures of great morphological significance, as described by Nutall in 1917 [10], are either no longer mentioned in studies or there is no conclusive evidence that they have been studied [12].

For many species of sucking lice, the structure, and relationships, of the finer parts of the genitalia have not been described, and homologies have not been defined or only very weakly established [12]. Currently, the information available on the male genitalia of *P. humanus capitis* is limited to that on a few structures such as the basal plate and the main sclerites. The shape of the subgenital plate is of taxonomic importance at the species level, while the shape, length, and thickness of the parameres play important roles at both the genus and species level [13]. The limited morphological descriptions that have so far been obtained through the use of modern microscopic approaches and techniques hinder the integration of knowledge on the male genitalia of lice. The use of state-of-the-art techniques can positively impact the taxonomic and phylogenetic research on insects.

The objective of this work is to investigate and describe the morphology of the structures that form the male genitalia of *P. humanus capitis* both at rest and at copulation. We also want to compare and confirm the terminology and morphology described here with that from other investigations on lice. For this, a combination of

stereoscopic microscopy (SM), confocal laser scanning microscopy (CLSM) and SEM was applied, to our knowledge for the first time, to the study of the male genitalia of lice.

Methods

Specimens

Adult *P. humanus capitis* lice ($n=506$) obtained from 50 girls aged 7–14 years were studied. The collection was carried out from June 2019 to December 2019 in the city of Chilpancingo, Guerrero, Mexico. The specimens were collected at different times of the day by dry combing with a fine-toothed metal comb. The specimens were kept in Eppendorf tubes filled with Karnovsky fixative (25% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde). The specimens were separated into males and females under a stereoscopic microscope.

Morphological identification was conducted in the Parasitology Laboratory of the Department of Parasitology of the University of Valencia, Spain. For this study, 197 males were analyzed. Of the total samples of male lice, 187 presented genitalia at rest, while 10 had extruded genitalia at different stages. A stereomicroscope (Nikon SMZ-U; Nikon Instruments, Tokyo, Japan), a confocal laser scanning microscope (Olympus FV1000-IX81; Olympus, Tokyo), and a scanning electron microscope (Hitachi S4800; Hitachi High-Technologies, Tokyo) were used for the morphological characterization of the specimens. The samples were prepared according to the methodology of the Central Service of Support for Experimental Research of the University of Valencia, Spain.

Stereoscopic microscopy

First, the 197 specimens were individually mounted on Petri dishes with Karnovsky fixative to prevent dehydration. To visualize the specimens, $\times 0.75$ and $\times 7.5$ objectives were used, with the focus and illumination adjusted for each sample. Genitalia at rest were identified in 187 of the specimens. Extruded genitalia at different stages (two at pre-copulation and eight at copulation stages) were identified for 10 specimens. The entire body and the genitals were photographed. All of the samples were stored in Eppendorf tubes with fresh Karnovsky fixative. Subsequently, the 10 males with extruded genitalia were prepared for the two other microscopic visualization methods, CLSM and SEM.

Confocal laser scanning microscopy

The 10 male samples were individually mounted on Petri dishes with Karnovsky fixative to avoid dehydration. An Olympus FV1000-IX81 confocal laser scanning microscope (Olympus) was used, with a 10×2 objective lens. Using the autofluorescence of the samples, the areas of

interest were scanned per individual. Wavelengths corresponding to the blue (excitation = 405 nm and emission = 425–475 nm), green (excitation = 488 nm and emission = 500–545 nm), and red channels (excitation = 559 nm and emission 557–675 nm) were used. The DM 405/488/559/635 beam splitter and filters between the SDM490 and SDM560 channels were applied. The z-axis resolution was set at 2- μ m steps and covered the entire specimen. FV viewer 4.2b software was used to acquire images of 1024 \times 1024 pixel resolution. The resulting images were produced by merging the three channels (blue, green, and red). Images of the genital area were taken, and the samples were subsequently stored in Eppendorf tubes with Karnovsky fixative.

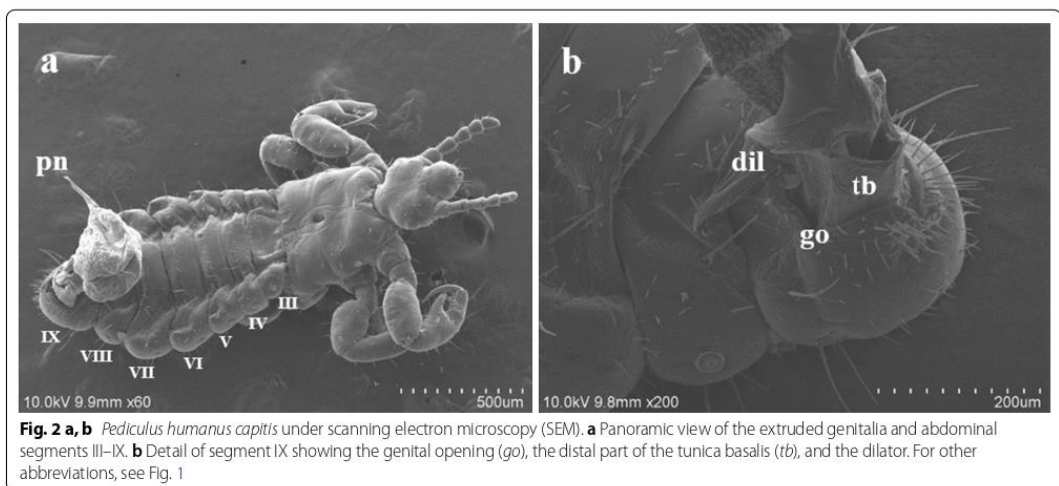
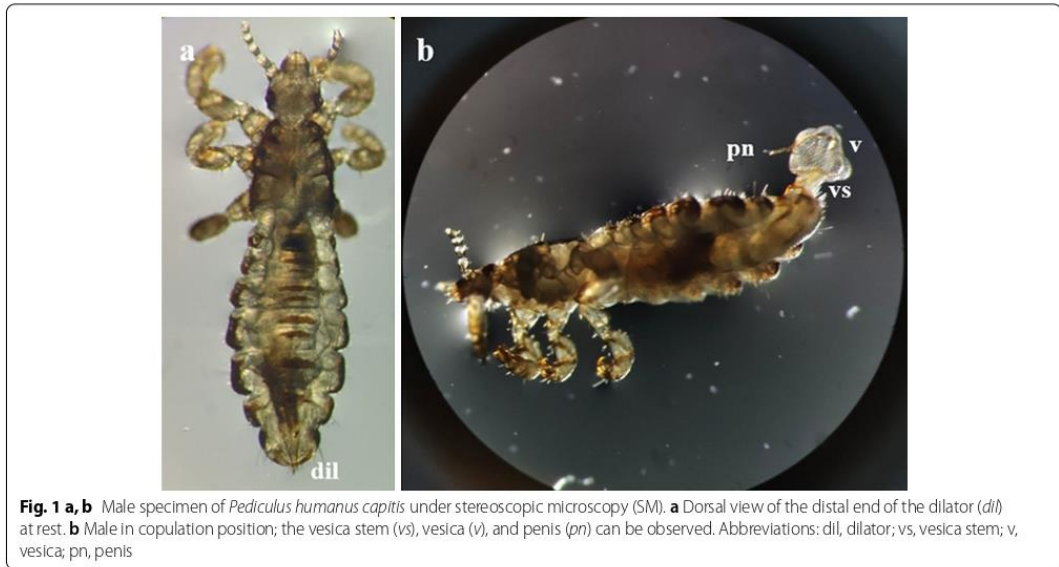
Scanning electron microscopy

The male lice were removed from the Karnovsky fixative and washed in phosphate buffer for 3 h at 22 ± 1 °C. Samples were post-fixed with 2% osmium, washed with distilled water, then dehydrated with ethanol at increasing concentrations (30, 50, 70, 90, and 100%), and dried with CO₂ using an Autosamdri-814 critical point dryer (Tousimis Research, Rockville, MD). The specimens were mounted on aluminum stubs using double-sided carbon tape. Next, the samples were coated with gold-palladium using a sputter coater (Polaron SC7640; Quorum Technologies, Laughton, East Sussex, UK) for 4 min. To improve conduction, a film of silver particles (OW52765459; Agar Scientific, Stansted, Essex, UK) was applied to the genitalia of nine specimens (two with partially extruded genitalia and seven with fully extruded genitalia). One specimen with fully extruded genitalia was not covered with the film. Images of the complete specimens and the specific structures of the genital area were taken. The samples were examined under a Hitachi S4800 scanning electron microscope (Hitachi High-Technologies) at an accelerating voltage of 10 kV and working distances of 8.7–10.2 mm. Images of 1280 \times 960 pixel resolution were acquired.

Results

Specimens at rest versus specimens at the copulation stage

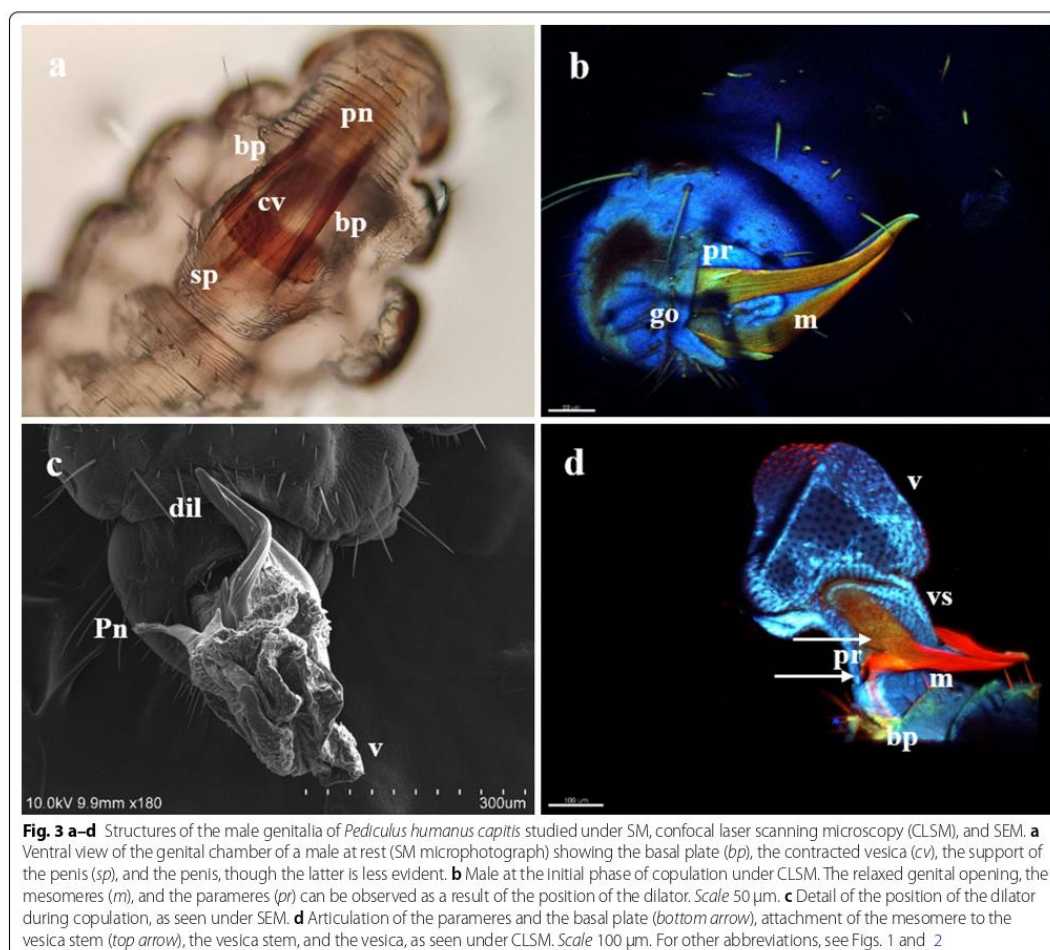
Under SM, the genitalia of the specimens at rest were maintained within the genital chamber, with the apical part of the dilator being visible. In contrast, the specimens in the process of copulation had a visible dorsoventral inclination on abdominal segment VII and a translucent white pouch that protruded dorsally from abdominal segment IX. In this region, we identified the penis and two structures, namely the “vesica stem” and the “vesica” (Fig. 1a, b).



Characteristics of the specimens at the copulation stage

At copulation, the male genitalia emerge through a horizontal opening, for which we propose the term “genital opening,” which is located dorsally to segment IX (Fig. 2a, b). This opening connects to the genital chamber, corresponding to abdominal segments VII–IX (Fig. 3a). The genital aperture had thick and smooth edges and was externally surrounded by setae. Short

setae covered the anterior border, while those of varied sizes covered almost the entire posterior segment. Long setae were medial to the edge of the genital opening (Fig. 2b). In specimens at the initial stage of copulation, the dilator was anterodorsally inclined, which, combined with the relaxed genital aperture, allowed the genitalia to extrude (Fig. 3b).



Structures that compose the genitalia

The male genitalia mainly consisted of the following structures:

1. The *tunica basalis*, a membrane with the aspect of a muscle that lines the genital chamber. We propose the term “tunica basalis” to describe this muscle-like membrane (Fig. 2b).
2. The *basal plate*, which is composed of a pair of rods positioned in a U shape at their proximal ends, and has thickenings laterally anchored to the tunica basalis (Fig. 3a).
3. The *dilator*, a structure formed by two arms, each of which is composed of a long mesomere partially

fused with a short lateral paramere. The parameres are oriented to the posterior end of the basal plate. In the mesomeres, we observed attachments that are fixed laterally to the vesica stem. The arms of the dilator were found to fuse distally, forming a functional V-shaped structure with rounded ends. Posterior to the fusion point is a slightly left-oriented torsion that forms an angle with the penis. Ridges of variable size and depth are positioned lengthwise along the dilator (Fig. 3b, d).

4. The *vesica stem*, the structure that serves as a supportive base for the vesica and the penis. It is muscular and equipped with short, narrow spines (Figs. 3d, 4a, b).

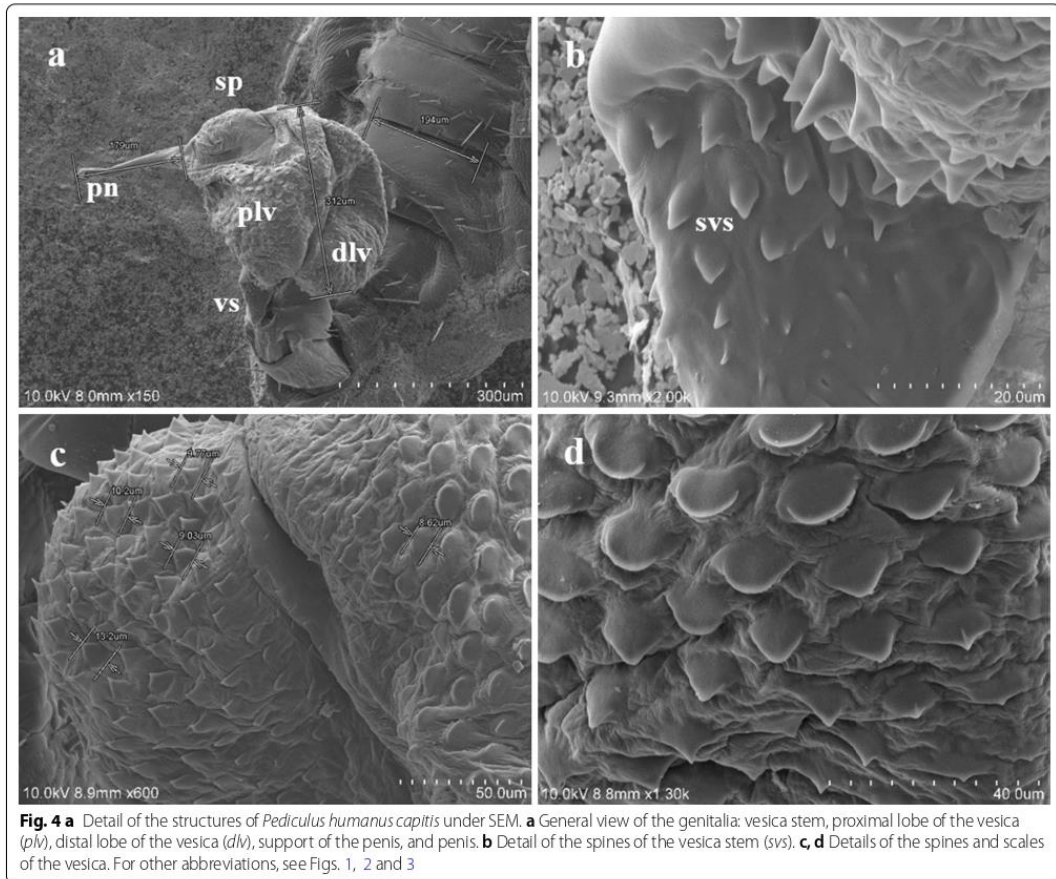
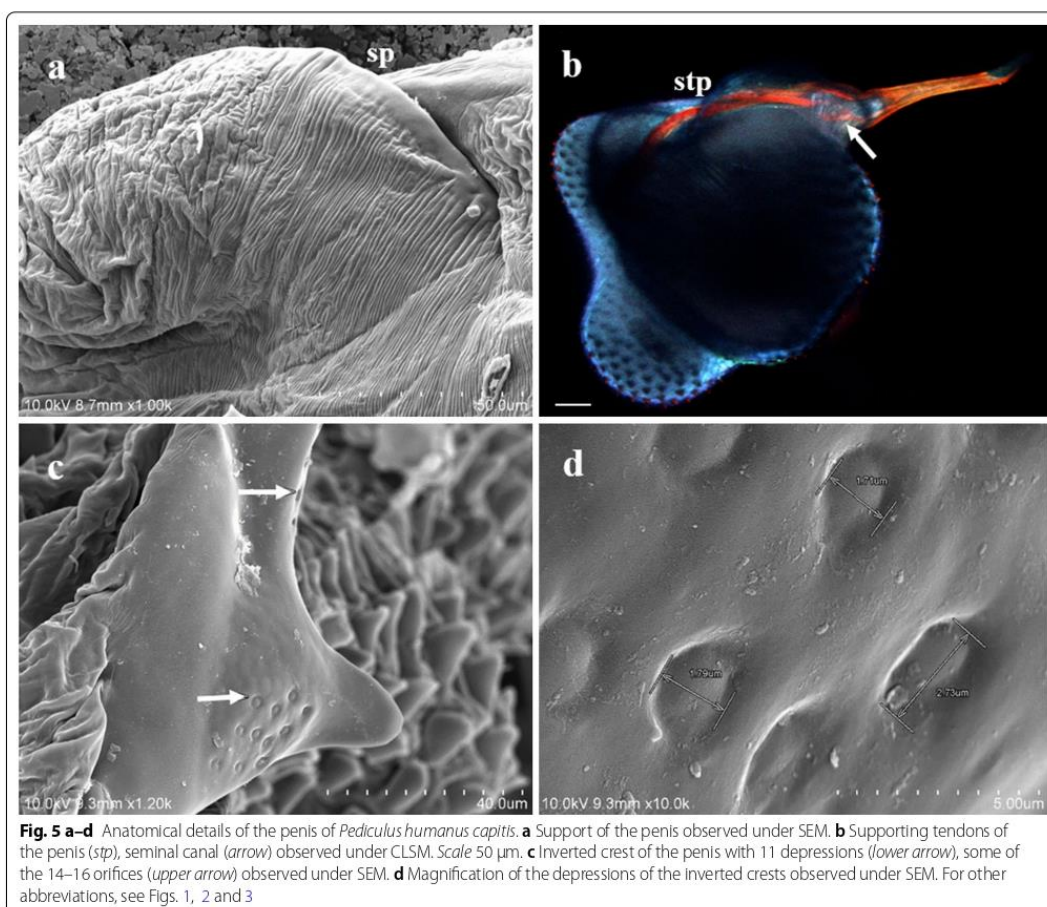


Fig. 4 a Detail of the structures of *Pediculus humanus capitis* under SEM. **a** General view of the genitalia: vesica stem, proximal lobe of the vesica (plv), distal lobe of the vesica (dlv), support of the penis, and penis. **b** Detail of the spines of the vesica stem (svs). **c, d** Details of the spines and scales of the vesica. For other abbreviations, see Figs. 1, 2 and 3

5. The *vesica*, a structure composed of two lobes that are separated from each other by a fissure with heterogeneous borders with an average height of 312 μm . The proximal lobe (PLV) and the distal lobe (DLV) of the vesica are named according to their position relative to the penis (Fig. 4a). Two types of ornamentation were identified in the vesica: spine- and scale-like structures (average height 10.16 μm) with variable surface areas. The short and narrow spines are mainly distributed at the edges of the fissure that separates the two lobes of the vesica. Long and broad sharp-tipped or round-tipped scales are randomly distributed within the PLV and DLV. The round-tipped scales are predominantly located at the posterior medial region of the PLV, have a wavy base, and resemble a tongue (Fig. 4a, c, d). These ornamentations are partially visible when the vesica is contracted within the genital chamber (Fig. 3a).
6. The *support of the penis*, located on the dorsal part of the PLV. It is a hairpin-shaped structure free of spines or scales, lined with a contractile-like tissue, which serves as a supportive tissue for the penis (Figs. 4a, 5a). The presence of two interconnected thick ducts was verified by CLSM; these probably contribute to the stiffness of the penis. They run alongside the ejaculatory duct inside the PLV posterior wall and pass under the hairpin to reach the penis (Fig. 5b).
7. The *penis*, a smooth tubular structure, with the tip slightly curved upwards (average total length 179 μm). An extension was identified at its proximal end with the shape of an inverted crest with a gland-like portion. There, 11 shallow circular depressions with no apparent exit orifice were documented (Fig. 5c, d). Toward the apical end, a flat area with an average length of 2.07 μm was identified; it has 14–16 exit orifices of undetermined depth (Figs. 5c, 5d).



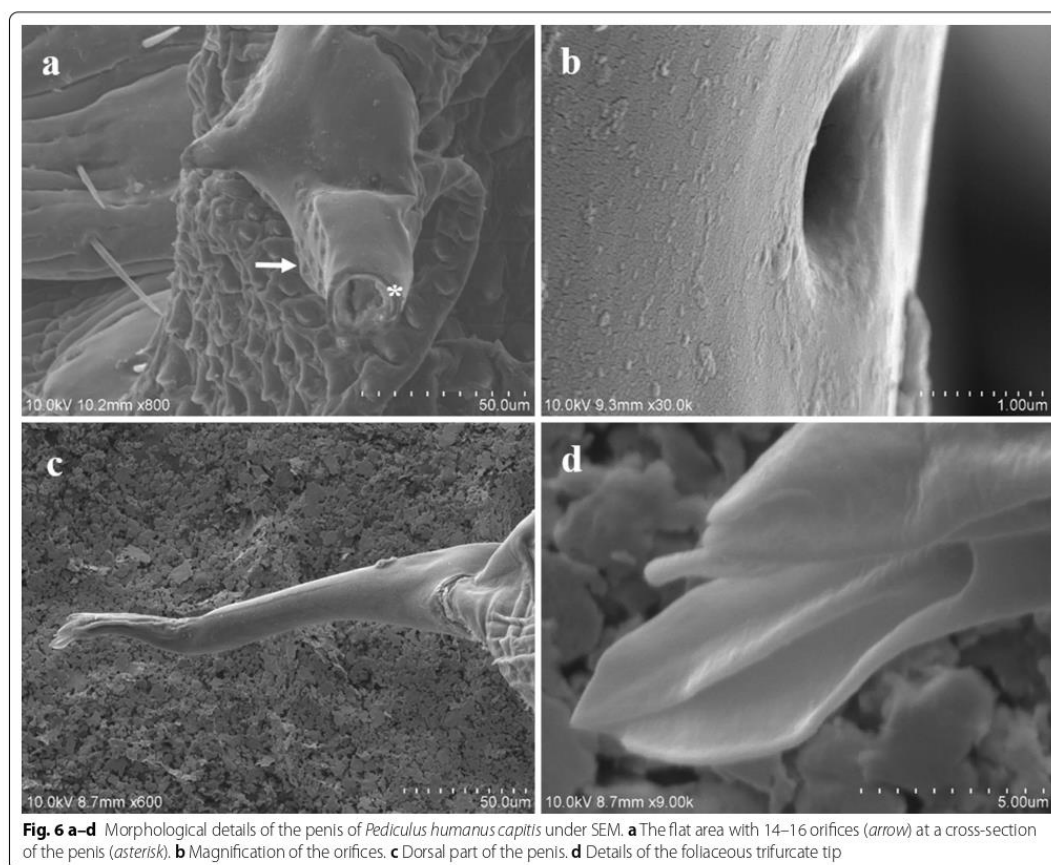
6a, b). The apical end of the penis has horizontal folds and terminates with a trifurcation that is leaf-like in shape. Cross-sections of the penis and the trifurcation revealed the presence of a hollow space, which possibly serves in the expulsion of the contents of the ejaculatory duct (Fig. 6a, b, d).

Our results show that the male genitalia of *P. humanus capitis* are complex but well-preserved structures since the morphological characteristics described here were consistently found in all the specimens studied.

Discussion

In this article, we describe the structures of the male genitalia of *P. humanus capitis* and establish the morphological differences between the genitalia at rest (inside the genital chamber) and when they are extruded to prepare for copulation.

According to the microphotographs obtained with three different visualization methods, namely SM, CLSM, and SEM, the morphological evidence supports Nutall's [10] observations for some of the studied structures. For this reason, we adopted his terminology, where appropriate, together with new terms that we have introduced to describe structures observed for the first time. The terms adopted from Nutall [10] include the dilator, vesica stem, vesica, penis support, and penis [10]. The terms we propose are the following: the tunica basalis; the proximal



and distal lobes; the spines and scales of the vesica, which are microstructures; the spines of the vesica stem; the contractile lining that serves as a support for the penis; the inverted crest of the penis, which has 11 depressions; the flat area of the penis, which has 14–16 exit orifices; the foliaceous trifurcation at the apical end of the penis; and the hollow space that serves to expel the contents of the ejaculatory duct.

The term dilator is especially controversial due to the discrepancies that have been documented regarding its structure. It has been referred to by various terms, e.g., it was first called “dilator” [10], and later “pseudopenis” [12], “mesomere” [1], and “mesomeric arch” [9]. Nutall [10] opted for the term dilator since this structure serves to dilate the female’s vagina before copulation. He described its structure as composed of parameres distally fused with the lateral spurs. Despite the correct use of this term with respect to this structure’s function,

anatomically it is not the most accurate. However, even though, from the results of the present study, we can confirm the observations of Retana-Salazar [9] concerning the existence of long mesomeres and short parameres, we still propose the use of the term dilator based on this structure’s function.

The basal plate is a structure that is widely conserved in the Psocodea. Since the position of this structure, as observed in our study, is homologous with that seen among different suborders of lice, we consider this term to be appropriate [1].

A 1998 study by Cicchino [14] that used SEM to examine the sucking louse of alpacas, *Microthoracius mazzai* (Phthiraptera: Anoplura), described a U- or V-shaped structure that the authors called a “protruding pseudopenis with a pointed appendix” and a second structure that they called a “rounded aedeagus” [14]. Judging from their morphology, the pseudopenis and aedeagus of *M. mazzai*

may correspond, respectively, to the anterodorsally tilted dilator and the partially extruded internal genitalia observed here in *P. humanus capitis* (Fig. 3b).

Most studies on the genital structures of sucking and chewing lice provide illustrations of insects at rest [15, 16], which makes comparison and the establishment of homologies among the Phthiraptera difficult. Therefore, the use of new microscopic techniques applied at different stages of copulation is necessary to obtain a clearer view of the morphology of these structures and to avoid errors in the interpretation of their functions.

The combined use of advanced microscopic methods allowed us to visualize a multitude of penis structures in great detail. These structures and their characteristics were observed in all the specimens analyzed, showing that they are highly conserved. To our knowledge, some of these structures have not been reported previously for any suborder of lice.

The described genital structures seem to participate synergistically in the copulation of *P. humanus capitis*. It is possible that chemical signaling is involved, causing the dilator to respond and, at the same time, send signals to the structures within the genital chamber to prepare for extrusion. Supposing this signaling exists, the dilator, the vesica stem, and the vesica should present specialized sensory areas to receive this information. These sensory areas could be the spines and scales of the vesica stem and vesica. In addition, an internal pressure system and musculature that control the movement of the structures could also be involved.

The microscopic anatomy of the penis of *P. humanus capitis* has several interesting aspects; for example, the inverted crest that possesses an area with a glandular appearance, which is possibly related to the supply of nutrients and control of the pH balance of the louse's semen. The flat area with the 14–16 exit holes probably plays a role in regulating the osmotic pressure exerted on the vesica which could ultimately lead to the expulsion of the semen from the penis.

Our results revealed the complexity of the male genitalia of *P. humanus capitis* when examined at different stages of copulation, and indicate that this should be taken into consideration in future investigations on the anatomy or the reproduction of similar species. In the present work, we provide the first description of the morphology of the male genitalia of *P. humanus capitis* using a new approach that combines different modern visualization techniques, and propose a change to the paradigm of the study of genitalia in lice. The application of state-of-the-art microscopic techniques to anatomical descriptions will undoubtedly impact future taxonomic and phylogenetic research on insects.

Conclusions

The results of this study raise new questions regarding the function of some of the structures of the male genitalia of *P. humanus capitis* and their underlying mechanisms. Future investigations should aim at unraveling whether structures such as the dilator and the vesica spines or scales have sensory sensitivity to chemical signals that are involved in sexual activity, which might imply their participation in the processes of mating and associated rituals. Other structures of interest for further study are the inverted crest of the penis and the orifices of the flat area, which, due to their location, are possibly related to the proportions of nutrients and the pH balance of the louse's semen. Detailed descriptions of the physiological functions and signaling mechanisms of each structure would enable the comprehensive description of the reproductive system of the male of *P. humanus capitis*.

Abbreviations

SM: Stereoscopic microscopy; CLSM: Confocal laser scanning microscopy; SEM: Scanning electron microscopy.

Acknowledgements

We would like to thank the municipal and school authorities for the support that they gave for the sample collection, and especially the following individuals: Teodora Álvarez Fernández, Director of the Transformemos Chilpancingo program, supported by the Municipal President of the Constitutional City Council of Chilpancingo, Guerrero, Mexico, Antonio Gaspar Beltrán; José Manuel Bernal Abarca, Director of Nicolás Bravo Elementary School; María Guadalupe Galván Torres from Medical Services; Daysi Peralta Ortega from Social Services; and all the children who participated in this study. Special thanks are due to the Autonomous University of Guerrero and Emeritus Professor Javier Saldaña Almazán.

Authors' contributions

Conceptualization: MAV, MMSV and BEAF. Insect collection: BEAF. Methodology: MAV, BEAF and MMSV. Image acquisition: BEAF. Data analysis: BEAF, MAV, MMSV and BNT. Writing, reviewing and editing the manuscript: BEAF, BNT, MAV and MMSV. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sector.

Availability of data and materials

Data supporting the conclusions of this article are included within the article. The raw datasets used and analyzed during the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The protocol of the investigation was approved by the Bioethics Committee of the Autonomous University of Guerrero, Mexico (folio CB-009/19). For the collection of lice, the necessary permits were obtained from the municipal and school authorities. Informed consent was obtained from the parents before their children participated in the study, and verbal assent was also required from the children. The collection of lice was conducted in accordance with the recommendations of the Declaration of Helsinki, World Medical Assembly, 2013.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia, Avenida Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. ²Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Avenida Lázaro Cárdenas S/N, Ciudad Universitaria, 39090 Chilpancingo, Guerrero, Mexico. ³Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Ciencias de la Alimentación, Toxicología y Medicina Legal, Facultad de Farmacia, Universitat de Valencia, Avenida Vicente Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. ⁴Consortio Para la Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBER Epidemiología y Salud Pública-CIBERESP), Avenida Monforte de Lemos 3-5, Pabellón 11, Planta 0, 28029 Madrid, Spain. ⁵Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Miguel Hidalgo, Santo Tomás, 11340 Mexico City, Mexico.

Received: 6 September 2021 Accepted: 28 October 2021
Published online: 17 November 2021

References

1. Yoshizawa K, Johnson KP. Morphology of male genitalia in lice and their relatives and phylogenetic implications. *Syst Entomol.* 2006;31:350–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.00323.x>
2. Dutra JMF, Alves AD, Pessanha T, Rachid R, De Souza W, Linardi PM, et al. Prehistorical *Pediculus humanus capitis* infestation: quantitative data and low vacuum scanning microscopy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014;56:115–9.
3. Núñez H, Arriaza B, Standen V, Aravena N. Comparative study of the claws of *Pediculus humanus capitis* between archaeological and modern specimens. *Micron.* 2017;95:31–4.
4. Tovar-Corona JM, Castillo-Morales A, Chen L, Olds BP, Clark JM, Reynolds SE, et al. Alternative splice in alternative lice. *Mol Biol Evol.* 2015;32:2749–59.
5. Galassi FG, Fronza G, Toloza AC, Picollo MI, González-Audino P. Response of *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) to volatiles of

- whole and individual components of the human scalp. *J Med Entomol.* 2018;55:527–33.
6. Amanzougaghene N, Fenollar F, Davoust B, Djossou F, Ashfaq M, Bitam I, et al. Mitochondrial diversity and phylogeographic analysis of *Pediculus humanus* reveals a new Amazonian clade “F”. *Infect Genet Evol.* 2019;70:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.006>.
7. Tryjanowski P, Adamski Z, Dylewska M, Bulkai L, Rózsa L. Demographic correlates of sexual size dimorphism and male genital size in the lice *Phlopterus coarctatus*. *J Parasitol.* 2009;95:1120–4.
8. Zunino M. About dung beetles (Coleoptera: Scarabaeoidea) genitalia: some remarks to a recent paper. *Acta Zool Mex.* 2014;30:439–43.
9. Retana-Salazar AP, Rodríguez-Arrieta JA. Estudio fotomicrográfico de la genitalia y estructuras accesorias de las formas del género *Pediculus* Linneo 1758 asociadas al hombre y los monos del Nuevo Mundo (Anoplura: Phthiraptera). *Rev gadiatana Entomol.* 2016;7:489–510 <http://hdl.handle.net/10669/73739>.
10. Nutall G. Studies on *Pediculus*. I. The copulatory apparatus and the process of copulation in *Pediculus humanus*. *Parasitology.* 1917;9:293–324.
11. Hatsushika R, Naramoto S, Miyoshi K. Scanning electron microscope studies on head louse, *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Kawasaki Med J.* 1983;9:109–19 [http://igakkai.kms-igakkai.com/wp/wp-content/uploads/1983env/9\(2\)109-119.1983.pdf](http://igakkai.kms-igakkai.com/wp/wp-content/uploads/1983env/9(2)109-119.1983.pdf).
12. Ewing HE. The male genitalia armature in the order Anoplura, or sucking lice. *Ann Entomol Soc Am.* 1932;25:657–69.
13. Kim KC, Ludwig HW. The family classification of the Anoplura. *Syst Entomol.* 1978;3:249–84.
14. Cicchino AC, Muñoz Coberñas ME, Bulman GM, Diaz JC, Laos A. Identification of *Microthoracius mazzai* (Phthiraptera: Anoplura) as an economically important parasite of alpacas. *J Med Entomol.* 1998;35:922–30.
15. Naz S, Sychra O, Rizvi SA. New records and a new species of chewing lice (Phthiraptera, Amblycera, Ischnocera) found on Columbidae (Columbiformes) in Pakistan. *ZooKeys.* 2012;174:79–93.
16. Durden LA, Blanco MB, Seabolt MH, Ginsberg H. Two new species of sucking lice (Phthiraptera: Anoplura: Polyplacidae) from endangered, hibernating lemurs (Primates: Cheirogaleidae). *J Med Entomol.* 2017;54:568–75.

Publisher’s Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions





Embryonic Development of *Pediculus humanus capitis*: Morphological Update and Proposal of New External Markers for the Differentiation Between Early, Medium, and Late Eggs

Blanca E. Álvarez-Fernández^{1,2} · M. Adela Valero^{1,3} · Benjamín Noguera-Torres⁴ · M. María Morales-Suárez-Varela^{5,6}

Received: 9 November 2022 / Accepted: 4 February 2023
© The Author(s) 2023

Abstract

Background and Objectives The head louse *Pediculus humanus capitis* is a cosmopolitan ectoparasite that causes pediculosis. In the study of human lice, little research focuses on embryonic development. Currently, external markers of embryonic development represent a new approach in the evaluation of ovicidal drugs. The objective of this work was to update the morphology of embryonic development and propose novel external markers to differentiate between early, medium, or late *P. h. capitis* eggs.

Methods Using stereoscopic light microscopy, we describe the morphological characteristics of *P. h. capitis* eggs with a special focus on embryonic development.

Results The morphological analysis of the eggs revealed the presence of an operculum with ten aeropyles, although no micropyles were observed. For the first time, the presence of defective eggs that were non-viable due to the apparent absence of yolk granules was documented. The early eggs presented yolk granules and developing germ bands, while the medium eggs presented an embryonic rudiment and the outlines of the eyes and limbs. In late eggs, the head with eyes and antennae, the thorax with three pairs of legs, and the abdomen with six pairs of spiracles were observed as formed structures. At the end of this stage, the embryos acquired the morphology of the nymph I stage.

Conclusion We propose novel biomarkers (e.g., the presence of spiracles and antennae, the proportion of the egg occupied by the embryo) to facilitate the differentiation between the developmental stages. The updated morphological characteristics of *P. h. capitis* eggs facilitate the standardization of toxicological tests in the quest for ovicidal drugs.

Keywords *Pediculus humanus capitis* · Defective eggs · Embryonic development · Yolk granules

✉ M. Adela Valero
madel.valero@uv.es

¹ Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés S/N, Burjassot, 46100 Valencia, Spain

² Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Av. Lázaro Cárdenas. Ciudad Universitaria, 39090 Chilpancingo, Guerrero, México

³ Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

⁴ Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Miguel Hidalgo, Santo Tomás, 11340 Mexico City, México

⁵ Department of Preventive Medicine and Public Health, Sciences of Eating, Toxicology and Legal Medicine, Faculty of Pharmacy, Universidad de Valencia, Av. Vicente Andrés Estellés, Burjassot, 46100 Valencia, Spain

⁶ Consorcio para la Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain

Introduction

The head louse *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) (De Geer, 1767) is a cosmopolitan ectoparasite that causes pediculosis capitis [1]. *P. h. capitis* which is a hematophagous (i.e., feeds on blood) hemimetabolous insect, lives and is reproduced on the human head [2], where it accesses nutrients directly from the venules of the scalp [3].

The diagnosis of head lice infestation is based on the finding of living lice in the hair of a person during any one of their developmental stages, i.e., egg, nymph, or adult [4], with the egg being the most frequently detected form. The use of a fine-toothed detection comb improves the efficiency of lice sampling [5–7]. Head lice infestation is relatively easy to treat with the use of topically applied agents that eliminate the insects and their eggs.

The adult female lives for about a month, when it produces approximately 300 eggs [8] that are oviposited at the base of hair shafts [2]. The eggs' average size is 0.8 mm by 0.3 mm; they have an ovoid shape and generally present a shade of yellow or white [9]. A vault-like operculum is found on the distal end of the egg [10]. The operculum has 7–11 aeropyles that occupy half of its surface [10]. During oviposition, females secrete a liquid that is then solidified, forming the nit sheath [11]. The nit sheath proteins LNSP1 and LNSP2 are essential for maintaining egg viability and also function as a glue [12]. The only part of the egg free of glue is the operculum, which protects the embryo from asphyxiation during development [11, 12].

In insects, the female must provide the eggs with sufficient nutrients to sustain embryogenesis [15]. To this end, the fatty body synthesizes massive amounts of proteins that are secreted into the hemolymph to reach the ovaries, where they are incorporated into the developing oocytes [15]. Once inside the oocyte, proteins accumulate in granules, called yolk granules [15]. This process is called vitellogenesis and normally occurs only in the terminal oocyte; subsequently, the yolk membrane, chorion, and aeropyles are formed [16].

Embryogenesis varies among insect groups or even among closely related species. In hemimetabolous species, it usually starts with the formation of the blastoderm and the germ band and terminates with organogenesis [17]. During the embryonic development of insects, events related to cellular differentiation, growth, and morphogenesis occur [18]. Since these events are crucial, toxicokinetic and toxicodynamic processes are modified during embryogenesis. These toxicological variations have been reported in several species [17–21]. In the study of human lice, little research has focused on embryonic development [22–24]. However, markers of embryonic development

currently represent a new approach to assess the toxicity of insecticides against human lice eggs [25].

Studies on the activity of pediculicidal products against eggs use different criteria to evaluate the effect on their development. In this context, viability criteria have been used to define eggs into the following categories: (a) alive, i.e., the egg is located at approximately < 1 cm from the scalp, the operculum is closed, the egg has a uniform ovoid shape and density, and an “eye spot” may appear depending on the age of the egg, (b) dead, i.e., the egg has a misshapen, shriveled, indented, or irregular shape, or the egg has a non-uniform density with parts of the egg being clear, whereas other parts of the egg are opaque, or (c) hatched, i.e., the operculum is open and the nymph is not in the egg [27]. Other studies on the efficacy of pediculicides are based on embryological development criteria such as changes in the appearance of *P. h. capitis* embryos assessed at different stages [25]. Based on the color of the ocular spots and the appearance of appendages, the developing eggs of head and body lice were previously divided into three stages: early, medium, and late. Early eggs are characterized by the absence of external markers, while medium eggs present reddish eyes and outlines of the appendages, and late eggs have developed black eyes and visible appendages [25].

The objective of this work was to update the morphology of embryonic development and propose novel external markers to differentiate between early, medium, or late *P. h. capitis* eggs that were obtained by natural infestation. To this end, stereoscopic light-field microscopy was applied. The updated morphological characteristics of the egg will facilitate the standardization of toxicological assays in the quest for ovicidal drugs.

Materials and Methods

Ethical Statement

For the collection of specimens, the necessary permits were obtained from the Municipal and School Authorities. Informed consent was obtained from the participants' parents before the study was initiated. Verbal consent from the participants was also required. The collection was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki.

Participants and Sample Collection

To identify the characteristics of the three embryonic developmental stages, *P. h. capitis* eggs ($N=722$) were obtained from 50 girls aged 7–14 years. The collection took place from June to December 2019 in the city of Chilpancingo (Guerrero, Mexico). Eggs detached from and attached to the hair at distances of 0.5–6.0 cm from the scalp were collected

by dry combing with a fine-toothed metal comb. Participants who suffered a chronic dermatological disease or had used pediculicides or antibiotics in the past 6 months were excluded.

The samples from each participant were placed in individual Eppendorf tubes filled with Karnovsky fixative (25% paraformaldehyde; 0.5% glutaraldehyde) at the moment of collection. The samples were kept at room temperature (between 17° and 20° C). The tubes were sealed with Parafilm and placed on a test-tube rack with hermetically sealed cover for transportation. A stereoscopic microscope (Nikon SMZ-U; Nikon Instruments, Tokyo, Japan) was used for the morphological analysis. Morphological identification was carried out from January to March 2020 in the Parasitology Laboratory of the Department of Parasitology of the University of Valencia (Spain). For this study, 651 eggs detached from the hair and 71 eggs attached to the hair ($N=722$) were analyzed.

Stereoscopic Microscopy

The 722 eggs were individually mounted in Petri dishes with Karnovsky fixative to avoid dehydration. To visualize the specimens, the $\times 0.75$ and $\times 7.5$ objectives were used, with the focus and light individually adjusted to observe the external morphology of the egg and through the chorion to search for embryonic development characteristics. The eggs were classified into three developmental stages according to previously reported characteristics of human lice [22–27] and the cricket *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect used as a study model in neurobiology, physiology, and genetics [30]. All eggs were photographed and subsequently stored in Eppendorf tubes with fresh Karnovsky fixative.

Results

Of the total number of eggs ($N=722$), 550 (76.17%) were considered viable based on a complete external morphology and the presence, to a greater or lesser extent, of some embryogenesis characteristics. Of the remaining 172 eggs, 168 (23.26%) had hatched and 4 (0.55%) had an intact external morphology. However, they did not contain yolk. Thus, these eggs were non-viable by default. Hereinafter, these are called defective/non-viable eggs.

The viable eggs ($N=550$) were grouped into three developmental stages according to their individual characteristics: early ($N=138$; 19.11%), medium ($N=208$; 28.80%), and late ($N=204$; 28.25%) eggs. The eggs presented a semi-transparent, amber coloration that permitted the observation of the external morphology and characteristics.

Egg Morphology

The eggs of *P. h. capitis* had an ovoid shape with an operculated anterior pole and a posterior pole presenting a blunt termination. The ventral side was semi-flattened, and the dorsal side was concave. The last third of the eggs was ventrally attached to the hair, forming nit sheaths of variable length that partially surrounded the hair (Fig. 1a). In some cases, the glue was more abundant on the apical part of the egg. The operculum, with a defined opercular edge, was convex and presented ten round protuberant cells with a central orifice, known as aeropyles. The aeropyles were arranged concentrically on the ventral side of the egg (Fig. 1b–c). The surface of the chorion was smooth and undecorated. Except for the operculum, no other orifices corresponding to micropyles were observed.

In most of the participants with mild or moderate infestations, one egg per hair was found. However, in the case of severe infestation, two viable or hatched eggs per hair were found (Fig. 1d).

Defective/Non-viable Eggs

These eggs presented the external morphology of a viable egg, without differences on a macroscopic level. Nevertheless, no internal structures were visible: the eggs appeared empty and without yolk. The defective/non-viable eggs presented a sealed operculum (Fig. 2a), unlike the hatched eggs (Fig. 1d).

Morphology of the Embryogenesis

Early Eggs

At this developmental stage, the eggs presented qualities corresponding to early embryogenesis. Eggs with abundant fine yolk granules (Fig. 2b), eggs with multiple yolk granules of variable size with a forming germ band (Fig. 2c), and eggs with yolk granules relocated to the center and an evident germ band (Fig. 2b–d) were analyzed. The presence of fine yolk granules allowed the differentiation between defective and early eggs (Fig. 2a–b).

Medium Eggs

At this stage, the eggs presented an embryonic rudiment formed from the germ band. The embryonic rudiment was found in the ventral part of the eggs and appeared as a large opaque area surrounded by yolk granules (Fig. 3a). Subsequently, a partially differentiated embryo was formed, presenting two distinct areas: in the larger and more opaque anterior area, two small anterodorsal points representing the eye outlines were observed, while the posterior area of the

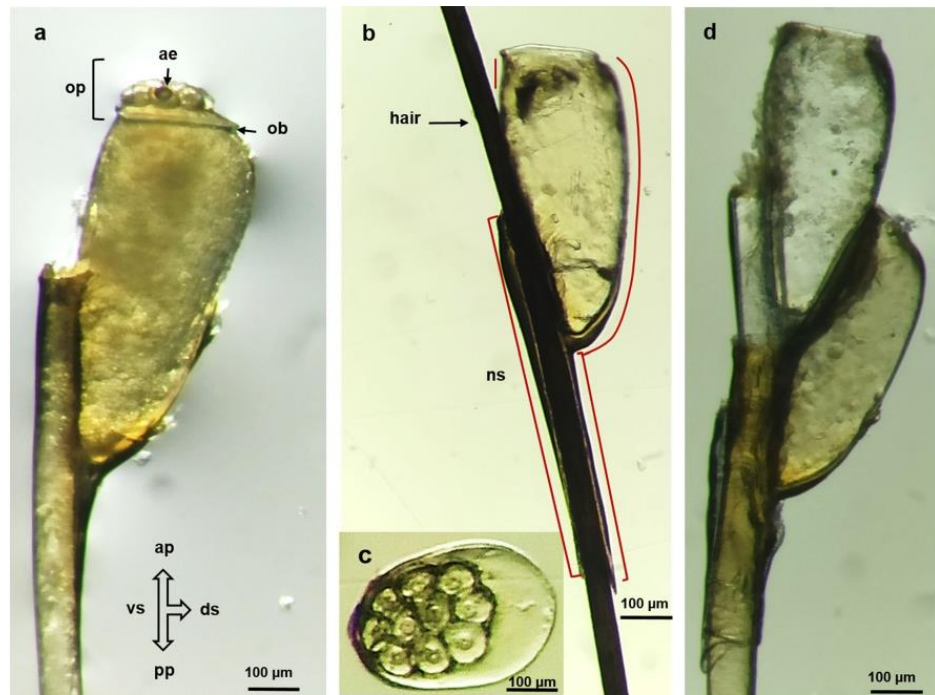


Fig. 1 Morphology the *P. h. capitis* egg under stereoscopic microscopy. **a** Fertile egg with visible ventral (vs) and dorsal sides (ds), the anterior (ap) and posterior poles (pp), the opercular pole (op), the opercular border (ob), the operculum (op), and the aeropyles (ae); 100×magnification. **b** Hatched egg. The nit sheath (ns) can be

observed, most notably in the apical part of the egg, beside the hair (orange lines). 100×magnification. **c** Detail of the operculum with ten aeropyles; 100×magnification. **d** Hair with two hatched eggs; 100×magnification

embryo was darker. The yolk granules started to fade as they concentrated in the embryo while this was defined (Fig. 3b).

Late Eggs

In the eggs of this stage, increased organogenesis was observed, with the embryos presenting differentiation and growth. The yolk granules were no longer visible around the embryo as this began to grow and become morphologically defined. In the cephalic area, the mouth primordium was observed, and the eyes appeared as two lateral red dots (Fig. 4a). Gradually, the developing structures, like the mouth cavity and the limbs, were visible (Fig. 4b). The embryo occupied approximately 70% of the egg. The orientation of the embryo followed the dorsal–ventral axis of the egg (Fig. 4a–b).

All segments continued differentiating as the embryo increased in size. The three segments corresponding to the head, thorax, and abdomen were visible. On the head, two pigmented large eyes and the ventrally folded antennae

were distinguished. The thorax presented three pairs of well-developed legs with visible tarsal claws (Fig. 4c). On the abdomen, six lateral points that corresponded to the spiracles were identified. In the final phase of development, the embryo occupied approximately 95% of the egg, with a free space in the apical part. The cuticle was dark, and the insect had acquired the morphology of the nymph I stage with the ability to hatch (Fig. 4d).

All the eggs were observed at different angles. However, observation from the side provided greater and more consistent morphological information, possibly coinciding with the position that the larva adopts during its development.

Discussion

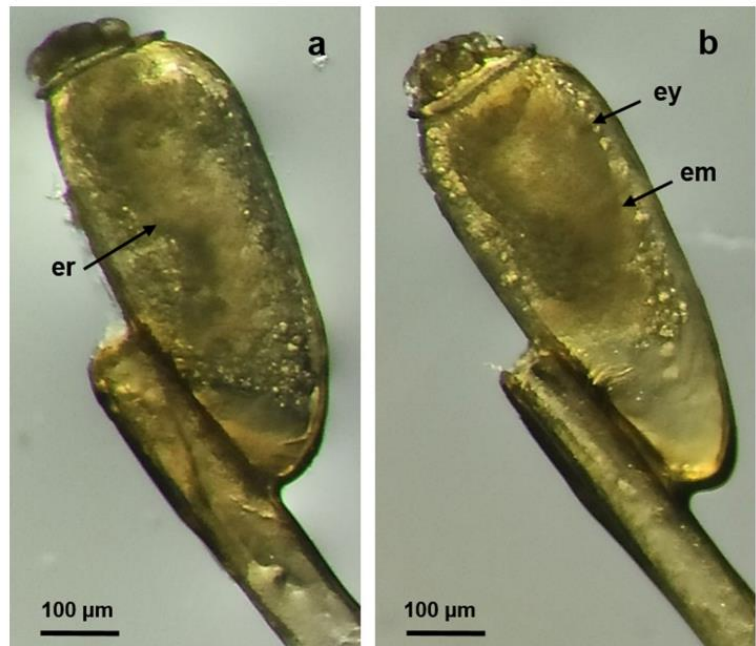
Using stereoscopic microscopy, the external morphology of *P. h. capitis* eggs was described, and many fine morphological characteristics of the embryo were identified through the chorion. The studied sample included empty



Fig. 2 Morphology of defective/non-viable and early *P. h. capitis* eggs. **a** The defective/non-viable egg does not present yolk; 100× magnification. **b–d** Early eggs. **b** Egg with abundant fine yolk granules (*); 100× magnification. **c** Egg with multiple yolk granules

of variable size (***) and a forming germ band (gb); 100× magnification **d** Egg with yolk granules relocated to the center (***) and an evident germ band (gb); 100× magnification

Fig. 3 Morphology of medium *P. h. capitis* eggs. **a** Egg with an embryonic rudiment (er). A large opaque area surrounded by yolk granules can be observed; 100× magnification. **b** Egg with a partially differentiated embryo (em). The eye outlines (ey) and less visible yolk granules can be observed; 100× magnification



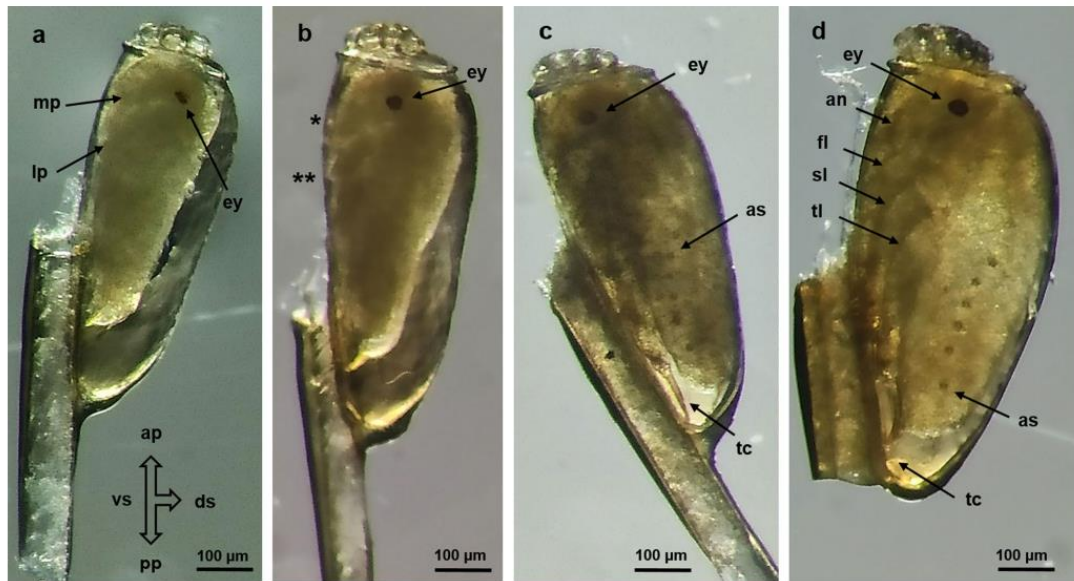


Fig. 4 Morphology of late *P. h. capitis* eggs. **a–d** Eggs with visible embryos. **a** The cephalic area, mouth primordium (mp), red eyes (ey), and leg primordium (lp) can be seen; 100× magnification. **b** The mouthparts (*) and legs in development (**) are visible, while the yolk granules surrounding the embryo can no longer be observed; 100× magnification. **c–d** Two large, pigmented eyes (ey), the anten-

nae (an), the first-to-third pairs of folded legs (fl, sl, tl), and the tarsal claw (tc) can be observed; 100× magnification. **d** In the final developmental stage (nymph I stage), all structures and segments are defined: the cuticle is dark and six pairs of marked abdominal spiracles (as) are visible. The nymph I is ready to hatch

hatched eggs and non-hatched eggs with a content ranging from fine yolk granules to a developed embryo or, at a low percentage, defective eggs without content. These results highlight the need for large magnification to evaluate the eggs' development and viability.

In the analyzed sample, 23.26% of the eggs had hatched. As the hair grows, empty eggshells accompany it moving away from the scalp, where nits, a term proposed to refer to the empty eggshell [31], become easier to detect. Although these shells are harmless, they are cosmetically inappropriate according to the modern rules of esthetics. They also indicate prior lice infestation, which can result in stigmatization.

In this study, both viable and defective/non-viable eggs presented an operculum with ten aeropyles, confirming previous reports [30, 31]. In almost all insects, spermatozoa enter the eggs through micropyles [16], with some eggs presenting multiple micropyles [33]. However, in this study, no such structure was identified, following the lack of evidence that exists in the *P. h. capitis*-related literature regarding this structure. This highlights the need to employ other microscopic techniques to study the possible existence, number, and position of micropyles in the egg.

The finding of defective/non-viable eggs could be related to the age of the females. It has been reported that many of the eggs of *P. h. capitis* females that are older than 2 weeks are not viable [8]. In *Musca domestica*, when an ovary has mature eggs, an oostatic hormone is produced to prevent the release of developmental neurosecretory hormone from the egg necessary for vitellogenesis [16]. This suggests that the older females of *P. h. capitis* could activate chemical signals that affect protein synthesis by the fatty body, impeding vitellogenesis in some eggs. Consequently, factors such as the age of female *P. h. capitis* and the possible activation of chemical signals could partially explain the presence of defective/non-viable eggs. Moreover, the low percentage of defective/non-viable eggs in our study could be due to the fact that the sample was oviposited by females of different ages. It should be noted that this is the first study to document these eggs. Future research should consider this finding and conduct novel investigations to clarify the true percentage of defective/non-viable eggs oviposited by females of different ages. In this context, the need for further investigation to elucidate the physiological mechanisms underlying this phenomenon in *P. h. capitis* is crucial.

Table 1 Markers of embryonic development proposed in previous works and the present study

Egg classification	Previously proposed embryonic development markers	Proposed embryonic development markers and markers of viability and fecundity in this study									
Early eggs	Fine yolk granule content Formation of yolk masses of variable size [24] Absence of external markers [25]	Abundant fine yolk granules Multiple yolk granules of variable size and a forming germ band* Yolk granules in the center of the egg and an evident germ band* Viability marker: external integrity of the egg and yolk granule content* Fecundity marker: development of germ band*									
Medium eggs	Milky, slightly opaque areas Limb formation [24] Reddish eyes and appendages outlines [25]	Embryonic rudiment: large opaque area surrounded by yolk granules* Partially differentiated embryo. Anterior area: opaque and larger, with two small anterodorsal spots (outlines of the eyes); posterior area: darker									
Late eggs	The body and the limbs are more clearly defined [24] The eyes are visible and appear as two pink anterolateral spots [24] Black eyes and visible appendages [25]	Defined embryo The yolk granules are not visible around the embryo* The embryo occupies approximately 70% of the egg* (Cephalic area, red eyes, mouth primordium, leg primordium, mouthparts, and developing legs									
		The embryo occupies approximately 95% of the egg* <table border="0" style="margin-left: 20px;"> <tr> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 0 5px;">Head</td> <td style="padding: 0 5px;">:</td> <td>large pigmented eyes, ventrally folded antennae</td> </tr> <tr> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 0 5px;">Thorax</td> <td style="padding: 0 5px;">:</td> <td>three pairs of well – developed legs, tarsal claws</td> </tr> <tr> <td style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; padding: 0 5px;">Abdomen</td> <td style="padding: 0 5px;">:</td> <td>six pairs of spiracles, dark cuticle</td> </tr> </table>	Head	:	large pigmented eyes, ventrally folded antennae	Thorax	:	three pairs of well – developed legs, tarsal claws	Abdomen	:	six pairs of spiracles, dark cuticle
Head	:	large pigmented eyes, ventrally folded antennae									
Thorax	:	three pairs of well – developed legs, tarsal claws									
Abdomen	:	six pairs of spiracles, dark cuticle									

Data taken from Nuttall (1917) [24] and Cueto et al. (2006) [25]

* Markers proposed

Embryogenesis has been studied mostly in holometabolous insects, including the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, the beetle of the flour, *Tribolium castaneum*, and the moth silk, *Bombyx mori* [34]. The morphological characteristics of *P. h. capitis*' embryonic development described here permit the general comparison with the cricket's (*Gryllus bimaculatus*) development [30]. However, several physiological events in head louse development may be specific to their hematophagous nature.

Here, new markers are proposed for the differentiation between the three embryogenesis stages. As for the early eggs, some virgin females of *P. h. capitis* have been considered to lay eggs without fertilization [12], similar to females that have mated [24]. Consequently, we added viability and fecundity markers to this stage. The viability markers involved assessing the external integrity of the egg and its content, i.e., yolk granules, which are the main reserve of nutrients during embryonic development. The fecundity marker is the development of the germ band, which indicates that the egg was fertilized before oviposition. These markers can be observed between days 1–2 post-oviposition [24]. Previously, it was believed that this stage is devoid of markers [25]. However, in this study, we consider that this stage is crucial for the progression of embryogenesis, provided there is an optimal microenvironment for it (Table 1).

The finding of defective/non-viable eggs allowed the establishment of morphological differences with early eggs that present fine yolk granules. Theoretically, embryogenesis will not be carried out in defective/non-viable eggs due to the apparent absence of yolk, contrary to early eggs. Usually, all eggs that are located at < 1 cm from the scalp are considered alive [27]. This should be taken with caution, and the possibility of finding defective/non-viable and infertile eggs should be contemplated when testing ovicidal drugs.

As for the strengths of this study, it provides a novel description of the embryonic development stages of *P. h. capitis* while confirming the morphological characteristics of medium and late eggs presented in previous reports [22, 23]. Furthermore, we propose additional biomarkers (e.g., the presence of the mouth primordium, spiracles and antennae, the development of tarsal claws, and the proportion of the egg occupied by the embryo) to facilitate the differentiation between stages. These morphological characteristics appear between days 3–4 (medium egg) and 5–7 (late egg) post-oviposition [24]. In this context, it should be noted that the development and hatching rate of the eggs is influenced by the environmental conditions (e.g., temperature and relative humidity), with registered variations dependent on the conducted experiments [22, 24, 26, 34]. Due to the lack of a standardized *in vitro* system for the breeding of head lice, morphological markers of embryonic development are a better reference regardless of the age of the eggs.

Like any study, this work is not devoid of weaknesses, such as the possible bias of information concerning the origin and transport of the samples. As for the origin, we could not collect more data on the environmental and individual variables of the parasitized participants due to the low number of cases. Regarding the transport, after reviewing all transport phases, we found no justification for the presence of these defective/non-viable eggs.

Research on ovicidal activity has made it necessary to update the morphological characteristics of embryogenesis in *P. h. capitis*. Considering that susceptibility to insecticides may vary depending on the embryonic developmental stage [26], this update could be useful and facilitate the standardized evaluation of new drugs with ovicidal activity. In this vein, ovicides could be classified as broad-spectrum, when interrupting the embryogenesis process at all stages, or selective spectrum, when they intervene in specific developmental stages. The majority of studies evaluating drugs for insect control have focused on the adult or immature stage, overlooking the egg stage, resulting in an increase in insecticide resistance. Indeed, this has been observed during the recent emergence of bed bug infestation, *Cimex lectularius* L., and the presence of populations resistant to pyrethroid insecticides [36]. Such resistance has been also documented in insects like triatomine bugs [37]. In agriculture plagues, resistance to common insecticides has increased during the last eight decades [38, 39]. Although some oral medications for human use can affect fecundity and mortality of hematophagous insects, such as *Cimex lectularius* L., the required dosage in most studies reaches the maximum permitted concentration in plasma [40]. Therefore, our findings highlight the relevance of studying embryogenesis as a potential target for ovicidal drugs. This focus could also be applied to other insects of sanitary or agricultural interest, as a strategy for managing and controlling these populations.

Conclusion

This paper presents an update on the morphology of *P. h. capitis* eggs and the embryonic development characteristics that are visible through the chorion using stereoscopic microscopy. The classification of embryonic developmental stages could be used as a reference for toxicological tests to facilitate the standardized evaluation of the ovicidal activity of new drugs. Our results highlight the need to delve into the description of eggs at a structural and physiological level for a better understanding of embryogenesis. Since the morphological information in the scientific literature is still limited, future studies that elaborate on relevant information concerning embryonic development are necessary for related toxicological tests.

Acknowledgements We want to thank the former rector of the Universidad Autónoma de Guerrero, Dr. Javier Saldaña Almazán, for all the administrative and personal support.

Author Contributions MAV, MMMS-V, and BEA-F: conceptualization of the study. BEA-F: collection of the insects. MAV, BEA-F, and MMMS-V: methodology. BEAF: image acquisition. BEA-F, MAV, MMMS-V, and BN-T: data analysis. BEA-F, BN-T, MAV, and MMMS-V: manuscript writing, review, and editing. All authors read and approved the final manuscript.

Funding Open Access funding provided thanks to the CRUE-CSIC agreement with Springer Nature. BEAF was supported by a fellowship of the “Programa de Estímulo al Desarrollo Académico”, Universidad Autónoma de Guerrero to carry out her doctoral studies at the University of Valencia. The collaboration with the Valencia Center was funded by the PROMETEO Program (Programa de Ayudas para Grupos de Investigación de Excelencia, Generalitat Valenciana; Grant Numbers: 2016/099, 2021/004), Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales (ISCIII-subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa RETICS, Ministry of Science and Innovation (Grant Number: RD16/0027/0023), and CIBER -Consorcio Centro de Investigación Biomédica en Red- (RD16/0027/0023; CB21/13/00056; CB06/02/0045), Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación and Unión Europea – NextGenerationEU. Technical support was provided by the Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) of Universidad de Valencia.

Data availability The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Conflict of Interest The authors declare no conflict of interests.

Ethical Approval The research protocol was approved by the Bioethics Committee of the Universidad Autónoma de Guerrero, Mexico (Folio: CB-009/19) and written informed consent was obtained from all subjects.

Human and Animal Rights No animals were used in this study. All human research procedures were in accordance with the standards set forth in the Declaration of Helsinki (<https://www.wma.net/policiespost/wmadeclaration-of-helsinki-ethical>) principles for medical research involving animals subjects/ principles of 1975, as revised in 2008 (<http://www.wma.net/en/20activities/10ethics/10helsinki/>).

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Galassi FG, Fronza G, Toloza AC, Picollo MI, González-Audino P (2018) Response of *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae) to volatiles of whole and individual components of the human scalp. *J Med Entomol* 55:527–533. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx243>
- Amanzougaghene N, Fenollar F, Raoult D, Mediannikov O (2020) Where are we with human lice? A review of the current state of knowledge. *Front Cell Infect Microbiol* 9:1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00474>
- Núñez H, Arriaza B, Standen V, Aravena N (2017) Comparative study of the claws of *Pediculus humanus capitis* between archaeological and modern specimens. *Micron* 95:31–34. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.01.007>
- Pollack RJ, Kiszewski AE, Spielman A (2000) Overdiagnosis and consequent mismanagement of head louse infestations in North America. *Pediatr Infect Dis J* 19:689–693. <https://doi.org/10.1097/00006454-200008000-00003>
- Ibarra J (1988) How to detect head lice: the changing emphasis in health education. *Heal Sch* 3:109–112
- Mumcuoglu KY, Friger M, Ioffe-Uspensky I, Ben-Ishai F, Miller J (2001) Louse comb versus direct visual examination for the diagnosis of head louse infestations. *Pediatr Dermatol* 18:9–12. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1470.2001.018001009.x>
- Balcioglu C, Burgess IF, Limoncu ME, Şahin MT, Ozbek Y, Bilaç C et al (2008) Plastic detection comb better than visual screening for diagnosis of head louse infestation. *Epidemiol Infect* 136:1425–1431. <https://doi.org/10.1017/S0950268807000118>
- Lehane M (2005) The blood-sucking insect groups. In: Lehane M (ed) *The biology blood-sucking insects*, 2nd edn. Cambridge University, New York, pp 202–258
- Laguna MF, Risau-Gusman S (2011) Of lice and math: using models to understand and control populations of head lice. *PLoS ONE* 6:e21848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021848>
- Burkhart CN, Burkhart CG, Gunning WT, Arbogast J (1999) Scanning electron microscopy of human head louse (*Anoplura: Pediculidae*) egg and its clinical ramifications. *J Med Entomol* 36:454–456. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.4.454>
- Dutra JMF, Alves AD, Pessanha T, Rachid R, De Souza W, Linardi PM et al (2014) Prehistorical *Pediculus humanus capitis* infestation: quantitative data and low vacuum scanning microscopy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 56:115–119. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000200005>
- Kim JH, Lee DE, Park S, Clark JM, Lee SH (2021) Characterization of nit sheath protein functions and transglutaminase-mediated cross-linking in the human head louse, *Pediculus humanus capitis*. *Parasit Vectors* 14:1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04914-z>
- Burkhart CN, Burkhart CG (2005) Head lice: Scientific assessment of the nit sheath with clinical ramifications and therapeutic options. *J Am Acad Dermatol* 53:129–133. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.01.134>
- Burkhart CN, Burkhart CG (2007) Fomite transmission in head lice. *J Am Acad Dermatol* 56:1044–1047. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.10.979>
- Oliveira DMP, Gomes FM, Carvalho DB, Ramos I, Carneiro AB, Silva-Neto MAC et al (2013) Yolk hydrolases in the eggs of *Anticarsia gemmatilis hubner* (Lepidoptera: Noctuidae): a role for inorganic polyphosphate towards yolk mobilization. *J Insect Physiol* 59:1242–1249. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.09.008>
- Gillott C (1995) Reproduction. In: Gillott C (ed) *Entomology*, 2nd edn. Springer, New York, pp 540–567

17. Belles X (2020) The hemimetabolan development. In: Belles X (ed) Insect metamorph, 1st edn. Academic, United Kingdom, pp 47–70. <https://doi.org/10.1016/c2016-0-04530-8>
18. Gilbert SF (1997) Developmental biology, 5th edn. Sunderland, Massachusetts
19. Tahmisian TN (1943) Enzymes in ontogenesis: choline-esterase in developing *Melanoplus differentialis* eggs. *J Exp Zool* 92:199–213. <https://doi.org/10.1002/jez.1400920205>
20. Smith EH, Wagenknecht AC (1959) The ovicidal action of organophosphate insecticides. *Can J Biochem Physiol* 37:1135–1144. <https://doi.org/10.1139/o59-125>
21. Smith EH, Salkeld EH (1966) The use and action of ovicides. *Annu Rev Entomol* 11:331–368. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.11.010166.001555>
22. Smallman BN, Mansingh A (1969) The cholinergic system in insect development. *Annu Rev Entomol* 14:387–408. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.002131>
23. de Villar MIP, Zerba EN, Wood E, de Licastro S (1980) Neurogenesis and occurrence of cholinesterase in eggs of *Triatoma infestans*. *Comp Biochem Physiol Part C, Comp* 65:65–70. [https://doi.org/10.1016/0306-4492\(80\)90047-7](https://doi.org/10.1016/0306-4492(80)90047-7)
24. Nuttall GHF (1917) The biology of *Pediculus humanus*. *Parasitology* 10:80–185. <https://doi.org/10.1017/S003118200003747>
25. Cueto GM, Zerba E, Picollo MI (2006) Embryonic development of human lice: rearing conditions and susceptibility to spinosad. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101:257–261. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000300005>
26. Sonnberg S, Oliveira FA, Araujo de Melo IL, de Melo Soares MM, Becher H, Heukelbach J (2014) *Ex vivo* development of eggs from head lice (*Pediculus humanus capitis*). *Open Dermatol J* 4:82–89. <https://doi.org/10.2174/1874372201004010082>
27. Barker SC, Altman PM (2011) An *ex vivo*, assessor blind, randomised, parallel group, comparative efficacy trial of the ovicidal activity of three pediculicides after a single application - melaleuca oil and lavender oil, eucalyptus oil and lemon tea tree oil, and a “suffocation” pediculicide. *BMC Dermatol* 11:1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-5945-11-14>
28. Al-marjan K, Koyee Q, Abdullah SMA (2015) *In vitro* study on the morphological development of eggs (nits) and other stages of head lice *Pediculus humanus capitis* De Geer, 1767. *Zanco J Pure Appl Sci* 27:35–40
29. Bowles VM, Yoon KS, Barker SC, Tran C, Rhodes C, Clark MJ (2017) Ovicidal efficacy of Abametapir against eggs of human head and body lice (Anoplura: Pediculidae). *J Med Entomol* 54:167–172. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw132>
30. Donoughe S, Extavour CG (2016) Embryonic development of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Biol* 411:140–156. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2015.04.009>
31. Maunder JW (1983) The appreciation of lice. *Proc R Inst G B* 55:1–31
32. Mehlhorn H, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KAS, Schmidt J, Semmler M (2011) Ovicidal effects of a neem seed extract preparation on eggs of body and head lice. *Parasitol Res* 109:1299–1302. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2374-8>
33. Resh V, Cardé R (2009) Encyclopedia of insects, 2nd edn. Academic, California. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.X0001-X>
34. Panfilio KA (2008) Extraembryonic development in insects and the acrobatics of blastokinesis. *Dev Biol* 313:471–491. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.11.004>
35. Devore CD, Schutze GE (2015) Head lice. *Pediatrics* 135:e1355–e1365. <https://doi.org/10.1542/peds.2015-0746>
36. Gonzalez-Morales MA, Romero A (2019) Effect of synergists on Deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). *J Econ Entomol* 112:786–791. <https://doi.org/10.1093/jeet/toy376>
37. Fabro J, Sterkel M, Capriotti N, Mougabure-Cueto G, Germano M, Rivera-Pomar R et al (2012) Identification of a point mutation associated with pyrethroid resistance in the para-type sodium channel of *Triatoma infestans*, a vector of Chagas’ disease. *Infect Genet Evol* 12:487–491. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.006>
38. Pérez CJ, Alvarado P, Narváez C, Miranda F, Hernández L, Vane-gas H et al (2000) Assessment of insecticide resistance in five insect pests attacking field and vegetable crops in Nicaragua. *J Econ Entomol* 93:1779–1787. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.6.1779>
39. Metcalf RL (1989) Insect resistance to insecticides. *Pestic Sci* 26:333–358. <https://doi.org/10.1002/ps.2780260403>
40. Sheele JM, Ridge GE, Du W, Mallipeddi N, Vallabhaneni M (2017) A screen of pharmaceutical drugs for their ability to cause short-term morbidity and mortality in the common bed bug, *Cimex lectularius* L. *Parasitol Res* 116:2619–2626. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5565-0>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.