

TESIS DOCTORAL

Coadaptación entre *Antarctophthirus microchir*
(Anoplura: Echinophthiriidae) y el lobo
marino de un pelo (*Otaria flavescens*) en
Patagonia y sus implicancias en la
morfología, dinámica poblacional
y ciclo reproductivo del parásito

Lic. María Soledad Leonardi

Director: Dr. Enrique A. Crespo
Codirector: Dr. F. Javier Aznar Avendaño



UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA





UNIVERSIDAD NACIONAL
de MAR DEL PLATA
.....

Coadaptación entre *Antarctophthirus microchir* (Anoplura: Echinophthiriidae) y el lobo marino de un pelo (*Otaria flavescens*) en Patagonia y sus implicancias en la morfología, dinámica poblacional y ciclo reproductivo del parásito

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias (Área Biología)

por

Lic. María Soledad Leonardi

Director de Tesis: Dr. Enrique A. Crespo

Codirector de Tesis: Dr. F. Javier Aznar Avendaño

Lugar de trabajo: Unidad de Biología y Manejo de Recursos Acuáticos

Centro Nacional Patagónico, CONICET

Puerto Madryn, Argentina.

Puerto Madryn, 28 de Marzo, 2014

*A los que buscan
aunque no encuentren*

*A los que avanzan
aunque se pierdan*

*A los que viven
aunque se mueran*

Maric Benedetti

A mi mamá y mi papá.

Resumen

A lo largo de esta tesis se tratan diversos aspectos del proceso coadaptativo entre el piojo anopluro *Antarctophthirus microchir* Trouessart y Neumann, 1888 (Anoplura, Echinophthiriidae) y su hospedador, el lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). El sistema resulta particularmente interesante dado que los anopluros son de origen terrestre y están generalmente adaptados al medio aéreo. Sin embargo, *A. microchir* pertenece a una familia, Echinophthiriidae, que es exclusiva de pinnípedos y nutrias. La vida anfibia de estos hospedadores ha impuesto grandes restricciones para que los equinoftridos puedan completar su ciclo y puedan sobrevivir bajo el agua. Dado que los anopluros parecen ser incapaces de reproducirse bajo el agua, los equinoftridos deben ajustar sus eventos reproductivos a los de su hospedador, particularmente en aquellas especies de pinnípedos cuyo pelaje se empapa durante las inmersiones. Se considera que, evolutivamente, ha habido un proceso de coadaptación estrecha que varía de especie a especie dependiendo de la biología del hospedador. El objetivo de la presente tesis fue estudiar este proceso adaptativo en el caso de *A. microchir*, evaluando sus adaptaciones morfológicas y ecológicas. El estudio se llevó a cabo en la Reserva Provincial de Fauna Punta León durante cinco temporadas reproductivas consecutivas (2007 a 2011) del lobo marino de un pelo. El muestreo se centró en las crías de lobo marino, la clase etaria clave en la dinámica poblacional de *A. microchir*. Como primer paso se realizó la revisión taxonómica de la especie, la cual resultaba conflictiva debido a la pérdida del holotipo, la parquedad de la descripción original y la falta de la determinación previa de *A. microchir* como parásita del lobo marino de un pelo. Se realizó la redescipción de los adultos de *A. microchir* y se describieron, por primera vez para la especie, los estadios ninfales. *Antarctophthirus microchir* se ha citado en 5 especies de hospedadores y es posible que en realidad represente un complejo de especies no fácilmente diferenciables mediante caracteres morfológicos. Posteriormente se abordó el estudio de la dinámica poblacional de la especie para determinar las restricciones propias del ciclo. El ciclo de vida se infirió siguiendo diferentes crías a lo largo del tiempo. Se realizó un modelo de proyección para entender el proceso demográfico de los piojos. Los resultados indicaron que *A. microchir* completa su ciclo en aproximadamente 20 días; se requieren 9 días para que se desarrollen los huevos y un mínimo de 8 días para que se desarrollen los tres estadios ninfales. Por otro lado, se aportó evidencia de que la principal vía de transmisión es vertical y que las crías de lobo marino juegan un rol fundamental en la ecología de los piojos, dado que son el único grupo de edad que permanece suficiente tiempo en tierra para garantizar el desarrollo completo del ciclo. El hecho que los huevos no sobrevivan a las inmersiones de sus hospedadores obliga a un ajuste del ciclo reproductivo, de forma que la reproducción sólo puede tener lugar cuando sus hospedadores permanecen en tierra el tiempo suficiente. Bajo este marco se abordaron los capítulos siguientes. Utilizando el microscopio electrónico de barrido se analizó la ultraestructura de *A. microchir*, y se describieron las adaptaciones morfológicas de la especie al medio marino. Esta técnica, utilizada por primera vez en ninfas de la familia, evidenció muchas de las estructuras corporales que han permitido la adaptación de estos organismos al medio marino: el patrón de quetotaxia, el gran desarrollo de sus

patas, la estructura membranosa de su abdomen, por mencionar las más importantes. En los capítulos finales se estudiaron aspectos ecológicos relacionados con la transmisión y la selección de hábitat en el hospedador. En concreto, se analizaron, por primera vez en equinoftíridos, la selección de microhábitat en las crías de lobo marino y el patrón de transmisión vertical, desde una perspectiva cuantitativa. Respecto a la selección de microhábitat, se describió, por primera vez para un piojo anopluro, los patrones de selección de hábitat de cada uno de sus estadios. Los resultados indicaron que existía una selección diferencial que respondería a los requerimientos fisiológicos de cada estadio, los cuáles varían en función del proceso que se considere (ovoposición, morfogénesis, eclosión o desarrollo ontogenético). *Antarctophthirus microchir* parece preferir la región ventral del cuerpo del hospedador para su desarrollo y cópula, y el área dorsal para la ovoposición. Considerando que diariamente las crías de lobo marino se mojan por la influencia de la marea, y que la alta humedad relativa es un factor de mortalidad de los huevos, se podría inferir que los piojos seleccionan el área dorsal para la ovoposición dado que esta zona se seca más rápidamente. Sin embargo, la zona ventral, al mantener una humedad mayor, sería el sitio de preferencia de los restantes estadios ya que ello minimizaría el riesgo de desecación en un lugar con baja humedad relativa, tan árido como la Patagonia. Resulta interesante que este patrón difiere al descrito para piojos que infectan hospedadores de distribución polar o sub-polar. Estas especies seleccionan las aletas de su hospedador, probablemente por ser la región del cuerpo que mantiene la temperatura más constante. Respecto al estudio de transmisión vertical en *A. microchir*, los resultados sugieren que se trata de un proceso clave en el ciclo reproductivo, del cual depende el inicio de cada uno de los ciclos anuales y su perpetuación en el tiempo. Las crías recién nacidas estuvieron infectadas en mayor medida por adultos, particularmente hembras, aunque este patrón se diluyó en crías de mayor edad. Entre las ninfas, la menor tasa de reclutamiento se observó entre las ninfas 1. Aunque otras hipótesis no son enteramente descartables, el patrón observado es congruente con la idea de que existen diferencias entre los estadios en la capacidad motriz y/o de detección de las crías de lobo que han sido potenciadas por un proceso de selección natural. En un ciclo reproductivo temporalmente tan restringido, los adultos, especialmente las hembras obtendrían mayores beneficios reproductivos que las ninfas al transferirse lo antes posible a las crías de lobo, donde el ciclo tiene mayores posibilidades de completarse. Los resultados obtenidos en la presente tesis aportan evidencias el largo proceso coevolutivo entre *A. microchir* y el lobo marino de un pelo, así como la estrecha relación entre el comportamiento y la biología del parásito con la de su hospedador. Futuros estudios en diferentes especies de pinnípedos permitirán elucidar las adaptaciones de las especies de Echinophthiriidae, analizando los compromisos (*trade-offs*) a los cuales se encuentran sometidas y las respuestas adaptativas que de ellos se derivan.

II

Palabras clave: *Antarctophthirus microchir*, coadaptación, Echinophthiriidae, ectoparásito, lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, piojos.

Abstract

This thesis addresses a number of aspects of the co-evolution between the louse *Antarctophthirus microchir* Trouessart and Neumann, 1888 (Anoplura, Echinophthiriidae) and its host, the South American sea lion, *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). This system shows interesting features given that the Anoplura are of terrestrial origin, and they are adapted to the air environment. However, *A. microchir* belongs to a family, Echinophthiriidae, which is exclusive to pinnipeds and otters. Amphibious life of the hosts has imposed serious restrictions on the life cycle of the lice. Specifically, lice seem unable to reproduce underwater and must adjust their reproductive events to those of their host. It is considered that, evolutionarily, there has been a close co-adaptation process that varies from species to species depending on the biology of the host. The objective of this thesis was to study this adaptive process, evaluating the morphological and ecological characteristics of *A. microchir*. These aspects were individually considered in each chapter, working on diverse adaptations of *A. microchir* to South American sea lions. This study was carried out throughout five consecutive years (2007–2011) in the sea lion rookery of Punta León, Chubut Province, Argentina. Sampling was restricted to pups because reproduction of this louse species is mostly dependent on sea lion pups because pups stay continuously on land for longer periods than any other age group. The first chapter focalizes in the taxonomic revision of the species, which was troubled by the loss of the holotype, the brief original description and the lack of a reliable determination on this host. Adults were redescribed and, for the first time, the three nymphal stages were described. Considering the conservative morphology, and ecological and evolutionary features of sucking lice, we raise the question of whether *A. microchir* from different sea lion hosts may represent a complex of cryptic species. Then, the population dynamics of the species was studied to determine the constraints of the cycle. Infestation patterns in pups ≤ 3 days old suggested that the potential for transmission increased from nymphs 1 to adults. Population trends of each instars with pup age, based on standardised values of abundance, were conserved between years, reflecting the basic dynamics of recruitment and reproduction. However, trends based on log-transformed abundances varied significantly between years; apparently, environmental conditions affected growth of lice populations differently each year. Stage-based deterministic models for population growth of *A. microchir* suggested generation times from 18 to 23 days. Accordingly, only two lice generations might be produced before pups start going to the sea. Shortening the cycle to accommodate a third generation might be risky, whereas a two generation cycle might at least result in larger females producing higher numbers of viable offspring. The following chapters were approached within this framework. The ultra-structure of *A. microchir* was analyzed by scanning electron microscopy, identifying the morphological adaptations of the species to the marine environment. This technique, used by first time in echinophthiriid nymphs, show many features of these organisms associated to their adaptations to the marine environment, i.e. chaetotaxis pattern, great development of legs, membranous structure of the abdomen. In the final chapters, the ecological aspects related to habitat selection and the pattern of vertical

transmission was studied. For the first time to an anoplurans louse the habitat selection was described for each stage, which revealed a differential selection among stages. These differences in the pattern of habitat selection would respond to physiological requirements of each process, i.e. oviposition, morphogenesis, hatching or ontogenetic development. Accordingly, it appears that *A. microchir* would prefer the host's ventral area for development and copulation and the dorsal area for oviposition. eggs are laid on the dorsal surface; nymphs 1 hatch there and then migrate to the belly, where they develop into adults and copulate; and then ovigerous females return to the dorsal surface. On the one hand, nymphs 1 are characterised by their low locomotory ability; therefore, the fact that they migrate as soon as they hatch suggests a clear pressure leading to microhabitat restriction. On the other hand, the described pattern of microhabitat selection seems to respond to the physiological requirements of each stage, which vary according to the physiological process considered, e.g. oviposition, morphogenesis, hatching and development. Accordingly, it appears that *A. microchir* would prefer the host's ventral area for development and copulation and the dorsal area for oviposition. However, the causes of this pattern are not clear, and many factors could be involved. Considering that sea lion pups periodically soak at high tides, and that prolonged immersion and very high humidity are known to be lethal for lice eggs, selecting the dorsal area would be advantageous for oviposition because it dries much faster. Furthermore, because humidity should be retained for longer periods on the ventral surface of the pup, wetter conditions on the sea lion would prevent desiccation of the nymphs in the very arid environment where *O. flavescens* breeds. Over 60% of 1-day-old pups were already infected with *A. microchir*, and the recruitment patterns exhibited a curvilinear trend, with a peak of recruitment in 3-days-old pups. Newborn pups harbored more adults, and females, of *A. microchir* than nymphs and males, respectively, although this pattern of recruitment is not always conserved in older pups. Among nymphs, the lowest recruitment rate was observed in nymphs 1. This pattern could respond to the relative ability of louse to pass from cows onto pups as well as a process of natural selection, favoring transmission of adults, especially females, because they accrue greater fitness within the tight reproductive schedule of *A. microchir*. The results obtained in this thesis show the long co-evolutionary process between *A. microchir* and South American sea lions and the close relationship between behaviour and biology of the parasite with its host. Future studies in different species of pinnipeds, will elucidate the evolutionary adaptations of Echinophthirids, analyzing the trade-offs to which they are subjected and the adaptive responses to them.

Keywords: *Antarctophthirus microchir*, coadaptation, Echinophthiriidae, ectoparasite, lice, *Otaria flavescens*, South American sea lion.

Agradecimientos

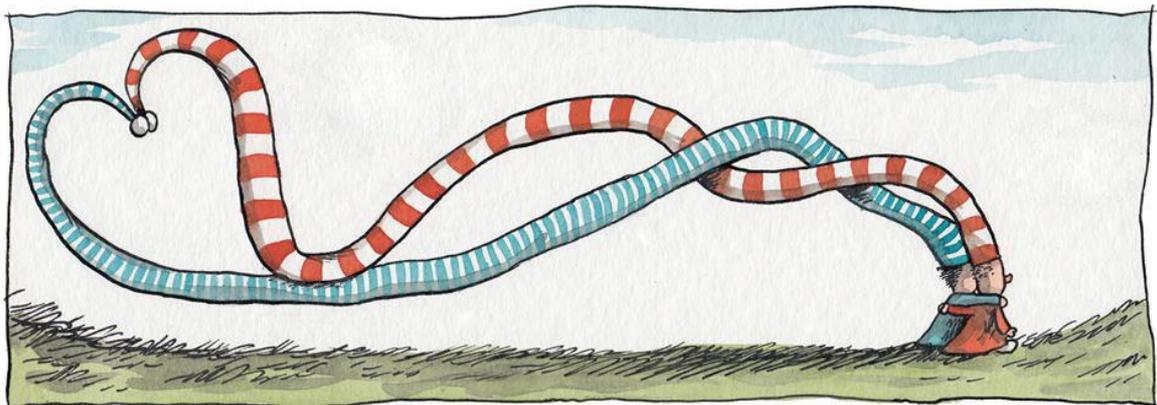
Un hombre del pueblo de Neguá, en la costa de Colombia, pudo subir al alto cielo. A la vuelta, contó. Dijo que había contemplado, desde allá arriba, la vida humana. Y dijo que somos un mar de fueguitos.

—El mundo es eso —reveló—. Un montón de gente, un mar de fueguitos.

Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás.

No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos de todos los colores. Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento, y gente de fuego loco, que llena el aire de chispas. Algunos fuegos, fuegos bobos, no alumbran ni queman; pero otros arden la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.

Eduardo Galeano



Gracias...

En el transcurso de estos años siempre pensé que esta sección sería la más importante de la tesis. Nunca imaginé cuánto. Cada escritura y re-escritura de estas líneas implicaba más y más gente que se ganaba mi más profundo agradecimiento, nuevos amigos que se sumaban al camino, más y más sobrinos y sobrinas y, con bastante tristeza, algunas personas que siempre estarán presentes pero no podrán leer estas palabras. En lo que sigue quiero dejar plasmado mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que hicieron posible que esta tesis fuera finalmente defendida; y también a aquellas personas que hicieron todo lo posible para que no sucediera, porque gracias a ellas descubrí una templanza que desconocía en mí, porque es mucho lo que aprendí en este proceso y porque me hizo valorar a todos los que estuvieron firmes ahí, apoyando, conteniendo. Gracias a ustedes también.

En primer lugar, quiero agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, por haberme becado en el transcurso de mi doctorado. Por extensión, va mi más profundo agradecimiento a todo lo que ello representa, un país que apuesta a la ciencia y a la educación. **Gracias** a la educación pública, libre y gratuita por haberme brindado una educación de privilegio. **Gracias** a Néstor Carlos Kirchner por ser el impulsor, por primera vez en la historia del país, de una política científica, y a Cristina Fernández de Kirchner por haberla consolidado.

Muchas pero muchas gracias a quiénes intervinieron para que esta etapa pudiera ser finalmente concluida, a quiénes me (y nos) escucharon: Dr. Vicente Macagno, Ing. Alberto Arleo, Dr. Lino Barañao, Dr. Roberto Salvarezza, y la mismísima Presidenta de la Nación, Dra. Cristina Fernández de Kirchner.

Muchas gracias a los jurados de Tesis, Dres. Marcela Lareschi, Juan Timi y Norma Sardella. Sus valiosos comentarios han enriquecido la versión final del manuscrito.

Gracias a los representantes del claustro Graduados de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UNMdP por el apoyo y por intervenir ante la Universidad; por hacer que todo esto finalmente haya servido para algo.

Gracias Pedro Caparrós de la Escuela de Postgrado por toda la ayuda y buena predisposición.

Gracias al Centro Nacional Patagónico, por haberme brindado el lugar de trabajo y las facilidades logísticas para realizar esta tesis. Un agradecimiento especial a los directores del CENPAT durante el desarrollo de mi doctorado, Dra. Mirtha Lewis y Dr. Rolando González-José, gracias por su apoyo, por no haberse quedado sólo en una figura política. **Gracias!**

Gracias a la Secretaria de Áreas Protegidas y Turismo y la Dirección de Fauna y Flora Silvestre, Provincia de Chubut, por los permisos de trabajo. Gracias también a la Fundación BBVA, España, y el Zoo d'Amneville, Francia, por el financiamiento del trabajo de campo.

Un enorme y profundo agradecimiento a Florencia Cremonte, por su ayuda desinteresada, por su apoyo, por su garra. Sin ella esta Tesis no hubiera llegado hasta aquí. Muchas, muchas **GRACIAS** Flor!

Gracias a Flavio Quintana, por sus consejos, por confiar en mí, por darme la oportunidad de poder seguir trabajando en lo que me gusta.

Gracias a Tere Dozo, por escucharme, por hacerte escuchar.

A todas aquellas personas del CENPAT que de alguna u otra manera estuvieron para dar una mano: a Bocha por haber confiado en mi capacidad de manejo (incluso más que yo misma!); a Norma Bustos por estar siempre dispuesta a darme una mano con tinciones, cortes y demases; a Cynthia Sequeiros por sumarse tan generosamente a mis experimentos; a Miguel Pascual por su buena predisposición para darme una mano cuando fue necesario; a Néstor y Fabián por tantas lindas campañas; a Pedro Ortega, por llevar los piojos a los medios; a las chicas de la administración, de personal, a Lori y Yoko, por su trabajo, que tantas veces pasa desapercibido. A todos los que se acercaron a darme una palabra de aliento, a todos los que suman su granito de arena para darle calidez a nuestro lugar de trabajo. **Gracias!**

Un enorme agradecimiento a mis *cumpas* del Espacio Becarios, por haber compartido con ustedes el desafío de llevar adelante el EB y encima haber conseguido muchas cosas de las cuales me enorgullezco, fue un placer enorme trabajar con ustedes!! **Gracias** a Juane, Andrés, Juanpi, Agus, Moni y Mariangeles. Miles de gracias a quienes tomaron la posta: Clau, Sergio, Nati y Marian, millones de gracias por todo lo que hicieron, son unos grosos!!

A los “piojólogos” que me abrieron las puertas de su mundo. A Ricardo Palma, por estar siempre dispuesto a dar una mano, por tanta generosidad y buena onda, fue un honor haber podido trabajar con vos. A Stephen Barker, por su aporte molecularoso y por hacerme descubrir otra faceta de los piojos. A Lajos Rózsa y Kosta Mumcuoglu, por haberme dado la

enorme oportunidad de asistir a la International Conference on Phthiraptera. A Vince Smith, por haber atendido mis dudas y consultas cada vez que lo necesité. A Gastón Mougabure Cueto por ayudarme a pensar. Al Dr. K.C. Kim por los comentarios realizados en la redescipción. Y muy especialmente, a la memoria de Durno Murray, por haber sido el pionero en el estudio de estos bichos y por haberme dado tantas ideas, fue un placer haberlo conocido, aunque sea virtualmente.

A Claudio Lazzari por estar del otro lado de la computadora respondiendo mis preguntas y ayudándome a dilucidar qué pasa con estos bichos tan raros.

A los puesteros, siempre con su mate preparado para coronar una buena tarde de trabajo: a Bernabé, Miguel y Chola, Luis Rivera. Gracias Jorge Mendioros y Don López, por haberme dejado trabajar en sus campos.

No alcanzan los agradecimientos para todos los que desinteresadamente me ayudaron en el campo, hubiera sido imposible todo esto sin ustedes!! Y el agradecimiento se extiende del trabajo a la compañía y la amistad, por haber hecho que cada hora de trabajo de campo sea más disfrutable, a pesar del calor, a pesar de las ganas de terminar, de no encontrar las crías que buscábamos; gracias por las caminatas, las charlas, los mates, las cientos de crías peinadas! **Gracias y más gracias:** Dami, El Mati, Gise, Agus, Poliya, Marian, Néstor, Flor, Santiago y al cazador estrella, Tincho Zamero.

Gracias a mis compañeros de laboratorio, Rocío, Silvina, Néstor, Silvana, Dami, Javi. Un agradecimiento muy especial mis compañeras/O de oficina: Flor, Marian, Poly, Pauli, Pitu, Bere, Caro y Gastón, gracias por aguantarme, por compartir tanto mate lavado, por hacer más llevadera la rutina.

Gracias a mis compañeros de laboratorio de Valencia, por sus almuerzos en valenciano, por los coffee breaks. Gracias a Helena, Pau, Ana A., Ana P., Astrid, Diana, Aigües, Raúl, Juanma, Paco. Gracias también a Enrique Raga, del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Valencia, y a la Dra. Astrid Holzer por la traducción de manuscritos en alemán. Gracias a Carlos y Duna por ser mis compañeros en Valencia.

Gracias a las chicas del laboratorio de Parasitología: Nuri, Carmen, Stefa, Gise, Emi, gracias por aceptarme como una más.

Gracias a Ricardo Siri (Liniers) por los dibujos que ilustran esta tesis y por transmitir esa magia única que ilustraron muchos de mis días, mis sentimientos y pensamientos.

Gracias a estos extraños bichos, los piojos, por haberme cautivado, y a sus hospedadores, los lobos marinos, por haberme dado la oportunidad de trabajar en lugares tan fantásticos.

Nada de todo esto hubiera sido posible sin el apoyo constante e incondicional de “*mis fueguitos*”, que día a día me alumbran con su llama y me dan la energía para seguir adelante.

No me alcanzan las palabras de agradecimiento a mis viejos, que siempre lucharon contra viento y marea para darme lo mejor, para que me diera el gusto de trabajar de lo que me gusta. Ustedes son mi orgullo, mi ejemplo, mi sostén y esta tesis es tan suya como mía. Los amo.

Una especial dedicatoria para mi abuelo, a quién me hubiera encantado tener sentado en mi defensa, pero sé que desde algún lado me sigue acompañando. Fue, es y será un ejemplo en mi vida. Gracias a mi abuela por todo su cariño. Una de las cosas que más extrañé en todos estos años fue compartir nuestros mates de los viernes a la tarde. Te adoro Abue!

Gracias a mis hermanas, Pía y Agustina, mis compañeras en este camino. Gracias a mis tres soles, Agustín, Joaquín, Ámbar y Lola, por mantener a la niña que llevo dentro, por ser mi cable a tierra. Pocas cosas dolieron más de la distancia que no verlos crecer. Los quiero con todo mi corazón.

Gracias a Gus y Clau, por su compañía a ambos lados del Atlántico, por dejarme formar parte de sus locuras.

Gracias a mis tíos, a mis primos, a la flia de Baires...

Miles de gracias a mis amigos.

A mis amigos de Mardel que se mantuvieron firmes a pesar de los 1200 Km que nos separan, gracias por estar a través de sus mails, mensajes, llamadas, visitas... Me llena el alma ver cómo estos 5 años a la distancia lo único que hicieron fue mantener y fortalecer todas estas lindas amistades.

Gracias Paulina!!! La tesis tendría 5 tomos si tuviera que explicar por qué. Sos la mejor amiga que se puede tener, te adoro nena!

Gracias Carlitos, por haberme acompañado en cada momento de mi vida a lo largo de 25 años, sos una persona increíble y tengo mucha suerte de tenerte. Te quiero muchísimo!

Gracias Lulú por tus locuras, por nuestras largas charlas telefónicas, por bancarme, te adoro amiga!

A Ari, mi gran amigo, por el aguante, por estar siempre.

Gracias Matiti por ser siempre una fuente inagotable de risas y un amigo de lujo.

Gracias a los Garesitos, Flor, Agus y Genaro. Gracias a Dani, Lore y Male. Gracias por tantas cosas lindas compartidas. Gracias por esos solcitos de sobrituchos.

Gracias Chavecito por tener siempre la palabra justa, por los abrazos a distancia. Y a Valechan, siempre con una palabra linda, con una sonrisa.

Gracias a Andre, Ger, Mati, Guille, Flor, Pedrito!! Gracias por estar, por los viajes, los asados en Santa Clara, los guisos del Mati, la amistad a distancia. Gracias!!

Gracias Giyo y Agus por no sólo ser unas compañeras de campo geniales, sino también unas excelentes amigas. Brindo con Coca Zero por ustedes!

Gracias a Mati Mora... todavía me acuerdo de mi ayudante de Biología Animal que me explicaba fascinado unos poliquetos inmundos y que con el tiempo se convirtió en un gran amigo. Gracias a las chicas Mora también, Orne y Vicentina. Los quiero!

Gracias Lu por siempre estar del otro lado de la pantalla, por mantener esta amistad a pesar de no vernos nunca.

Gracias a mis amigos de Madryn, que hicieron del pueblo un lugar mejor, gracias por tantos mates, asados, fiestas bizarras, clubes de los lunes sin premios, tardes en la palmera, almuerzos en la ballena... se ganaron un lugar enorme en mi corazón. Gracias y más gracias a Ani, Moni, Nadia, Marian, Sergio, Bere, Javi, Lucre, Cynthia, Tincho Z., Yani, Toto, Diego, Meli...

Gracias y muchas a...

Agus por estar siempre, por tantas charlas, tantas caminatas por la playa, tantos Margaritas para "bailar poco"... Madryn no hubiera sido lo mismo sin vos. Gracias amiga!!

Poliyin, miles, muchas, profundas, vos sabés. Gracias por los pollos terapéuticos y los helados de higos al rum. Te quiero mucho!

Anita por tus delirios, por las risas, por los viajes, las clases, los retos, por todo...

Lauri, una amiga excelente, gracias por estar siempre.

Lili!! Por haber estado conmigo desde el principio, siempre serás mi "concu".

Verito por esa luz que tenés siempre, por tus abrazos que llenan de energía.

A Clau, Nati, Magui...

A Gastoncete por tenerme tanta paciencia!! Sos un groso amigo!

A Juli y José, por tanta generosidad, siempre.

A Juanpi y Jime

A Luquitas, por tener siempre una sonrisa, por la buena onda.

A Nati y Stefi, por estar a pesar de la distancia, es como si nunca se hubieran ido.

Gracias a Flor y al Cheli, por ser mi familia en Madryn. Gracias Lari por todas esas horas dibujando *bisbos*, por dejarme ser la tía Sole. Los quiero mucho de verdad!

A Oli, mi perrita loca, mi compañera.

Y por último, quisiera dedicarle esta tesis a la memoria de Natalia Feltrin, me hubiera gustado mucho compartir este momento con vos, aunque de alguna manera sé que lo compartimos...

La verdad que después de releer tanto agradecimiento, no me queda otra que citar a una grande...

Gracias a la vida, que me ha dado tanto...

Y a todos ustedes por ser parte de ella

Índice

Capítulo I

Introducción General	1
El sistema en estudio.....	9
El parásito.....	9
El hospedador.....	10
Metodología general.....	13
Objetivo de la tesis.....	16
Estructura de la tesis.....	17

Capítulo II

Redescripción de <i>Antarctophthirus microchir</i> (Anoplura: Echinophthiriidae) en el lobo marino de un pelo, <i>Otaria flavescens</i>, en Patagonia, Argentina	18
Resumen.....	19
Introducción.....	20
Materiales y métodos.....	21
Material examinado.....	21
Microscopía óptica.....	22
Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	22
Terminología utilizada.....	24
Redescripción.....	25
Resumen taxonómico.....	30
Discusión.....	31

Capítulo III

Dinámica poblacional de <i>Antarctophthirus microchir</i> en crías de lobo marino de un pelo en Patagonia.	34
Resumen.....	35
Introducción.....	36
Materiales y métodos.....	38
Recolección de datos.....	38
Patrones de infestación	39
Modelos de proyección poblacional.....	41
Resultados.....	44
Discusión	51

Capítulo IV

Adaptaciones morfológicas de <i>Antarctophthirus microchir</i> al medio marino: el uso del SEM como herramienta.	55
Resumen.....	56
Introducción.....	57
Materiales y métodos.....	58
Especímenes examinados	58
Microscopía Electrónica de Barrido.....	59
Resultados.....	59
Descripción de los estadios	59
Principales caracteres.....	60
Discusión	66

Capítulo V

Selección de hábitat de <i>Antarctophthirus microchir</i> en crías de lobo marino de un pelo.....	72
Resumen.....	73
Introducción.....	74
Materiales y métodos.....	83
Recolección de datos.....	83
Caracterización del microhábitat	85
Análisis estadístico.....	86
Resultados.....	87
Discusión	90

Capítulo VI

Transmisión vertical de <i>Antarctophthirus microchir</i> en crías de lobo marino de un pelo.....	96
Resumen.....	97
Introducción.....	98
Materiales y métodos.....	103
Resultados.....	105
Discusión	110

Capítulo VII

Conclusiones generales	116
Referencias bibliográficas.....	121

Capítulo I

Introducción General



La coespeciación se define, justamente, como la especiación conjunta de dos o más linajes, ecológicamente asociados (Page, 2003), como puede ser el caso de los predadores con las presas, los polinizadores con las flores y los parásitos con sus hospedadores. El caso extremo de coespeciación ocurre cuando este es el único proceso modelando la asociación, lo cual se refleja en filogenias especulares, concepto definido por Fahrenholz (1913) y reformulado por Eichler (1942), quién lo bautizó como la Regla de Fahrenholz.

Los sistemas parásito- hospedador presentan la ventaja de facilitar el estudio de las adaptaciones en comparación a los organismos de vida libre (Paterson y Banks, 2001). Esto se debe principalmente a que el ambiente del parásito esta modelado en gran parte por el genotipo de su hospedador (Paterson y Banks, 2010). Incluso, es ampliamente aceptado que la evolución de los parásitos obligados se encuentra profundamente asociada a la de sus hospedadores (Klassen, 1992). Por lo tanto, como consecuencia de su historia de vida, los parásitos resultan modelos biológicos ideales para el estudio de las especializaciones ecológicas, mecanismos de especiación y diversificación (de Meeûs *et al.*, 1998).

Si se considera la definición más amplia de parásito como aquellos organismos que deben alimentarse de un animal vivo sin causarle la muerte, aproximadamente el 50% de las especies animales entran en esta clasificación (Price, 1980; Windsor, 1998). Incluso considerando definiciones más estrictas, en las cuales un organismo debe pasar una proporción importante de su vida en o sobre su hospedador para ser considerado parásito, el 20% de las especies adoptan el parasitismo como estilo de vida, lo cual implica que prácticamente todas las especies de metazoos de vida libre están infectadas por al menos una especie de parásito (Poulin y Morand, 2000).

La Figura 1.1 muestra diferentes casos de coespeciación entre parásito y hospedador, en función de los procesos implicados. El caso (a) refleja una filogenia especular; en el (b) se produce una captura de hospedador (*host switching*), en el (c) los parásitos evolucionan independientemente. Las últimas 3 figuras representan casos en los que el parásito no se encuentra en el hospedador esperado, ya sea porque se extinguió (d), no pudo colonizar a los descendientes cuando su hospedador especió;

un fenómeno conocido como *missing the boat* (e), o no especió cuando su hospedador sí lo hizo (f) (Page, 2003).

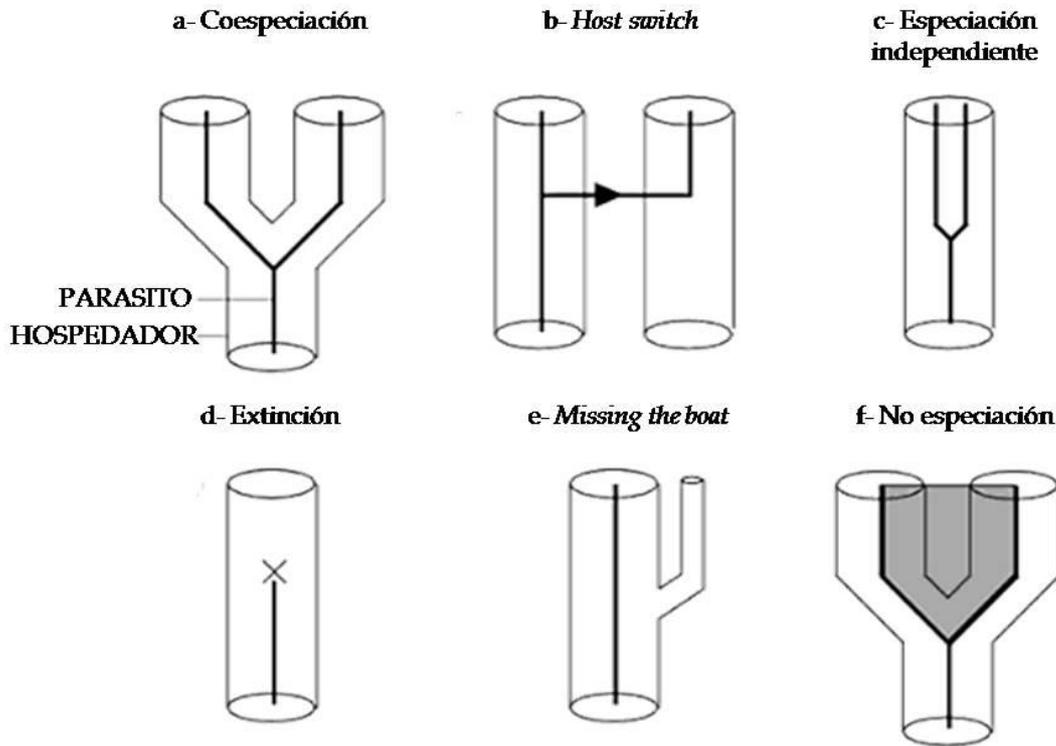
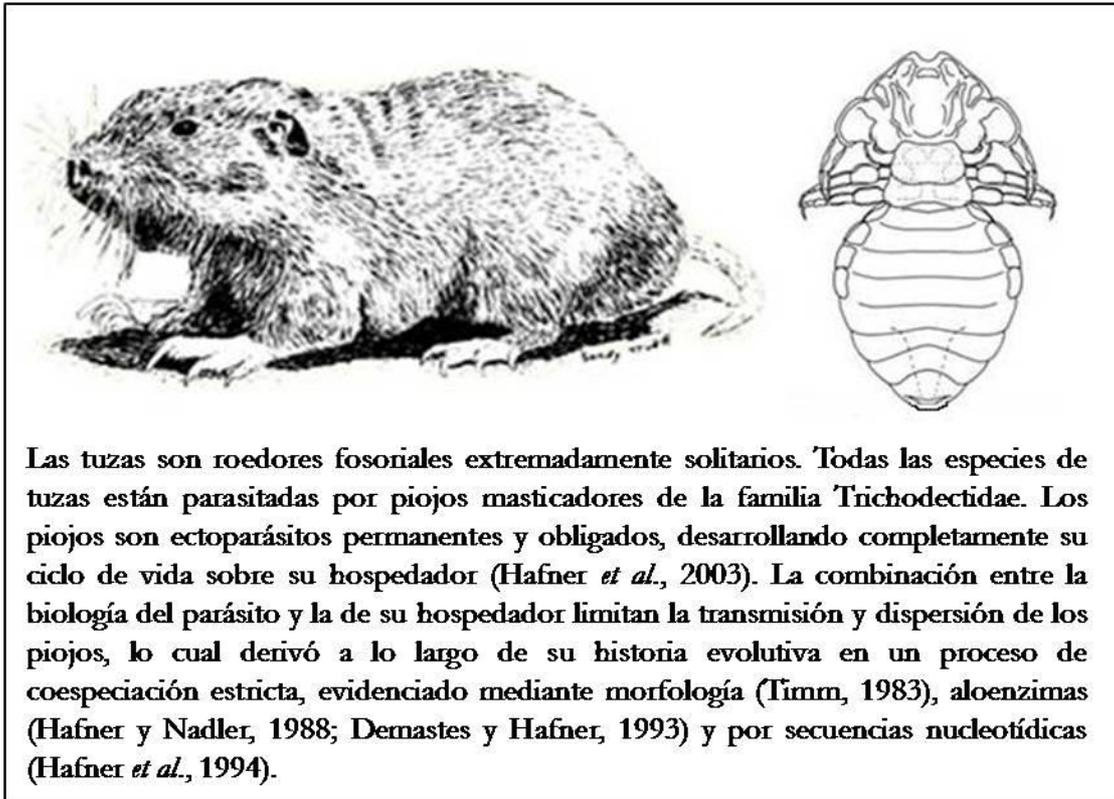


Figura 1.1- Posibles modelos de asociación parásito-hospedador. **a-** Parásito y hospedador coespecian; **b-** el parásito coloniza un nuevo hospedador; **c-** se da una especiación independiente; **d-** el parásito puede extinguirse en el linaje del hospedador; **e-** el ancestro del hospedador no heredó el ancestro del parásito; **f-** los hospedadores evolucionan independientemente de sus hospedadores, por lo cual dos especies diferentes comparten la misma especie de parásito. (Modificado de Page, 2003)

Dentro de la gran diversidad de organismos parásitos, los piojos suelen ser el ejemplo clásico de los procesos de coevolución, coadaptación y coespeciación (Page, 2003). Posiblemente el caso más paradigmático es el de la coevolución entre las tuzas, roedores fosoriales de la familia Geomyidae, y los piojos masticadores de los géneros *Geomydoecus* y *Thomomydoecus*, de la familia Trichodectidae (Recuadro 1.1).

Recuadro 1.1- Los geómidos y los piojos de la familia Trichodectidae constituyen un ejemplo clásico de los procesos de coevolución.



Los piojos (orden Phthiraptera) son ectoparásitos permanentes y obligados de aves y mamíferos. Se reconocen 4 subórdenes dentro de Phthiraptera: los piojos “masticadores” (*chewing lice*, en la literatura inglesa), que incluyen los subórdenes Amblycera, Ischnocera y Rhynchophthirina; y los piojos “chupadores” (*sucking lice*) incluidos en el suborden Anoplura (Figura 1.2). Estos grandes grupos se diferencian entre sí por su aparato bucal. Los llamados piojos masticadores infectan aves y mamíferos, alimentándose de células epiteliales, plumas, fibras capilares, caspa y, en algunos casos, sangre (Kim, 1985; Light *et al.*, 2010). Por su parte, los piojos chupadores son parásitos exclusivos de mamíferos y presentan un aparato bucal succionador con el cual perforan los vasos capilares del hospedador alimentándose de su sangre (Kim, 1985). Otras características como el aplastamiento dorsoventral y las modificaciones del segmento tibiotarsal de las patas y las uñas son reflejo de la gran adaptación a sus hospedadores mamíferos (Kim, 1985; Light *et al.*, 2010).

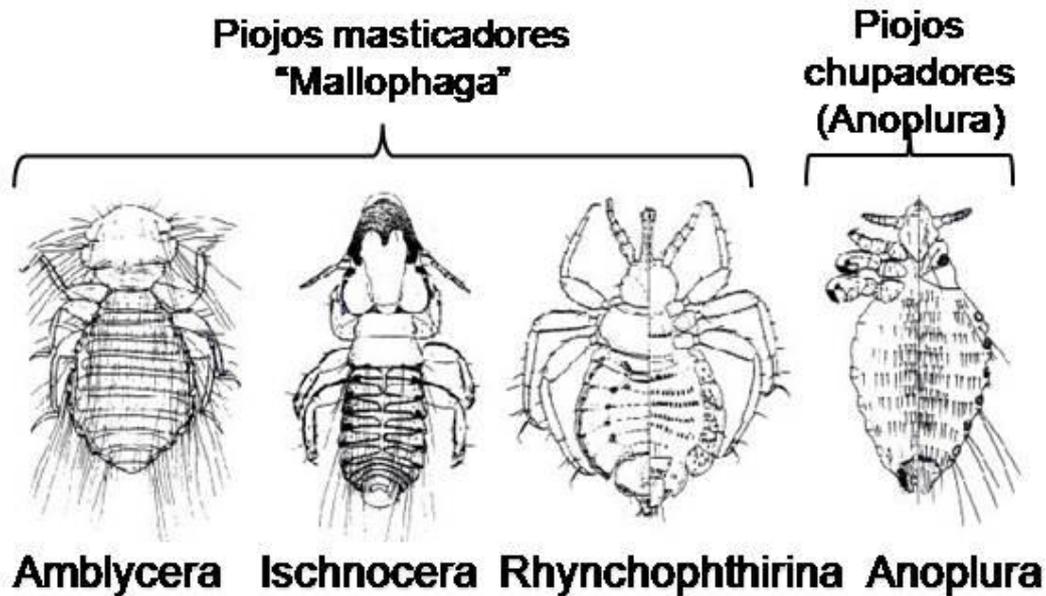


Figura 1.2- Los miembros del Orden Phtiraptera, los piojos. Los subórdenes Amblycera, Ischnocera y Rhynchophthirina son conocidos como piojos masticadores (“malófagos”), mientras que los Anoplura constituyen los piojos chupadores (Imágenes tomadas del SID database, British Museum of Natural History).

Estudios filogenéticos corroboran el origen monofilético de los Anoplura (Light *et al.*, 2010). Se cree que los actuales piojos chupadores derivaron de piojos masticadores que vivían como parásitos oportunistas de vertebrados fosoriales. Con el transcurso del tiempo, estas asociaciones se hicieron más dependientes, derivando en organismos hematófagos y parásitos obligados. Las formas antiguas de los actuales anopluros habrían tenido aparato masticador del que derivó un aparato suctor picador a lo largo del proceso evolutivo (Light *et al.*, 2010). Es probable que la transición entre estas formas se haya dado a partir de organismos similares a los miembros actuales del suborden Rhynchophthirina (Light *et al.*, 2010) (Figura 1.2). Existen sólo 3 especies dentro de este suborden que infectan jabalíes y elefantes. Estos piojos masticadores tienen un aparato bucal especializado para perforar la piel del hospedador y alimentarse de la sangre de la herida.

Análisis moleculares recientes usando calibraciones basadas en el registro fósil sugieren que los piojos surgieron en el Cretácico (Smith *et al.*, 2011). La evidencia indica que los piojos “acompañaron” a sus hospedadores en su radiación, sobreviviendo a la gran extinción del Cretácico- Terciario (Smith *et al.*, 2011). De esta

manera, la radiación de los mamíferos (entre 85 y 100 millones de años) permitió la diversificación de los piojos chupadores, llegando a estar presentes en 12 de los 29 órdenes actuales de mamíferos. Actualmente, el suborden Anoplura incluye 540 especies agrupadas en 50 géneros y 15 familias (Kim y Ludwig, 1978; Light *et al.*, 2010).

Por otra parte, los piojos se caracterizan por presentar alta especificidad por sus hospedadores y baja patogenicidad, es decir, generalmente no constituye un factor de mortalidad para el hospedador. Las características particulares de las historias de vida de los parásitos, han llevado a considerar que la coespeciación es el proceso dominante en la historia evolutiva de estos organismos. Sin embargo, estudios recientes parecen indicar que la historia es más compleja, involucrando procesos de colonización, extinción, “*missing the boat*” y cambios de hospedador (Light *et al.*, 2010).

Los piojos de la familia Echinophthiriidae (Recuadro 1.2) constituyen un claro ejemplo de la estrecha adaptación de los piojos a la biología de su hospedador. Los equinoftridos infestan pinnípedos y nutrias, logrando adaptarse al estilo de vida anfibio gracias a una extrema adaptación de sus ciclos a las nuevas circunstancias. Los anopluros parecen ser incapaces de reproducirse bajo el agua (Murray y Nicholls, 1965; Murray *et al.*, 1965; Murray, 1987) y, por tanto, los equinoftridos deben ajustar sus eventos reproductivos a los de su hospedador. Se considera que, evolutivamente, ha habido un proceso de coadaptación estrecha que varía de especie a especie dependiendo de la biología del hospedador. De acuerdo con las adaptaciones morfológicas y ecológicas, la especificidad por sus hospedadores y el modo de dispersión, se puede inferir que los Echinophthiriidae primitivos infestaban carnívoros ancestrales antes de la radiación de éstos al medio acuático (Kim, 1985). Estudios moleculares apoyan la hipótesis del origen terrestre la familia Echinophthiriidae y su posterior coevolución con los pinnípedos (Cruickshank *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2003)

Existen estudios previos sobre el ciclo vital de algunas especies de Echinophthiriidae, realizados en las décadas de 1960 y 1970 (Kim 1971, 1972, 1975; Murray, 1958, 1964, 1967; Murray y Nicholls, 1965; Murray *et al.*, 1965). Sin embargo,

todos estos estudios se basaron en observaciones de hospedadores aislados, por lo que todavía falta una perspectiva cuantitativa a nivel poblacional. El análisis ecológico del proceso de coadaptación al que apunta la presente tesis, brindará el marco necesario para interpretar los patrones de coespeciación entre esta familia de piojos y sus hospedadores. Para ello, estudiaremos este proceso adaptativo en el caso de *A. microchir*, evaluando sus adaptaciones morfológicas, fisiológicas y ecológicas.

El objetivo general de la presente tesis consiste en estudiar el proceso coevolutivo entre *Antarctophthirus microchir* (Anoplura; Echinophthiriidae) y el lobo marino de un pelo (*Otaria flavescens*).

Recuadro 1.2- Clasificación sistemática de los piojos de la Familia Echinophthiriidae y sus hospedadores pinnípedos.

Clase: Insecta

Subclase: Pterygota

Infraclase: Neoptera

Orden: Phthiraptera

Suborden: Anoplura

Familia: Echinophthiriidae

Géneros*:

Antarctophthirus

A. callorhini (lobo marino fino del norte)

A. lobodontis (foca cangrejera y foca leopardo)

A. mansonii (foca de Ross)

A. microchir (lobos marinos)

A. ogmorhini (foca de Weddell)

A. tricbechi (morsa)

Latagophthirus

L. rauschi (nutrias)

Lepidophthirus

L. macrorhini (elefante marino del sur)

L. piriformis (focas monje)

Echinophthirus

E. horridus (focas árticas)

Proechinophthirus

P. fluctus (lobo marino fino del norte)

P. zumpti (lobos marinos finos)

* Entre paréntesis figura el o los hospedadores

Clase: Mammalia

Subclase: Theria

Infraclase: Placentalia

Orden: Carnivora

Suborden: Caniformia

Familia: Otariidae

Phocarctos hookeri (Lobo marino de Nueva Zelanda)

Neophoca cinerea (Lobo marino de Australia)

Eumetopias jubatus (Lobo marino de Steller)

Zalophus californianus (Lobo marino de California)

Otaria flavescens (Lobo marino común o de un pelo)

Arctocephalus spp. (Lobos marinos finos o de dos pelos)

Callorhinus ursinus (Lobo marino fino del norte)

Familia: Phocidae

Mirounga leonina (Elefante marino del sur)

Monachus spp. (Focas monje)

Leptonychotes weddelli (Foca de Weddell)

Lobodon carcinophaga (Foca cangrejera)

Ommatophoca rossi (Foca de Ross)

Phoca spp. (Focas árticas)

Hydrurga leptonyx (Foca leopardo)

Halichoerus grypus (Foca gris)

Cystophora cristata (Foca de capucha)

Erignathus barbatus (Foca barbuda)

Familia: Odobenidae

Odobenus rosmarus (Morsa)

El sistema en estudio

El parásito

La especie de piojo objeto de estudio, *Antarctophthirus microchir*, fue descrita por Trouessart y Neumann en 1888 (Figura 1.3) en el lobo marino de Nueva Zelanda, *Phocarctos bookeri*. Posteriormente, se ha registrado en otras especies de lobos marinos, tanto del Hemisferio Norte como del Sur: el lobo marino de Steller, *Eumetopias jubatus*; el lobo marino de California, *Zalophus californianus*; el lobo marino de Australia, *Neophoca cinerea*. En el lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, su presencia fue corroborada por Leonardi (2007) y Crovetto *et al.* (2009), aunque, como se discutirá más adelante, había sido previamente mencionada por otros autores en forma posiblemente errónea (Enderlein, 1906; Ferris, 1934, 1951; Kim, 1985).

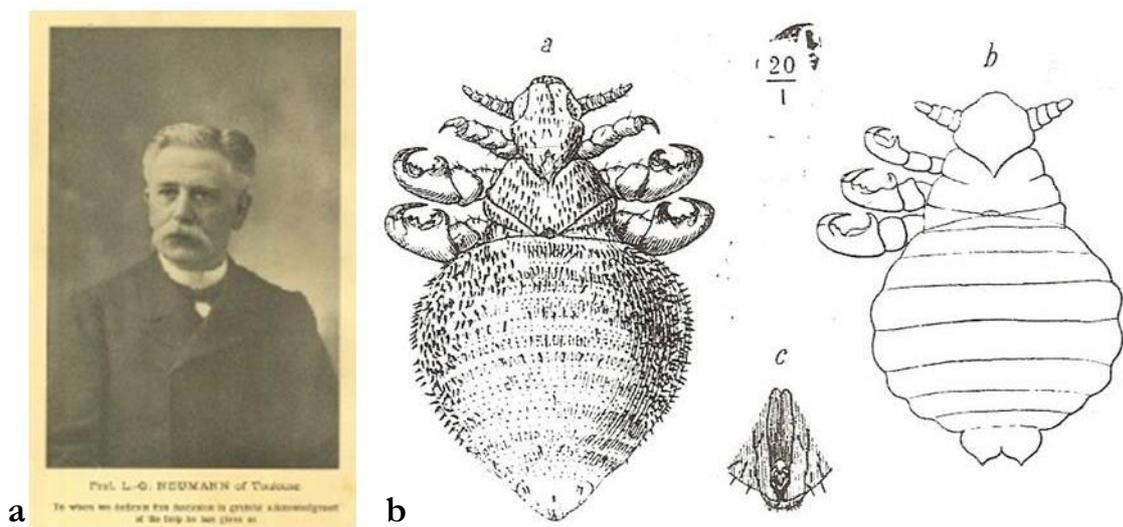


Figura 1.3- a- Louis George Neumann, taxónomo francés quien, junto a Édouard Trouessart, describieron a *Antarctophthirus microchir* en 1888. b- Dibujos provenientes de la descripción original

McIntoch y Murray (2008) realizaron estudios ecológicos sobre esta especie de piojo en el lobo marino de Australia, registrando una prevalencia del 46% y un rango de intensidad entre 5 y >100 piojos. Crovetto y colaboradores (2008) realizaron el primer registro de *A. microchir* en el lobo marino de un pelo en Chile, identificando a la especie mediante claves taxonómicas. Mientras que en Argentina fue registrada por Leonardi (2007), quién además realizó los primeros análisis ecológicos de *A. microchir*.

Por otra parte, el único trabajo realizado sobre representantes de la familia Echinophthiriidae en Argentina se limita a la descripción morfológica de *Proechinophthirus zumpti* en el lobo fino sudamericano, *Arctocephalus australis* (Castro *et al.*, 2002).

El hospedador

El lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, se distribuye desde los 29°S en el Océano Atlántico Sudoccidental hasta los 4°S, en Perú, Océano Pacífico Sudoriental (Vaz Ferrerira, 1981; Dans, *et al.*, 2004) (Figura 1.4). En Argentina se localizan más de 120 apostaderos a lo largo de todo el litoral que se utilizan como asentamientos reproductivos o invernales (Dans *et al.* 1996, 2004; Reyes *et al.* 1999; Schiavini *et al.* 2004; Crespo *et al.* 2012).

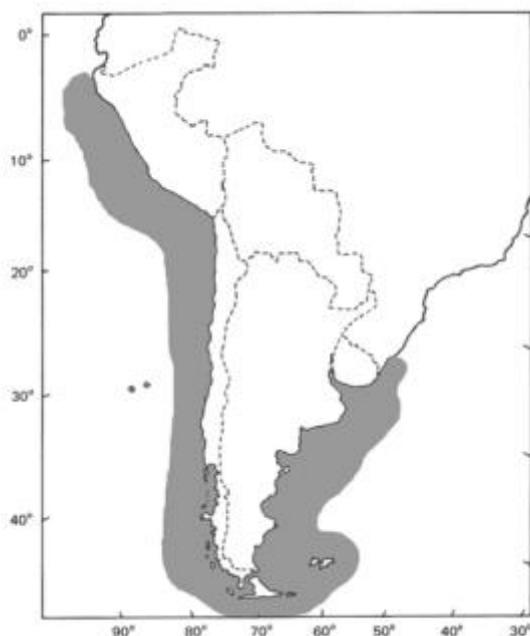


Figura 1.4- Distribución geográfica del lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*

Desde los años 80, en Patagonia se vienen desarrollando trabajos sobre la biología del lobo marino de un pelo de forma continuada. Los más representativos son los de Crespo (1988) y Grandi y colaboradores (2008) sobre dinámica poblacional, Koen Alonso y colaboradores (2000) sobre ecología trófica y, más recientemente, los de Drago, con técnicas de isótopos estables C y N (Drago *et al.* 2009 a, b y c), Crespo y colaboradores (1997) sobre interacciones con pesquerías marinas, y Campagna

(1985) Campagna y Le Boeuf (1988 a, b) y Campagna y colaboradores (1988 a y b; 1992) sobre comportamiento reproductivo.

En las costas sudamericanas, y principalmente en Patagonia, las poblaciones del lobo marino de un pelo fueron explotadas comercialmente por su piel y grasa desde principios del siglo XVIII hasta gran parte del siglo XX (Crespo, 1988). Se estima que la población del norte de Patagonia estaba reducida a menos del 10% de su población original en la década del 60, cuando cesó la explotación (Crespo y Pedraza, 1991).

Actualmente la población del norte de Patagonia se ha estimado en 67131 lobos marinos (Grandi, 2010) y se estaría recuperando a una tasa cercana al 5,7% anual (Dans *et al.*, 2004). En dicha región los apostaderos presentan distintas tendencias temporales de crecimiento poblacional, encontrándose apostaderos, como los de Morro Nuevo y Punta León, con altas tasas de crecimiento anual que parecen estar asociadas a la reciente consolidación de nuevas áreas de cría en la periferia de las ya existentes (Crespo, 1988; Dans *et al.*, 1996; Dans *et al.*, 2004; Grandi *et al.*, 2008). Estas nuevas áreas surgieron como agrupaciones de juveniles, que pasaron a formar áreas con estructura de cría en unos pocos años (Crespo 1988; Dans *et al.*, 2004). Estos grupos son importantes porque representan los lugares de mayor expansión de la población (Dans *et al.*, 2004; Grandi *et al.*, 2008).

El presente estudio se llevó a cabo en la Reserva Natural Turística y Unidad de Investigación Biológica Punta León. Punta León es uno de los apostaderos más importantes del litoral norte de Patagonia, puesto que allí se registra el 17% de los 9000 nacimientos anuales de lobos marinos de un pelo (Crespo *et al.*, 2002). Desde la década del 80, cuando comenzaron los estudios en el lugar, se viene registrando un aumento en la tasa de crecimiento anual de la población del 4,2%. Este crecimiento poblacional se corresponde con el proceso de recuperación de la especie que se observa en los apostaderos de Patagonia norte, como se mencionó anteriormente (Crespo y Pedraza, 1991; Dans *et al.*, 2004; Grandi *et al.*, 2008). El proceso de expansión de la especie ha conllevado el asentamiento de nuevos grupos de cría. Dichos grupos presentan estructuras sociales diferentes a las observadas en los asentamientos tradicionales y sufren una mayor tasa de mortalidad de crías (Crespo *et*

al., 2002). En los grupos nuevos predominan los juveniles y los machos solitarios, mientras que en los grupos tradicionales existe una mayor proporción de hembras, crías y machos adultos (Crespo *et al.*, 2002).

El lobo marino de un pelo es una especie poligínica y sexualmente dimórfica (Figura 1.5), con un ciclo anual dividido en una corta etapa reproductiva y una etapa pelágica con visitas frecuentes y regulares a la costa. La reproducción ocurre en verano, entre mediados de diciembre y principios de febrero (Campagna, 1985).



Figura 1.5- Macho, hembra y cría de lobo marino de un pelo en una playa en el norte de Patagonia. Nótese el alto dimorfismo sexual.

La Figura 1.6 resume los principales eventos del ciclo reproductivo de la especie. Cada año, los primeros machos arriban a las colonias reproductivas en diciembre, estableciéndose en la playa y anticipándose al lugar que será elegido por las hembras posteriormente durante la temporada (Campagna, 1985; Campagna y Le Boeuf, 1988a). Las hembras, que arriban entre fines de diciembre y principios de enero, eligen estos lugares y se asientan en ellos, dando a luz a los pocos días de llegar. Cada hembra da a luz a una única cría y, tras el parto, entra en estro siete días después, luego copula con el macho y, a partir de la cópula, deja el apostadero para alimentarse durante dos o tres días (Campagna y Le Boeuf, 1988a). Desde ese momento, las hembras alternan entre períodos de alimentación en el mar y períodos de amamantamiento en tierra (Campagna *et al.*, 1992). Por su parte, las crías sólo están en condiciones de emprender inmersiones en el mar a partir de los 30 días de vida. Los machos probablemente emprenden largos viajes de alimentación antes de la estación reproductiva para poder hacer frente a los requerimientos energéticos que

implica la reproducción, mientras que el resto del año alternan períodos de alimentación en el mar con cortos períodos en tierra (Campagna *et al.*, 2001).



Figura 1.6- Principales eventos del ciclo reproductivo del lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, en Patagonia.

Metodología general

Los muestreos se realizaron en la Reserva Natural Turística y Unidad de Investigación Biológica Punta León (43°04'S, 64°47'O), Provincia de Chubut, Argentina (Figura 1.7).

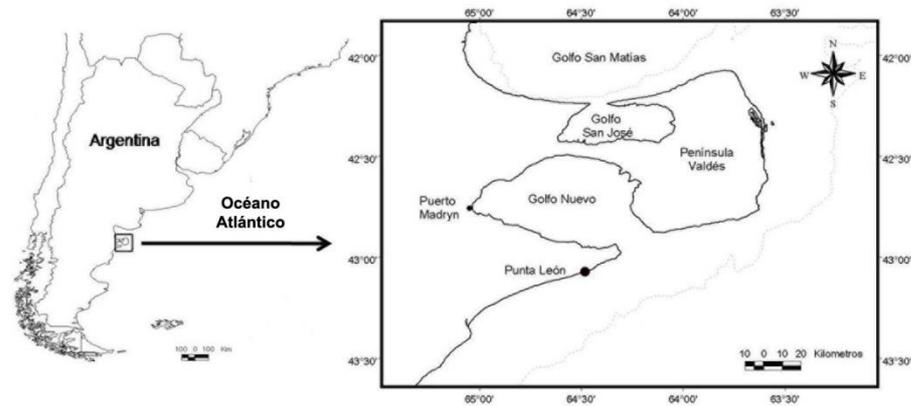


Figura 1.7- Ubicación geográfica del apostadero de Punta León.

Cada año, al comienzo de la temporada reproductiva, se seleccionaron al azar crías de lobo marino de un pelo que fueron capturadas (Figuras 1.8a, b), pesadas (Figura 1.8c) y medidas, se determinó su sexo y edad en función del grado de cicatrización del cordón umbilical (Figura 1.8d). También fueron marcadas con tintura indeleble (de permanencia de unos 40 días) y con caravanas de plástico de marcación permanente. El tiempo total de manipulación de las crías varió cada año en función de las restantes actividades que se realizaban con el pesado, sexado, extracción de sangre, marcado con caravana plástica y/o análisis del estado inmunológico del animal. La recolección de ectoparásitos, fue una de las actividades realizadas (Figura 1.8e) todos los años

14

Los piojos se recolectaron con un peine plástico de dientes finos, de los utilizados para tratar la pediculosis humana. Las crías se peinaron hasta que ya no se observaron más piojos y una vez finalizado el procedimiento, se guardó el peine utilizado en un bolsa tipo Ziploc © con etanol 96% para conservar los ejemplares hasta su análisis en el laboratorio. La frecuencia de peinado varió en función de los objetivos planteados en cada campaña y se detallan en cada capítulo.

Una vez terminado el peinado, las crías se liberaron cerca de sus madres asegurándose la reunión con éstas (Figura 1.8f). Todas las crías examinadas en la presente tesis sobrevivieron al período de estudio.



Figura 1.8- Metodología utilizada para la recolección de piojos en crías de lobo marino de un pelo en Patagonia Norte, Argentina. **a y b-** captura; **c-** pesado; **d-** imagen del cordón umbilical, con el cual se estima la edad de la cría; **e-** obtención de ectoparásitos; **f-** devolución de la cría al grupo.

Objetivo de la tesis

El objetivo general de esta Tesis consiste en estudiar el proceso coevolutivo entre el piojo *A. microchir* Trouessart y Neumann, 1888 (Anoplura; Echinophthiriidae) y su hospedador, el lobo marino de un pelo (*Otaria flavescens*, Shaw 1800), evaluando el proceso de coadaptación de *A. microchir* a nivel morfológico, fisiológico y ecológico. Respecto a éste último punto, se analiza la dinámica poblacional de los piojos, desarrollando un modelo de dinámica poblacional que permita estudiar los cambios estructurales de la población de parásitos y los factores de los que éstos dependen.

Los objetivos específicos de la presente tesis doctoral son los siguientes:

- a) Realizar la revisión taxonómica de *A. microchir*, comparando morfológicamente los especímenes obtenidos de *O. flavescens* con los de las restantes especies hospedadoras de *A. microchir*: *Eumetopias jubatus*, *Zalophus californianus*, *Neophoca cinerea*, *Phocarctos hookeri* y *Arctocephalus forsteri*.
- b) Describir y analizar la dinámica poblacional de *A. microchir* en crías de lobo marino de un pelo, estimando parámetros de la biología de la especie para modelizarla.
- c) Evaluar adaptaciones morfológicas de *A. microchir* para adaptarse a la vida anfibia del lobo marino de un pelo en el medio marino.
- d) Investigar el patrón de selección de hábitat de *A. microchir* en crías de lobo marino de un pelo durante la temporada reproductiva.
- e) Analizar los patrones de transmisión vertical de *A. microchir*, ya que dicho proceso resulta determinante en el ciclo de vida del parásito.

Estructura de la tesis

Para alcanzar los objetivos planteados, esta tesis se encuentra estructurada en ocho capítulos.

En el **Capítulo I** se realiza la Introducción General sobre este trabajo, la cual fue señalada en los párrafos precedentes. Se incluyen en el mismo los principales eventos del ciclo reproductivo del hospedador que serán necesarios para comprender el planteamiento de los sucesivos capítulos y se brinda en detalle la explicación de la metodología utilizada para la recolección de los piojos. El **Capítulo II** se centra en la redescrición de la especie y se discuten aspectos taxonómicos de la misma. En el **Capítulo III** se describe y modeliza la dinámica poblacional de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo. Este capítulo brinda el marco conceptual sobre el cual se desarrollarán los siguientes capítulos. En el **Capítulo IV** se describen en detalle las adaptaciones morfológicas y de ultraestructura de la especie en su proceso de adaptación al medio marino. Los Capítulos V y VI se centran en aspectos ecológicos. En el **Capítulo V** se investiga la selección de hábitat de *A. microchir*, siendo el primer estudio de este tipo en una especie de equinoftrido en latitudes medias. El **Capítulo VI** describe y analiza el proceso de transmisión vertical, un punto fundamental en la dinámica poblacional de la especie. Por último, el **Capítulo VII** condensa las principales conclusiones de la presente tesis doctoral y se presentan los nuevos interrogantes que dicha investigación suscita.

Capítulo II

Redescripción de *Antarctophthirus microchir* (Anoplura: Echinophthiriidae) en el lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, en Patagonia, Argentina

Los contenidos del presente capítulo han sido publicados en:

Leonardi, M.S., E.A. Crespo, J.A. Raga, and M. Fernández. Redescription of *Antarctophthirus microchir*, Trouessart and Neumann 1888 (Anoplura: Echinophthiriidae) from South American sea lion, *Otaria flavescens*, from Patagonia, Argentina. *Journal of Parasitology* **95**, 1086-1092.



Resumen

En el presente capítulo se redesciben los adultos y se describe, por primera vez, los 3 estadios ninfales de *Antarctophthirus microchir*. La descripción original se realizó con material proveniente del lobo marino de Nueva Zelanda, *Phocarctos hookeri*, el cual consistía en un sólo ejemplar hembra y uno macho. Además, la descripción resulta confusa en función de la terminología actual y, dado que el material tipo no se encuentra disponible, resulta necesaria la revisión taxonómica de la especie. Los especímenes colectados de crías de *Otaria flavescens* en Patagonia se analizaron utilizando microscopía óptica y de barrido. Esta especie se diferencia de otras especies del género por la presencia de un “flequillo” de setas en la parte dorsal de la cabeza, presente solo en *A. trichechi* y *A. callorbini*. Sin embargo, *A. trichechi* se caracteriza por una prominente probóscide provista de grandes ganchos, y *A. callorbini* presenta menos escamas abdominales, que difieren en forma y tamaño. Otra característica propia de *A. microchir* es el patrón uniforme de escamas ovoides y las espinas con surcos longitudinales característicos en su superficie. El primer estadio ninfal difiere de los restantes por la ausencia de escamas y porque el tórax no posee espinas ventrales ni “pelos”. Las ninfas 2 y 3 pueden distinguirse entre sí por la disposición de las apófisis occipitales.

Introducción

El suborden Anoplura (Phthiraptera) se compone de piojos parásitos principalmente de mamíferos terrestres; solo unas pocas especies lograron adaptarse al medio marino. Estas especies se agrupan en 5 géneros que constituyen la familia Echinophthiriidae, la cual incluye las especies presentes en pinnípedos y la nutria de río (Kim, 1985): *Proechinophthirus*, *Lepidophthirus*, *Echinophthirus*, *Latagophthirus* y *Antarctophthirus*. Este último es el género más diverso, con 6 especies reconocidas (Kim, 1985): *A. ogmorhini*, *A. callorhini*, *A. trichechi*, *A. lobodontis*, *A. mawsoni* y *A. microchir*.

Antarctophthirus microchir está reportado como parásito de 5 especies de lobo marino en ambos hemisferios. Considerando lo conservativo de su morfología, y las características ecológicas y evolutivas de los piojos chupadores, surge la duda de si los especímenes de *A. microchir* de diferentes especies de lobos marinos pueden representar un complejo de especie crípticas.

Trouessart y Neumann (1888) describieron *A. microchir* como *Echinophthirus microchir* en *Phocarctos hookeri*. A partir de los estándares y términos actuales, la descripción original resulta incompleta y sólo se basó en un macho y una hembra. Posteriormente, Enderlein (1906) redescibió la especie basándose en el mismo material que Trouessart y Neumann, y la transfirió del género *Echinophthirus* a *Antarctophthirus*.

Considerando que la información disponible sobre la especie resulta fragmentaria e incompleta, el objetivo de este primer capítulo es redescibir los ejemplares adultos y describir, por primera vez, los 3 estadios ninfales de *A. microchir* del lobo marino de un pelo en Patagonia. Los piojos colectados de las crías de lobo marino un pelo fueron identificadas como *A. microchir* siguiendo la descripción original y la clave dicotómica para piojos chupadores de Ferris (1951).

Materiales y métodos

Material examinado

Las muestras se tomaron en la Reserva Natural Punta León durante las temporadas reproductivas entre 2004/05 a 2006/07. Los piojos se colectaron de crías de *O. flavescens* que fueron capturadas siguiendo la metodología descrita en la Introducción General. Veinte machos, 20 hembras, 18 ninfas en el primer estadio (N1), 32 ninfas 2 (N2) y 20 ninfas 3 (N3) fueron examinadas utilizando microscopio electrónico óptico; mientras que 10 machos, 10 hembras, 10 N1, 10 N2, 10 N3 y 2 huevos fueron analizados mediante microscopía electrónica de barrido.

Los especímenes colectados en las crías de lobo marino de un pelo se compararon con material de referencia proveniente de colecciones de museos (ver Tabla 2.1)

Tabla 2.1- Material de referencia utilizado para realizar la redescrición de *Antarctophthirus microchir*.

Museo	Especie	Hospedador	Machos	Hembras	Ninfas
New Zealand Te Papa Tongarewa	<i>A. microchir</i>	<i>Arctocephalus forsteri</i>	1	1	1N1, 1N2
	<i>A. ogmorhini</i>	<i>Leptonychotes weddelli</i>	0	1	0
	<i>A. trichechi</i>	<i>Odobenus rosmarus</i>	1	1	0
Natural History Museum	<i>A. microchir</i>	<i>Eumetopia jubatus</i>	1	1	0
		<i>Zalophus californianus</i>	1	2	0
		<i>O. flavescens</i> (Malvinas)	2	3	0
	<i>A. ogmorhini</i>	<i>Leptonychotes weddelli</i>	4	3	0
	<i>A. trichechi</i>	<i>Odobenus rosmarus</i>	3	3	0
	<i>A. lobodontis</i>	<i>Lobodon carcinophagus</i>	4	4	0
K.C. Emerson Entomology	<i>A. microchir</i>	<i>Eumetopia jubatus</i>	6	14	0
		<i>Zalophus californianus</i>	3	3	0

El material tipo utilizado en el presente trabajo fue depositado en el Museo de La Plata (2 machos, 2 hembras y 2 individuos de cada uno de los estadios ninfales).

Microscopia óptica

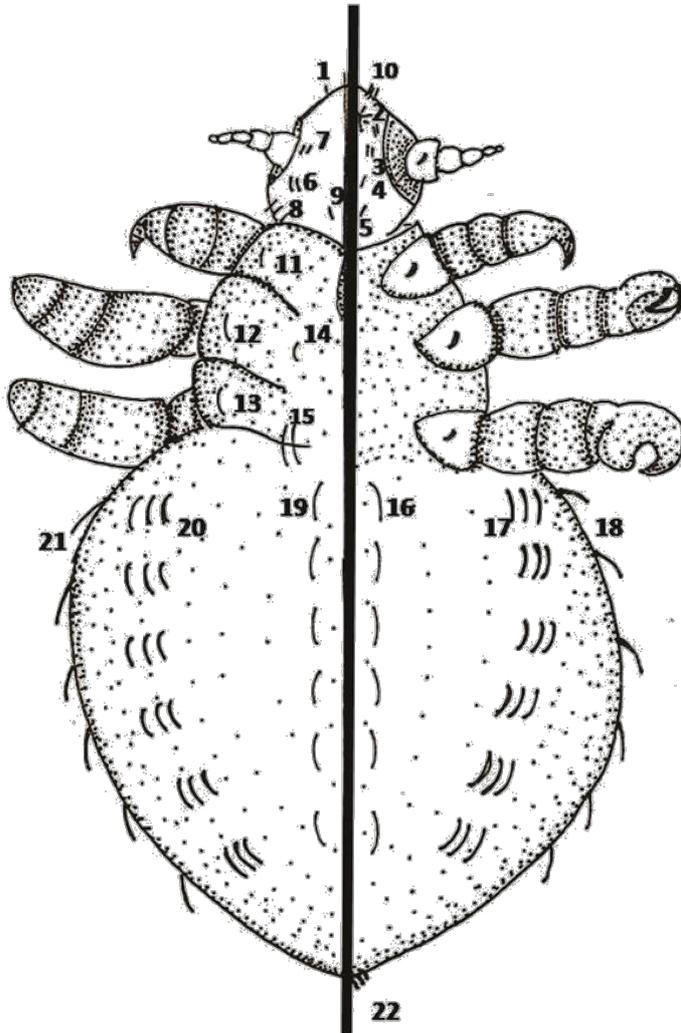
Los piojos se prepararon siguiendo en líneas generales el protocolo de Palma (1978). Los especímenes se trataron con una solución acuosa al 20% de hidróxido de potasio (KOH) durante 24 horas para todos los estadios con excepción de las N1, que se mantuvieron sólo 12 horas para evitar que se dañara el material. El KOH macera el tejido no quitinoso y remueve el color de la esclerotina, produciendo así que el cuerpo se distienda. Posteriormente, se elimina el KOH y se reemplaza por agua destilada durante 30 minutos, y ésta luego por una solución acuosa de ácido acético (C₂H₄O₂). El ácido neutraliza los remanentes alcalinos, deteniendo así la maceración, lo cual evita el daño por exceso en la acción del KOH. La mitad de las muestras fueron teñidas con eosina durante 12 horas. Todos los especímenes, teñidos o no, se deshidrataron en una serie de alcohol etílico (70%, 80%, 90% y 96%), manteniéndolos 30 minutos en cada concentración. Luego de la deshidratación, el alcohol se reemplazó por aceite de clavo puro, durante 24 hs. Se colocó un cubreobjeto con un poco de peso sobre los piojos para favorecer el aplastamiento. Finalmente, los piojos se montaron en preparados definitivos utilizando bálsamo de Canadá, siguiendo la metodología habitual.

Microscopia electrónica de barrido (MEB)

Los especímenes para MEB (10 de cada sexo y estadio: 5 en vista dorsal y 5 ventral, y 2 huevos) se deshidrataron en una serie de pocillos con etanol de graduación creciente, se desecaron por punto crítico con CO₂ y se montaron en soportes con la ayuda de cinta adhesiva de carbono de doble cara. Se recubrieron con una fina capa de 25-30 nm de oro-paladio en un recubridor Bio-Rad Sc 500 y se examinaron en un MEB de vacío S-4100 a 5 Kv. (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, Universidad de Valencia, España).

Las medidas (en mm) se dan como sigue: $\bar{X} \pm D.S.$; rango; n. Las abreviaturas están explicadas en la Figura 2.1.

Figura 2.1- Quetotaxia de *Antarctophthirus microchir*. La terminología sigue a Kim y Ludwig (1978).



Cabeza.

- 1- APHSp, espina apical
- 2- OrS, seta oral
- 3- VPreASp, espina preantenal ventral
- 4- VPHSp, espina ventral principal
- 5- VPoMHS, seta ventral posterior marginal
- 6- SuHSp, espina sutural
- 7- DMHSp, espina dorsal marginal
- 8- DPoMHS, seta marginal posterior dorsal
- 9- DPreASp, espina dorsal pre antenal
- 10- MAHSp, espina marginal anterior

Tórax.

- 11- DPtSp, espina torácica dorsal principal
- 12- DMsSp, espina dorsal mesotorácica
- 13- DMtSp, espina dorsal metatorácica
- 14- DPTSp, espina dorsal principal
- 15- DMASp, espina marginal dorsal abdominal.

Abdomen.

- 16- VCAS, seta ventral abdominal
- 17- VLAS, seta ventral abdominal lateral
- 18- VMAS, seta ventral abdominal marginal
- 19- DCAS, seta dorsal abdominal central
- 20- DLAS, seta dorsal abdominal lateral
- 21- DMAS, seta dorsal abdominal marginal
- 22- AAS, seta abdominal apical.

Terminología utilizada

Las especies de la familia Echinophthiriidae se caracterizan por la presencia de setas modificadas (Kim, 1985). En la bibliografía no se encontró una terminología uniforme sobre la nomenclatura de las setas. La mayoría de los nombres y abreviaturas utilizados en la presente descripción siguen los utilizados por Kim y Ludwig (1978), con algunas modificaciones menores (por ejemplo, utilizamos “Sp” para diferenciar lo que hemos denominado espinas de las setas de Kim y Ludwig). Sin embargo, se siguió el siguiente criterio: las espinas son aquellas setas puntiagudas y con forma en espiral (Figuras 2.2a, d); las escamas son setas aplanadas (Figuras 2.2b, e), y los “pelos” (siguiendo a Mehlhorn *et al.*, 2002), son setas largas y finas (Figuras 2.2c, f).

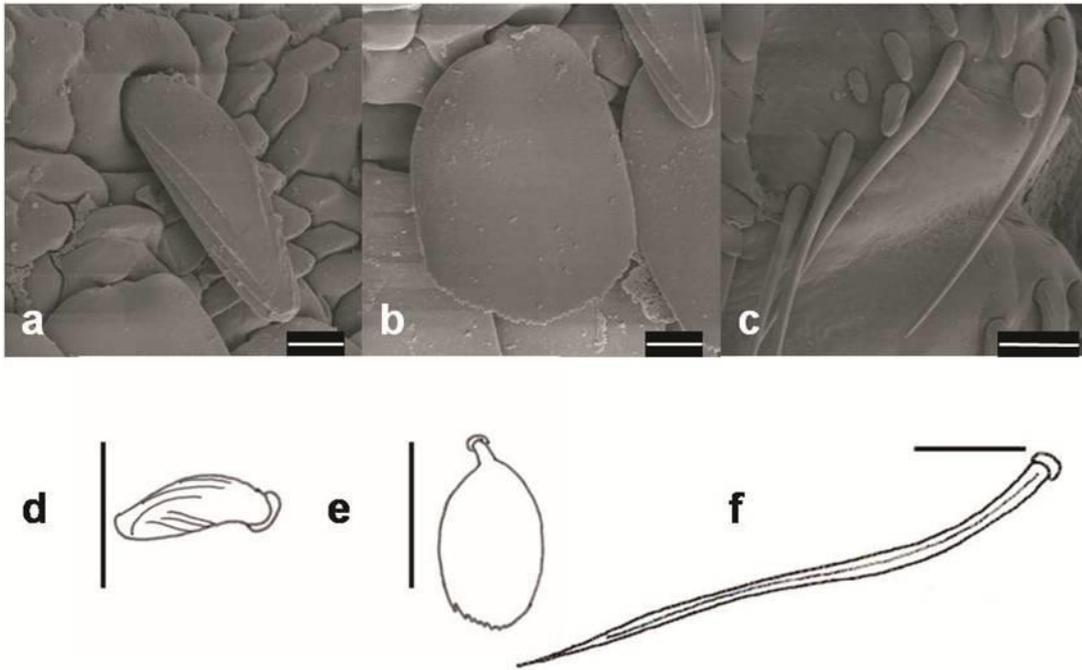


Figura 2.2- Tipos modificados de setas. **a-** Imagen de microscopio electrónico de Barrido (MEB) de una espina (Barra= 10µm); **b-** Imágenes de MEB de una escama (Barra= 10µm); **c-** MEB de pelos y espinas (Barra= 50µm); **d-** dibujo en cámara clara (DCL) de una espina (Barra= 50µm); **e-** DCL de una escama (Barra= 50µm); **f-** DCL de un pelo (Barra= 50µm).

Redescripción

Antarctophthirus microchir (Trouessart y Neumann, 1888) Enderlein 1906

Sinonimia: *Echinophthirus microchir* Trouessart y Neumann, 1888

Macho (Figuras 2.3a, 2.4b): Largo total del cuerpo: $2,48 \pm 0,22$; 2,05-2,88; 20. *Cabeza*: Apenas más larga que ancha (largo: $0,52 \pm 0,05$; 0,41-0,60; 20; ancho: $0,43 \pm 0,03$; 0,36-0,48; 20); margen anterior altamente esclerotizado; vestigios maxilares distintivos; labro ventral conectado a largos apodemas; ángulo postantenal desarrollado, dorsalmente con 2 largos pelos a ambos lados; ángulo posteroantenal no desarrollado. Dos espinas apicales, 4 espinas ventrales preantenas (VPreASp), 3-4 setas ventrales marginales posteriores modificadas como largos pelos (VPoMHS), 1 espina supra-antenal, numerosas espinas ventrales laterales (VLHSp) y marginales anteriores; 5 espinas de la sutura (SuHSp), la medial más corta que las restantes, 4 espinas dorsales marginales (DMHSp), 6 setas dorsales marginales posteriores (DPHS) modificadas como largos pelos formando un flequillo. *Antena*: 5 segmentos. El segmento basal con una espina corta. El segmento terminal es el más largo y posee 4 sensoria en el ápice. *Tórax*: Trapezoidal, aproximadamente tan largo como la cabeza y el doble de ancho (ancho: $0,78 \pm 0,05$; 0,63-0,88; 20). Placa esternal torácica cubierta de escamas; 3 espinas bajo cada coxa; margen posterior con 2 largos pelos. Dorsalmente, patrón característico de escamas en forma de Ω invertido; 4 espinas dorsales mesotorácicas (DMsSp); espinas dorsales metatorácicas (DMtSp) dispuestas en 2 filas, la superior con 3 pelos y la inferior con 5 largos pelos, marginalmente 2 espinas; 2 espinas dorsales abdominales marginales (DMASp) y 2 pelos. Fragma bien desarrollado; apófisis occipitales convergentes en el ápice, delimitando una hendidura; fragma mesotorácico continuo a través del noto, convergente en una conspicua depresión dorsal. Espiráculos mesotorácicos membranosos y pequeños, pero claramente visibles; placa esternal no desarrollada. *Patas*: Patas anteriores características del género, pequeñas y poco desarrolladas; las patas mesotorácicas y metatorácicas muy largas y fuertes, muy similares en forma y tamaño. Tarso y tibia fusionados en un segmento tibiotarsal; tibiotarso con un lóbulo basal distintivo y una fuerte uña, con 3 almohadillas. *Abdomen*: Largo, ovalado y puntiagudo (ancho: $1,26 \pm 0,12$; 1,08-1,45; 20); carece de tergos o esternos distintivos; placas paratergales no desarrolladas; 6 espiráculos presentes a cada lado. Setas abdominales centrales

ventrales (VCAS), centrales dorsales (DCAS), laterales dorsales (DLAS) y ventrales (VLAS) modificadas en escamas, cubriendo completamente el abdomen. Escamas DCA del esterno 1 lanceoladas y muy distintivas. Seis filas de espinas VLA. Setas abdominales marginales dorsales (DMAS) y laterales (DLAS) modificadas como numerosas setas. Cinco a 6 pelos apicales. Escamas ovoides, puntiagudas de borde dentado irregular, variables en tamaño y forma (Figuras 2.2b, e). Espinas puntiagudas, espiraladas, variables en tamaño pero no en forma (Figuras 2.2a, d). *Genitalia* (Figura 2.4b): Placa basal relativamente larga, con parameros cortos; pseudopene muy largo con forma de V, cuyos bordes articulan con la base de los parámetros.

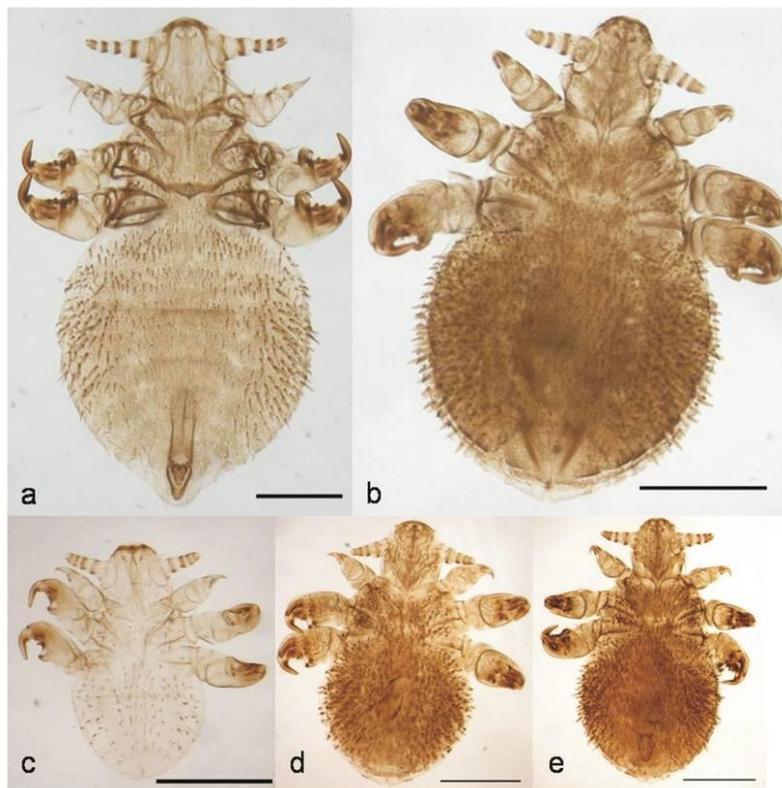


Figura 2.3- Fotografías en microscopio óptico de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Macho; **b-** Hembra; **c-** Ninfa 1; **d-** Ninfa 2; **e-** Ninfa 3 (Barra= 500 μ m).

Hembra (Figuras 2.3b, 2.4a): Largo total del cuerpo: $2,78 \pm 0,34$; 2,01-3,53; 20. Cabeza (ancho: $0,44 \pm 0,04$; 0,37-0,50; 20; largo: $0,55 \pm 0,04$; 0,46-0,61; 20), tórax (ancho: $0,92 \pm 0,08$; 0,81-1,06; 20), patas y abdomen como en el macho, excepto por la genitalia y caracteres asociados; abdomen más redondeado (ancho: $1,64 \pm 0,30$; 1,19-2,42; 20) y sin escamas lanceoladas. *Genitalia*: Sin placa genital, gonópodos ni espermateca distintivos; con un flequillo de setas rodeando la abertura genital.

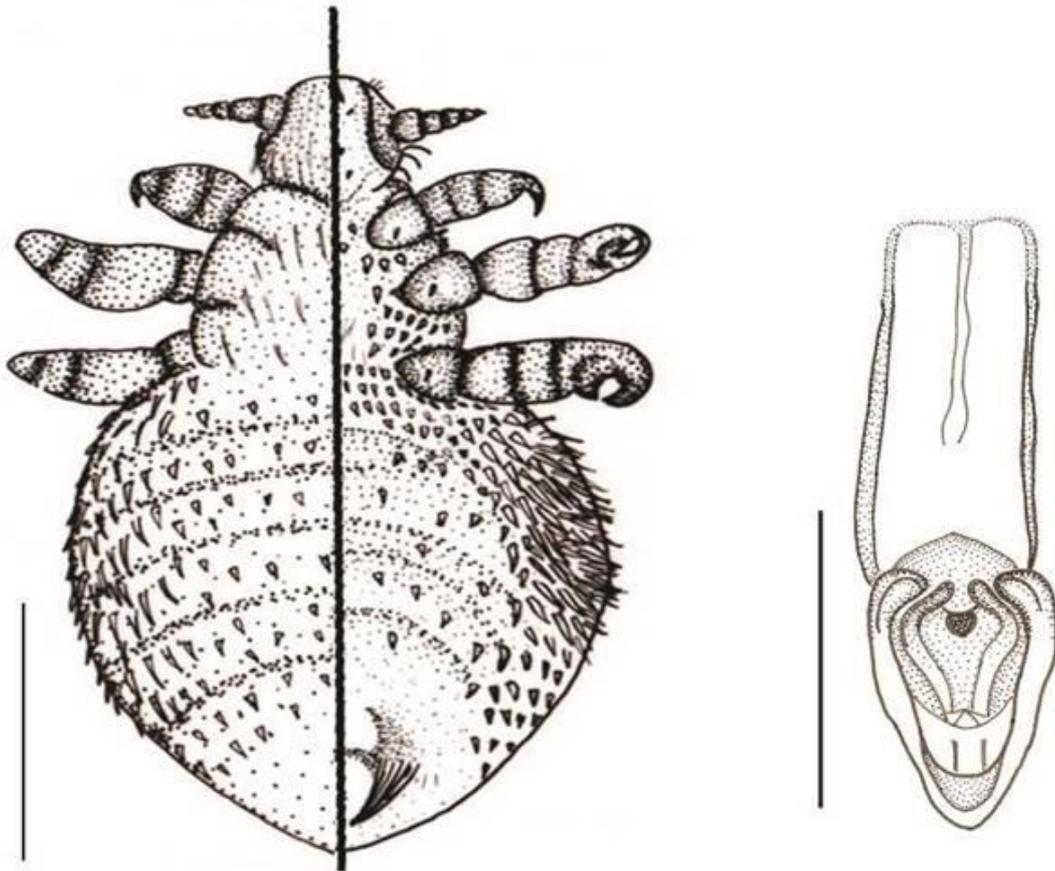


Figura 2.4- Dibujos en cámara clara de *Antarctophthirus microbir*. **a-** Hembra, vista dorsoventral (Barra= 1mm); **b-** detalle del pseudopore (Barra= 250 μ m).

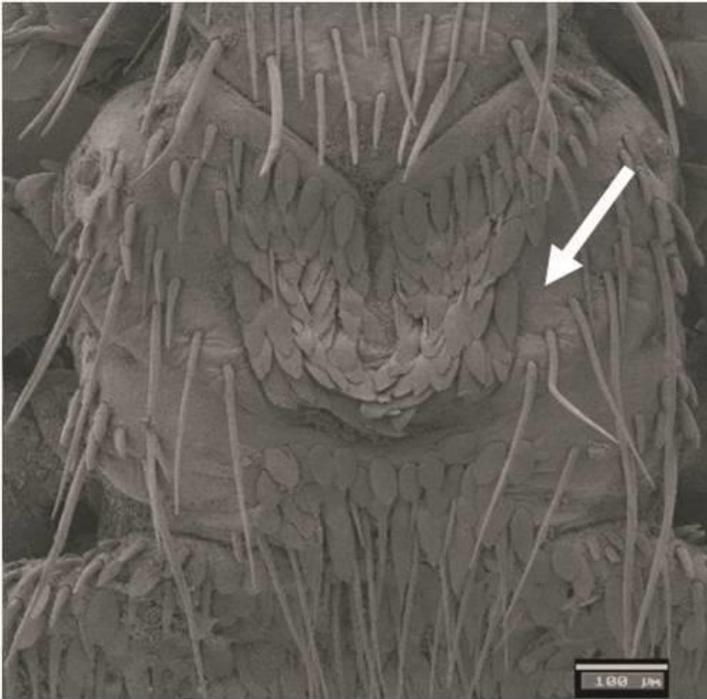


Figura 2.5- Escamas torácicas dorsales mostrando el patrón de escamas en forma de Ω invertido (Barra= 100 μ m)

Huevo (Figura 2.6): $0,93\pm 0,018$; $0,90-0,95$; 8. Liso, blanco, opérculo distintivamente elevado, estrechándose hacia el ápice romo.

28

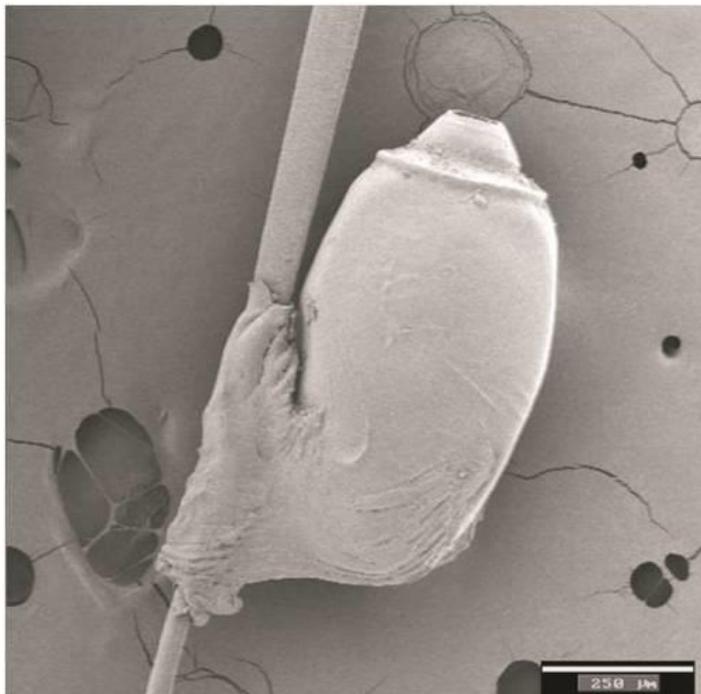


Figura 2.6- Fotografía del huevo de *Antarctophthirus microchir* en microscopio electrónico de barrido (Barra= 250 μ m)

Ninfa 1 (Figura 2.3c): Largo total del cuerpo: $0,98 \pm 0,10$; $0,79-1,21$; 18. *Cabeza*: Tan larga como ancha (ancho: $0,27 \pm 0,04$; $0,21-0,38$; 18; largo: $0,30 \pm 0,05$; $0,21-0,39$; 18); margen anterior redondeado; área del labroclípeo altamente esclerotizada; haustelo con dentículos desarrollados; ángulo postantenal desarrollado; espinas orales presentes; ventralmente sin espinas ni escamas; dorsalmente 3 espinas SuH, 1 pelo DPoMH, 2 espinas DPreA; flequillo no desarrollado. *Antena*: 4 segmentos; segmento basal ancho; el segmento terminal es el más largo; sensoria desarrollada; 1 espina en el segmento basal y patrón de setas como en el adulto. Apófisis occipitales no desarrolladas. *Tórax*: Ancho: $0,40 \pm 0,06$; $0,28-0,55$; 18. Fragmas poco desarrolladas (Figura 2.7a); sin escamas; 1 espina y 1 pelo DMs; 1 pelo DMt. *Patas*: como en el adulto; espinas de las coxas desarrolladas; placa coxal no muy desarrollada; uñas poco esclerotizada; almohadillas como en los adultos. *Abdomen*: Ancho: $0,45 \pm 0,07$; $0,30-0,59$; 18. Corto, ovalado; tergos, esternos y paratergos no distintivos. Seis filas de 3 DLA espinas cortas. Siete filas de VCAS: fila 1 con 1 pelo corto y 1 espina; filas 2 a 5 con 2 pelos y 2 espinas; filas 6 y 7 con 2 pelos; filas 2 a 5 con 1 espina VLA en cada fila.

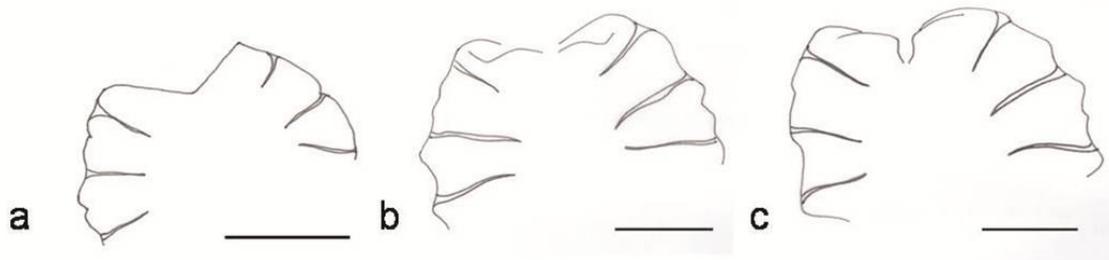


Figura 2.7- Esquemas del tórax de las ninfas de *Antartophthirus microchir* mostrando el grado de desarrollo de los fragmas. **a-** N1 (Barra= 500 μm); **b-** N2 (Barra= 500 μm); **c-** N3 (Barra= 500 μm).

Ninfa 2 (Figura 2.3d): El patrón de espinas y escamas es igual al del adulto, al menos que se mencione lo contrario. Los pelos son más cortos y las escamas menos densas que en adultos. Las características no mencionadas se mantienen como en la N1. Largo total del cuerpo: $1,51 \pm 0,18$; $1,09-1,79$; 32. *Cabeza*: Casi tan larga como ancha (ancho: $0,35 \pm 0,04$; $0,25-0,45$; 32; largo: $0,40 \pm 0,04$; $0,31-0,47$; 32); apófisis occipitales cortas y no convergentes (Figura 2.7b). *Antena*: 4 segmentos, igual a la de

la N1, pero el segmento terminal comienza a diferenciarse. *Tórax*: Ancho $0,65\pm 0,09$; $0,49-0,82$; 32. Dorsalmente con fragmas pro, meso y metatorácicos bien desarrollados. Placa esternal torácica con menos escamas que en los adultos. *Abdomen*: Ancho $0,83\pm 0,14$; $0,58-1,03$; 32. Ovalado, escamas desarrolladas, patrón de setas como en el adulto pero menos denso.

Ninfa 3 (Figura 2.3e): Largo total del cuerpo: $1,87\pm 0,14$; $1,68-2,29$; 22. Características similares al adulto, a menos que se especifique lo contrario. Pelos más cortos que en los adultos. *Cabeza*: Ancho $0,42\pm 0,05$; $0,34-0,61$; 22; largo: $0,47\pm 0,04$; $0,42-0,54$; 22. Apófisis occipitales más prolongadas y conectadas en el ápice, hendidura no desarrollada. *Antena*: 4 segmentos. *Tórax*: $0,78\pm 0,05$; $0,66-0,85$; 22. Apófisis occipitales convergen al ápice (Figura 2.7c). *Abdomen*: Ancho: $1,07\pm 0,07$; $0,66-0,85$; 22. Escamas y espinas más densas que las de N2.

Resumen taxonómico

Hospedador tipo: *Phocarctos hookeri* (Gray, 1844).

Localidad tipo: Isla de Auckland, Nueva Zelanda ($50^{\circ}30'S$; $166^{\circ}17'E$).

Observaciones

La especie aquí redescrita se puede distinguir de otras especies del género por la presencia de un flequillo de setas en la parte posterior de la cabeza, sólo presente en *A. trichechi* y *A. callorbini*. Sin embargo, *A. trichechi* posee una proboscis inusualmente prominente con largos ganchos; *A. microchir* y *A. callorbini* difieren claramente en la distribución de las escamas abdominales, siendo más abundantes y uniformes en tamaño y forma en *A. microchir*. Otra característica útil para diferenciar a *A. microchir* de otras especies de *Antarctophthirus* es el patrón de escamas ovoides, distribuidas uniformemente y la presencia de surcos longitudinales en las espinas.

Con el fin de confirmar la identificación de la especie, se intentó examinar el holotipo, pero no fue posible localizarlo en ninguna colección pública ni privada. Por lo tanto, es probable que el espécimen tipo nunca haya sido depositado. La

descripción aquí presentada se ajusta a la realizada por Trouessart y Neumann (1888) y Ferris (1951). Los especímenes se compararon con el único material disponible del hospedador tipo, *P. hookeri* (1 macho y 1 hembra del Museo de Nueva Zelanda Te Papa Tongarewa, Wellington), sin encontrar diferencias, lo cual llevó a que se determinara el material como *A. microchir*.

Las ninfas 1 se distinguen de los otros estadios ninfales por tener apófisis occipitales y fragmas torácicos más cortos, la ausencia de escamas y por no tener espinas ni pelos en el tórax. Las ninfas 2 y ninfas 3 son distinguibles entre sí por las apófisis occipitales, que son paralelas en las ninfas 2 y convergentes en el ápice en las ninfas 3 (Figura 2.7).

Discusión

El lobo marino de un pelo, *O. flavescens*, se había descrito previamente como hospedador de *A. microchir* pero la información existente es, hasta cierto punto, confusa. De acuerdo a Kim *et al.* (1975) y Lauckner (1985), Ferris (1951) reporta a *A. microchir* como especie presente en *O. flavescens*. Sin embargo, Ferris se refiere a *Otaria hookeri* (sin. *Phocartos hookeri*), pero no a *O. flavescens*. Es probable que la sinonimia entre *Otaria* y *Phocartos* (mencionada en la monografía de Ferris) haya llevado a la confusión de considerar a *O. flavescens* como hospedador de *A. microchir*. Durante el desarrollo de este trabajo, se tuvo acceso a la literatura sobre la presencia de *A. microchir* en este hospedador, pero hasta donde se sabe, no había sido formalmente descrito por ninguna de esas fuentes. Hamilton (1939) reportó la presencia de varios especímenes de *Antarctophthirus* en lobos marinos de un pelo en las Islas Malvinas, los cuales envió al Museo Británico para su determinación. Sin embargo, la determinación específica no fue posible por no poder compararlos con material proveniente del hospedador tipo. Posteriormente, Carrara (1952) reportó a *A. microchir* en el mismo hospedador. Los especímenes fueron determinados en el Museo de La Plata, pero no fue posible localizar el material depositado. Recientemente, *A. microchir* fue identificado en *O. flavescens* de Chile (Crovetto *et al.*, 2009).

Los miembros del orden Phthiraptera (piojos chupadores y masticadores) se caracterizan por el alto grado de especificidad por su hospedador, siendo más del 70% de las especies parásitos de una única especie de hospedador (Smith, 2007). El mejor ejemplo probablemente lo constituyan la asociación entre los roedores de la familia Geomyidae y sus piojos masticadores. En general, cada especie de piojo está restringida a una única especie de geómido (Hafner *et al.*, 1994), lo cual se debe al hecho de que el ciclo completo del piojo se desarrolla sobre su hospedador. A lo cual se le suma que los geómidos se caracterizan por ser mamíferos poco sociales, con una dispersión limitada y raramente interactúan con otras especies (Hafner *et al.*, 1994; Light y Hafner, 2007). Esta combinación de características y particularidades en la historia de vida del parásito y el hospedador, ha conllevado un alto grado de codivergencia y coespeciación (ver Hafner y Nadler, 1988; Page *et al.*, 1995). Los piojos chupadores (Anoplura) también son parásitos obligados y permanentes de mamíferos, viviendo en el pelaje del hospedador. Los Anoplura evolucionaron a la par que sus hospedadores durante un largo tiempo evolutivo y, como consecuencia, muestran un alto grado de especificidad; más del 60% de las especies se encuentra asociada a un único hospedador (Kim, 1985).

32

Hasta el momento no existe evidencia concreta sobre las relaciones filogenéticas y evolutivas de los Echinophthiriidae, excepto un trabajo de Kim (1985) basado en algunos rasgos morfológicos. Sin embargo, la especificidad por sus hospedadores y sus particularidades morfológicas sugieren un proceso de coevolución que data desde que los ancestros de los actuales pinnípedos colonizaron el medio marino (Kim *et al.*, 1975). La especificidad de los equinoftíridos puede ser estrecha, con especies que parasitan especies de 1 o 2 géneros de hospedadores (*Lepidophthirus*, *Proechinophthirus* y *Latagophthirus*), o bastante laxa, con géneros como *Echinophthirus* y *Antarctophthirus* que infectan 5 y 9 especies, respectivamente (Kim *et al.*, 1975). Estos últimos incluyen a la especie politépica *E. horridus*, que infecta a 7 especies de focas (Phocinae) y *A. microchir*, que infecta 5 especies de lobos marinos (Otarinae). En el caso de *A. microchir*, resulta extraño que la misma especie haya sido reportada parasitando 5 especies diferentes de lobos marinos en ambos hemisferios (Australia, Nueva Zelanda, y Norte y Suramérica). Fahrenholz (1939), al comparar las

ilustraciones de *A. microchir* de Ferris (1934) y Enderlein (1906), notó diferencias morfológicas en la forma del abdomen, los márgenes del tórax y las escamas del sexto tergo, lo que le llevó a erigir una nueva subespecie: *A. m. californianus*, parásita del lobo marino de california, *Zalophus californianus*. Sin embargo, Ferris (1951) cuestionó la validez de esta subespecie argumentando que las discrepancias observadas por Fahrenholz probablemente fueran consecuencia del diferente proceso de montaje de los especímenes.

A nivel específico, la taxonomía tradicional de los Phthiraptera adopta dos enfoques (Mey, 1998). El primero considera que especies morfológicamente idénticas provenientes de diferentes especies de hospedadores son especies de piojos distintas (criterio basado en la especificidad por el hospedador). El segundo enfatiza que los caracteres morfológicos son un criterio clave para diferenciar especies (Page *et al.*, 2004). En este contexto resulta complicado establecer un criterio de especificidad en piojos. Es más, en general la taxonomía de los piojos resulta compleja por lo conservativa que suele ser la morfología de las especies (Page *et al.*, 2004). Algunos autores sugieren que sólo un análisis multivariado puede ayudar a detectar diferencias significativas entre especies relacionadas de piojos provenientes de diferentes hospedadores (Ramli *et al.*, 2000). Por otra parte, especies morfológicamente indistinguibles pueden ser genéticamente diferentes. De hecho, existen numerosos ejemplos de especies crípticas de piojos (Page *et al.*, 2004). En el caso de *A. microchir*, el segundo enfoque sería el adecuado para explicar su aparición en especies diferentes de hospedador, en diferentes áreas geográficas. La pregunta que surge es si *A. microchir* de diferentes especies de lobos marinos representa en realidad un complejo de especies crípticas. Sólo el análisis molecular podrá responder esta cuestión.

Capítulo III

Dinámica poblacional de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo en Patagonia.

Los contenidos del presente capítulo han sido publicados en:

Aznar, F.J., M.S. Leonardi, B. Berón-Vera, D.G. Vales, S. Ameghino, J.A. Raga, and E.A. Crespo. 2009. Population dynamics of *Antarctophthirus microchir* (Anoplura: Echinophthiriidae) in pups from South American sea lion, *Otaria flavescens*, in Northern Patagonia. *Parasitology* **136**, 293- 303.



Resumen

En el presente capítulo se describe la dinámica poblacional de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo. El ciclo de vida se infirió siguiendo diferentes crías a lo largo del tiempo. Se realizó un modelo de proyección para entender el proceso demográfico de los piojos. Los resultados indican que *A. microchir* completa su ciclo en aproximadamente 20 días; se requieren 9 días para que se desarrollen los huevos y un mínimo de 8 días para que se desarrollen los tres estadios ninfales. Por otro lado, se aportó evidencia de que la principal vía de transmisión es vertical y que las crías de lobo marino juegan un rol fundamental en la ecología de los piojos, dado que son el único grupo de edad que permanece suficiente tiempo en tierra para garantizar el desarrollo completo del ciclo. Este trabajo constituye el primer estudio epidemiológico de un piojo de la familia Echinophthiriidae realizado con datos tomados bajo condiciones naturales y con robustez estadística.

Introducción

Los piojos de la familia Echinophthiriidae representan un parte integral de la fauna parasitaria de los pinnípedos, habiendo sido descritos en todas las especies alrededor del mundo (Murray, 1976). Como se mencionara en la Introducción General, los equinoftridos se distinguen de los demás miembros del suborden Anoplura por sus particularidades morfológicas, comportamentales y/o ecológicas, las cuales son resultado de la adaptación al modo de vida anfibio de sus hospedadores (Kim, 1971; Murray, 1976; Melhlhorn *et al.*, 2002).

Los principales estudios relacionados a la ecología y ciclo de vida de estas especies datan de las décadas de 1960-70. Un grupo de estos estudios se centran en 2 especies de fócidos: *Lepidophthirus macrorhini* en el elefante marino del sur, *Mirounga leonina* (Murray, 1958, 1964, 1967; Murray y Nicholls, 1965) y *Antarctophthirus ogmorhini* en la foca de Weddell, *Leptonychotes weddelli* (Murray, 1964; Murray *et al.* 1965). El otro grupo de estudios se centró en los piojos que infectan al lobo fino del norte, *Callorhinus ursinus* (Otaridae): *Antarctophthirus callorhini* y *Proechinophthirus fluctus* (Kim, 1971, 1972, 1975). Una de las principales conclusiones de estos estudios fue que la transmisión y la reproducción de los equinoftridos pueden ocurrir sólo cuando los hospedadores están en la tierra y, por lo tanto, el número de generaciones anuales se encuentra restringido por los períodos que los hospedadores pasan fuera del agua.

Considerando los problemas metodológicos inherentes al trabajo con pinnípedos (ver Thompson *et al.*, 1998), los trabajos mencionados anteriormente tienen un valor excepcional, ya que combinan una gran variedad de técnicas de muestreo. Experimentos realizados *in vitro* permitieron determinar las principales restricciones fisiológicas y algunos parámetros de la historia de vida de estos piojos; al retener animales cautivos, se pudo obtener información acerca de la dinámica de la transmisión y la selección de hábitat; mientras que estudios realizados en el campo permitieron entender aspectos relacionados con la estructura poblacional en condiciones naturales. Sin embargo, estos estudios presentan ciertas limitaciones. En particular, la información obtenida de unos pocos individuos cautivos resulta de valor limitado para inferir patrones poblacionales, mientras que el conteo esporádico de

piojos en ocasiones puntuales sólo brinda una imagen estática de la dinámica poblacional.

En el presente capítulo, se investigó la dinámica poblacional de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, utilizando un enfoque diferente: se muestrearon periódicamente crías de edad conocida en condiciones naturales. Las principales ventajas de la metodología empleada son los siguientes: (1) los individuos analizados no estaban infectados al comienzo del estudio; (2) se conocía la edad de la infestación; (3) se mantuvo al mínimo el disturbio sobre los hospedadores; (4) las inferencias poblacionales se basaron en análisis estadísticos; (5) la infestación en las crías son parte fundamental para entender el ciclo de vida y la dinámica poblacional de *A. microchir*.

La dinámica poblacional de *A. microchir* en Patagonia resulta interesante por el contexto ecológico en el cual se desarrolla. El ciclo se desarrolla en una región templada, con temperaturas medias en verano de 20°C (Yorio *et al.*, 1995). Los trabajos precedentes sobre dinámica poblacional de equinoftíridos se llevaron a cabo en colonias situadas en altas latitudes, donde la temperatura se encuentra en un rango entre -2 a 10°C (Murray y Nicholls, 1965; Murray *et al.*, 1965; Kim, 1975). Este es un punto fundamental, dado que la temperatura es un factor determinante en la supervivencia, la reproducción y el desarrollo de los huevos de los anopluros (Murray, 1987). De hecho, los equinoftíridos que se distribuyen en regiones frías presentan adaptaciones ecológicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir a las bajas temperaturas (Murray, 1976). Por otro lado, *A. microchir* puede reproducirse en un período muy corto de tiempo (como se explicó en la Introducción General, las crías permanecen alrededor de un mes en tierra). Esta situación es similar a la que enfrentan *A. ogmorhini* en las focas de Weddell (Murray y Nicholls, 1965) y *L. macrorhini* en el elefante marino del sur (Murray *et al.*, 1965). Esta combinación de factores, clima templado con períodos cortos para reproducirse, posiblemente hayan derivado en un tiempo de reproducción más corto en *A. microchir* que en otras especies de equinoftíridos.

El presente capítulo tiene dos objetivos específicos. Primero, describir la dinámica poblacional de *A. microchir* identificando los factores que influyen los patrones de transmisión y los cambios en la dinámica poblacional durante el período en tierra de las crías de lobo marino. Segundo, desarrollar un modelo simple de crecimiento poblacional, que permita compararlo con datos empíricos, para de esta manera determinar la duración aproximada del ciclo de vida de *A. microchir* y, por tanto, el número de generaciones que puede acomodar durante la temporada reproductiva de su hospedador.

Materiales y métodos

Recolección de datos

El estudio se llevó a cabo en dos temporadas reproductivas consecutivas: 2006/7 y 2007/8, en la Reserva Natural Punta León, comenzando el 3 de enero (aproximadamente una semana después de los primeros nacimientos) y finalizando el 2 de febrero.

En el transcurso de los tres primeros días del estudio, se capturaron las crías siguiendo la metodología descrita en la Introducción General. En total se marcaron 73 crías (39 machos, 34 hembras) en 2007 y 63 (35 machos, 28 hembras) en 2008 (ver tiempos de manipulación en Tabla 3.1). Las crías marcadas se recapturaron al azar y se peinaron entre los días 1-6 (20 crías en 2007, 20 en 2008), 19-20 (20 y 21 crías) y 27-31 (33 y 22 crías) días posteriores al marcado inicial. Como se explicara en la Introducción General, la edad inicial de las crías se determina en función del grado de cicatrización del cordón umbilical. Siguiendo esta metodología, se puede determinar con seguridad la edad de las crías entre 1 y 3 días de edad; en crías de hasta 8 días el error en la determinación es de alrededor de 2 días. Así, una cría que se considera de 4 días puede tener 6, y viceversa. El rango inicial de edad de las crías fue de 1 a 8 en 2007 y entre uno a siete en 2008; los valores medios no difirieron significativamente entre los años (2 ± 2 días en ambos casos; test de *t* con valores log- transformados, $p > 0,05$). En ambos años, el 70% de las crías tenía 3 días o menos.

Como se explicará en el Capítulo V, el hábitat preferido por la mayoría de los estadios de *A. microchir* es el vientre. Por lo tanto, sólo esta zona fue analizada siguiendo la metodología planteada en la Introducción General.

Los piojos se clasificaron según su estadio ninfal siguiendo el criterio establecido en el Capítulo II. En este caso, no se consideraron los huevos en los análisis.

Tabla 3.1- Tiempos de manipulación de las crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, durante el proceso de recolección de *Antarctophthirus microchir*. Los asteriscos señalan las actividades realizadas sobre las crías.

Año	n	Tiempo (promedio \pm desvío estándar)
2007*	23	4' 52" \pm 2' 55"
2008**	49	6' 47" \pm 1' 46"
Total	72	6' 10" \pm 2' 21"

* Peso, inyección de fitohemaglutinina (PHA)

** Peso, medida de largo total, a 9 de ellas se les colocó una caravana plástica en su aleta y a otras 18 se les retiró las previamente colocadas por no presentar una correcta cicatrización.

Patrones de infestación

Cinco crías del 2007, pero ninguna de las del 2008, tenían más de 30 días al momento del muestreo de piojos. Estas crías se excluyeron de los análisis, porque el hecho de empezar a nadar puede afectar la estructura poblacional de *A. microchir* y afectar los resultados (ver en la Discusión).

Los patrones de infestación se estimaron de acuerdo con Bush *et al.* (1997) y Rózsa *et al.* (2000). Se calcularon los intervalos de confianza de Sterne del 95% para la prevalencia (Reiczigel, 2003) y la proporción de sexos en general (número de machos/ total de la población). Los intervalos de confianza al 95% para la intensidad y abundancia medias y el promedio de sexos por hospedador se estimaron mediante la técnica de remuestreo *bootstrap*, usando 10000 réplicas (Rózsa *et al.*, 2000). La prevalencia y la proporción de sexos en cada año se compararon por medio de un Test de Fisher, mientras que para comparar la estructura poblacional se utilizó un MANOVA no paramétrico basado en el índice de similaridad de Bray-Curtis (Anderson, 2001). La significancia de los valores F se computó por permutación de

los grupos con 10000 réplicas. La comparación de la abundancia media entre años de los estadios se realizó con un test t basado en remuestreos *bootstrap* (Rózsa *et al.*, 2000).

Para investigar los patrones de transmisión, se seleccionaron las crías entre 1 y 3 días de edad, en las cuales la infestación es sin lugar a duda consecuencia de la transmisión vertical (ver Capítulo VI). Se comparó la prevalencia, abundancia media y la estructura poblacional entre los años de muestreo como se describiera anteriormente. Además, se utilizó un Test de Page (Conover, 1999) para testear en cada año independientemente, si existe una tendencia de incremento de la abundancia desde el estadio menos desarrollado (ninfas 1) al más desarrollado (adultos).

Los cambios temporales en la estructura poblacional de *A. microbir* en crías infectadas se describieron usando modelos de regresión local no-paramétrica LOESS (del inglés: *robust local nonparametric regression models*) (Cleveland, 1979) utilizando a la edad de la cría como predictor y valores transformados (\log_{10}) del número de ninfas 1, ninfas 2, ninfas 3 y adultos como variables dependientes. Las regresiones LOESS ajustan las curvas a cada subconjunto de datos y permite discernir la estructura sistemática de los datos cuando las variables presentan relaciones no-lineales muy complejas (para más detalles ver Cleveland y Devlin, 1988; Jacoby, 2000). Para elegir la mejor combinación de parámetros, evitando el sobre o subajuste de los datos (Loader, 1999; Schucany, 2004) se debe considerar tanto el grado del polinomio utilizado como la elección de una fracción óptima de datos para cada ajuste local (lo cual se denomina como ancho de banda). Por lo tanto, para elegir adecuadamente la mejor combinación de parámetros se analizaron:

(i) Gráficos de validación cruzada (Loader, 1999)

(ii) Gráficos de residuales, variando el grado del polinomio (1 ó 2) y el ancho de la banda (0,4 a 0,8) (Loader, 1999; Jacoby, 2000)

(iii) La estabilidad de la tendencia, definiendo intervalos de confianza mediante una regresión *bootstrap* (con 1000 repeticiones) para cada combinación de parámetros (Efron, 2005).

En todos los casos, el mejor ajuste se obtuvo utilizando una regresión lineal (grado de polinomio= 1) y un ancho de banda de 0,5. Para cada una de las curvas LOESS seleccionadas se estableció un intervalo de confianza del 95% (Loader, 1999).

Las regresiones LOESS de cada año se compararon utilizando una aproximación al test F:

$$F = \frac{(RSS_{combinados} - RSS_{separados}) / (Gdl_{combinados} - Gdl_{separados})}{RSS_{separados} / Gdl_{separados}}$$

En donde, $RSS_{combinados}$ y $Gdl_{combinados}$ son, respectivamente, la suma de cuadrados residual y sus equivalentes grados de libertad del ajuste LOESS utilizando los datos agrupados de ambos años; y $RSS_{separados}$ y $Gdl_{separados}$ son, respectivamente, la suma de cuadrados residual y los grados de libertad del ajuste LOESS para cada año por separado (Cleveland y Devlin, 1988; Loader, 1999). Los grados de libertad asociados a este test se calculan de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{Gdl_{combinados} - Gdl_{separados}}{Gdl_{separados}}$$

Modelos de proyección poblacional

El tiempo de generación y los patrones de transmisión son elementos cruciales en la historia de vida de cualquier especie de parásito. Particularmente en el caso de los piojos de la familia Echinophthiriidae resultan aún más fundamentales, dado que determinan el número de cohortes que se pueden acomodar durante la temporada reproductiva del hospedador (Murray, 1976). Para determinar el rango más probable de tiempo generacional (de huevo a huevo) de *A. microchir* se desarrollaron modelos matriciales determinísticos de crecimiento poblacional basado en tablas de vida, asumiendo valores lo más realistas posible (ver en Murray y Gordon, 1969 un procedimiento similar). Probablemente, ésta sea la mejor opción, por no decir la única, cuando muchos de los datos necesarios para construir las tablas de vida se

desconocen o son imposibles de conseguir, lo cual es el caso de la mayoría de las especies de Anoplura (ver Kim, 1987).

Para realizar los análisis nos centramos en el subgrupo de crías menores a 15 días de edad dado que presentaron una asociación lineal en la regresión entre el tamaño de la población de piojos (transformado en \log_{10}) y la edad de la cría. De esta manera, fue posible comparar las curvas de crecimiento y asignar tiempos generacionales posibles: tiempos generacionales cortos resultan en pendientes pronunciadas y viceversa.

Se encontró información de la historia de vida de 18 especies de Anoplura, en todos los casos parcial, con excepción de *Pediculus humanus*. De estas especies, 3 son miembros de la familia Echinophthiriidae y las restantes 15 pertenecen a otras familias (ver el detalle en la Tabla 3.2). A partir de esta información se construyó un grupo de tablas de vida potenciales, procediendo de la manera que se detalla a continuación. En lo que respecta a la duración de los estadios, se seleccionaron rangos de valores para los huevos (5- 10 días), N1 (2- 3 días), N2 (3- 4 días), N3 (3- 4 días), período de pre- oviposición (1 día) y adultos (> 15 días), en función de la información disponible para otros equinoftíridos (Tabla 3.2). La combinación de esta información llevó a determinar tiempo generacionales mínimos de 14 días y máximos de 23. El período mínimo permitiría acomodar 3 generaciones en el mes que las crías pasan en tierra, encontrándose muy cerca de los períodos más cortos de desarrollo descritos en anopluros (ver Murray, 1987); mientras que el período mayor permitiría ajustar sólo 2 generaciones de *A. microchir*.

Tabla 3.2- Información sobre la historia de vida de piojos de la familia Echinophthiriidae y otros Anoplura.

(La duración se encuentra expresada en días y la fecundidad como número de huevos por día. La probabilidad de supervivencia se calculó a partir de información obtenida por métodos experimentales, expresada como el número de sobrevivientes luego de un período de tiempo determinado. Por ejemplo, Murray y Nicholls (1965) encontraron que de una muestra inicial de 70 N1s+N2s, 20 se convirtieron a adultos luego de 6 días. Por lo tanto, la probabilidad diaria combinada de supervivencia para las N1 y las N2 es de 0,815 dado que $70 \times 0,815^6 \approx 20$).

Taxon	Duración del estadio					Fecundidad [Período preov.]	Tiempo Generacional
	[Probabilidad diaria de supervivencia]						
	Huevo	N1	N2	N3	Adultos		
Echinophthiriidae*							
<i>Lepidophthirus macrorhini</i>	5-10 [0,985- 0,990]	3-4 [?]	3-4 [0,815]	3-4 [0,815]	>28 [0,975]	6,6- 8,6 [?]	21
<i>Antarctophthirus callorhini</i> §	7 [?]	2-3 [?]	4 [?]	4 [?]	?[?]	8-9 [1]	18- 20
<i>Antarctophthirus ogmorhini</i>	>7[?]	?[?]	?[?]	?[?]	>28 [?]	6-10 [?]	21- 28
Otros Anoplura	5-25 [0,926- 0,983]	3-9 [0,856- 0,993]	3-7 [0,856- 0,993]	3-10 [0,856- 0,993]	10- 45 [0,983]	1-9	13- 43

* Fuentes: *L. macrorhini* Murray y Nicholls, 1965; *A. callorhini* Kim 1972, 1975; *A. ogmorhini* Murray et al. 1965. La información sobre la duración de los estadios, la fecundidad y el ciclo de vida de otros anopluros se obtuvo de Evans y Smith (1952) para *Pediculus humanus*; Murray (1961) para *Polyplax serrata*, las revisiones de Kim (1987) y Price y Graham (1997), incluyen información relevante de 5 especies de *Haematopinus*, 6 de *Linognathus*, 1 de *Solenopotes* y 1 de *Pthirus*. La información sobre la supervivencia diaria solo se encuentra completa para *Pediculus humanus* (Evans y Smith, 1952); información parcial de algunos estadios se obtuvo para *P. serrata* (Murray, 1961); *Haematopinus tuberculata* (Chaudhuri y Kumar, 1961); *H. suis* (Florence, 1921), *H. eurysternus* (Craufurd-Benson, 1941a) y *Linognathus pedalis* (Scott, 1950). Existe mayor cantidad de información disponible para piojos masticadores, siendo los valores reportados similares a los expresados en la tabla (ver las referencias en Price y Graham, 1997). § Se asume que la duración de los estadios es similar para *Proechinophthirus fluctus* (Kim, 1975).

A partir de los valores de duración de cada uno de los estadios ninfales (Figura 3.3), se obtuvieron 30 tipos de modelos. Para cada uno de ellos, se consideraron 5 valores realistas de tasa de supervivencia para cada estadio (0,80; 0,85; 0,90; 0,95 y 0,99), y 5 valores posibles de tasa de fecundación (6, 7, 8, 9 y 10 huevos); estos valores se determinaron en función de la información disponible para otros anopluros (Tabla 3.2). En consecuencia, existen 3125 posibles combinaciones de estos valores, de los cuales se seleccionaron aleatoriamente 100 de ellos para construir tablas de vida. Dado que existen 30 tipos de modelos posibles para cada estadio de desarrollo, en total se produjeron 3000 tablas de vida individuales.

Para cada una de estas tablas de vida, se calculó el crecimiento poblacional teórico durante los primeros 15 días asumiendo una tasa constante de transmisión

vertical (madre a cría) durante los primeros 10 días de 2 N1s, 6 N2s, 6 N3s y 7 adultos. Esta proporción se eligió sobre la base de la infestación general en crías de ≤ 3 días de edad (ver en Resultados). Para lograr linealidad entre la edad de la cría y los valores poblacionales, estos últimos fueron transformados en \log_{10} , calculándose posteriormente la pendiente de la regresión de mínimos cuadrados. Se calcularon las pendientes promedio para cada una de las 30 combinaciones posibles del tiempo generacional, basándose en 100 réplicas y estableciendo intervalos de confianza del 95%. Por último, se compararon las curvas teóricas con aquellas obtenidas empíricamente.

La mayoría de los análisis estadísticos se realizaron los programas SPSS v. 15.0 y SYSTAT 12.0. Los modelos se desarrollaron con las planillas de cálculo de Excel. Análisis más específicos se llevaron a cabo con software libre: el programa “Past” para los MANOVAS no paramétricos; el procedimiento *Locfit* del paquete estadístico R se utilizó para estimar y comparar las regresiones LOESS, y Quantitative Parasitology v. 3.0 (Reiczigel y Rózsa, 2005) se utilizó para estimar los parámetros de la infección y para realizar las comparaciones pareadas mediante el test de *t* basado en remuestreos *bootstrap*.

44

Resultados

La gran mayoría de las crías examinadas (124 de 136) se encontraron infectadas con *A. microchir* y la prevalencia no difirió entre los años de muestreo (test exacto de Fisher, $p=0,131$) (Tabla 3.3). De las 12 crías no infectadas, 10 (9 en el 2007 y 1 en el 2008) tenían 1 día de edad, 2 del 2008 entre 2 y 3 días. La intensidad media de *A. microchir* no difirió significativamente entre los años muestreados (test *t bootstrap*, $t=0,465$, $p=0,654$); el rango de intensidad fue de 1 a 382 en 2007, y de 1 a 466 en 2008. Sin embargo, la comparación de la estructura poblacional general se acercó a los niveles de significancia (MANOVA no paramétrico, $F=2,098$, $p=0,066$). Las comparaciones individuales entre los estadios indicaron que la abundancia media de las N2 y N3 fue muy similar en ambos años, pero las crías analizadas en 2007 presentaban mayor cantidad de N1 (test *t bootstrap*, $t=2,151$, $p=0,038$) mientras que las analizadas en 2008 poseían un mayor número de adultos ($t=2,072$, $p=0,039$) (Tabla

3.3). La proporción de sexos en la muestra no difirió significativamente del 1:1 y no se encontraron diferencias entre los años (2007- 0,459 [IC 95%: 0,409- 0,509]; 2008- 0,470 [0,430- 0,510]; test exacto de Fisher, $p=0,795$).

Un total de 34 crías (18 del 2007, 16 del 2008) tenían ≤ 3 días al momento de ser peinadas. En este subgrupo, la prevalencia de *A. microchir* fue consistentemente mayor en las crías analizadas en el 2008 (Figura 3.1); esta diferencia resultó significativa para los adultos (test exacto de Fisher, $p=0,02$). La estructura poblacional global también difirió entre los años de muestreo (MANOVA no paramétrico, $F=3,132$, $p=0,036$); la comparación univariada indicó que la abundancia media de todos los estadios fue mayor en 2008, pero resultó estadísticamente significativa sólo en los adultos ($t= 2,05$, $p=0,036$). En cada año en particular, la prevalencia difirió significativamente entre los estadios (test de Cochran, 2007- $Q=8,5$, 3 gl., valor $p=0,037$; 2008- $Q=13,55$, $p=0,004$) con valores que se incrementan desde las N1 a los adultos (Figura 3.1). En lo que respecta a la intensidad, esta tendencia resultó significativa en ambos años (test de Page, 2007- $L=242$, valor $p<0,01$; 2008- $L=350,2$, $p=<0,01$).

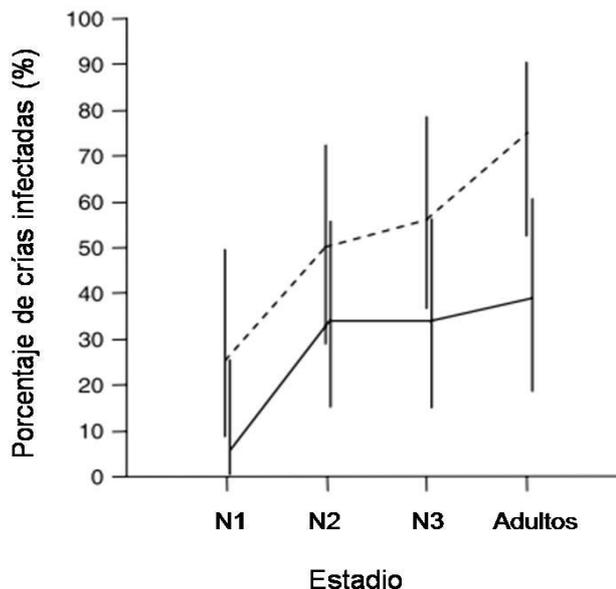


Figura 3.1- Prevalencia de los estadios (N1-N3, ninfas 1 a 3) del piojo *Antarctophthirus microchir* en crías entre 1 y 3 días de edad de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*. La línea continua y la de guiones conectan los valores para la muestra de 2007 (n=18) y 2008 (n=16) respectivamente. Las barras verticales corresponden a los intervalos de confianza del 95%.

En la Figura 3.2 se presentan los gráficos de las regresiones LOESS de los valores transformados de intensidad de cada estadio de *A. microchir* en función de la edad de la cría. Existen diferencias significativas entre los años de muestreo para todos los estadios, pero no para la intensidad total (Tabla 3.4). La mayor diferencia se encuentra en las N1 y, particularmente, en los adultos (Figuras 3.2b, d; Tabla 3.4). El número de N1 en crías pequeñas (≤ 10 días de edad) fue similar en ambos años, pero se incrementó más en las crías nacidas en 2007 con respecto a las de 2008 (Figura 3.2b). Contrariamente, el número de piojos adultos fue consistentemente mayor en las crías del 2008, excepto para las crías de 28- 30 días de edad (Figura 3.2d). A pesar de estas diferencias numéricas, las regresiones con valores log-transformados de intensidad no difirieron entre los años para ningún estadio (Tabla 3.4), sugiriendo de esta manera que la tendencia poblacional básica se mantiene estable.

En la muestra de 2007, 5 crías tuvieron más de 30 días al momento de ser analizadas. Al comparar estas crías con el subgrupo de crías entre 28 a 30 días ($n=7$), no se encontraron diferencias en la abundancia media de N2, N3 ni adultos (test *t bootstrap*, $p>0,22$, para todos los estadios), pero resultó significativo en el caso de las N1 ($t=-2,574$, $p= 0,0240$), aunque la muestra analizada fue pequeña. El número de ninfas 1 decreció bruscamente en las crías de más de 30 días (Figura 3.2b).

Tabla 3.3- Parámetros de infección de individuos de *Antarctophthirus microchir* colectados del vientre de crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens* en Patagonia, Argentina. (Los datos en la fila superior para cada estadio corresponden al 2007 ($n=68$ crías*) y los de la fila inferior al 2008 ($n=63$). IC: Intervalo de confianza)

Estadio	Prevalencia (%) (IC 95%)	Intensidad		Abundancia media (IC 95%)
		Media (IC 95%)	Mediana	
Ninfas 1	69,1 (57,2-79,3)	22,9 (16,1- 32,1)	11,0	15,8 (10,8- 22,9)
	69,8 (57,2- 80,4)	11,6 (7,4- 19,6)	5,0	8,1 (5,0- 14,1)
Ninfas 2	79,4 (67,8- 87,7)	30,6 (22,7- 42,6)	18,5	24,3 (17,7- 35,4)
	85,7 (74,8- 92,6)	30,3 (19,8- 51,0)	12,0	26,0 (16,4- 44,4)
Ninfas 3	77,9 (66,3- 86,4)	15,8 (11,5- 23,7)	9,0	12,3 (8,7- 18,5)
	87,3 (76,4- 94,0)	15,4 (11,1- 23,2)	11,0	13,4 (9,6- 21,2)
Adultos	77,9 (66,3- 86,4)	7,4 (5,8- 9,7)	5,0	5,8 (4,4- 7,7)
	93,7 (84,4- 97,8)	10,3 (7,8- 14,6)	6,0	9,7 (7,2- 13,5)
Total	86,8 (76,6- 93,1)	67,1 (51,0- 89,8)	44,0	58,2 (43,4- 78,2)
	95,2 (86,8- 98,7)	60,0 (42,8- 92,1)	35,5	57,1 (40,4- 87,3)

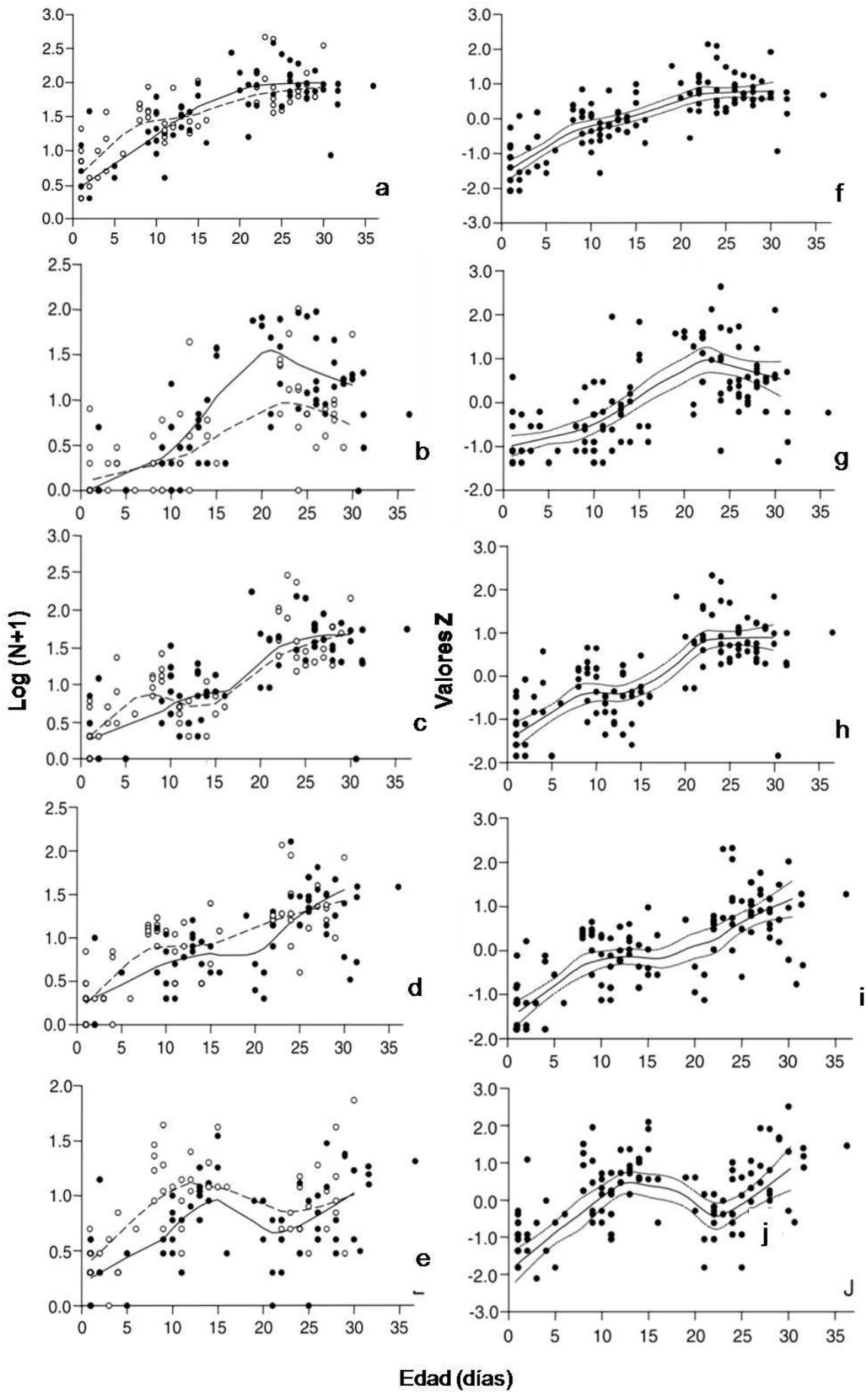
*Cinco crías de la muestra original se excluyeron de estos cálculos porque tenían más de 30 días de edad en el momento de analizarlas (ver en el texto).

Tabla 3.4- Comparación interanual entre las curvas de regresión LOESS de los valores en bruto y estandarizado, de la transformación logarítmica del número de individuo de cada estadio de desarrollo de *Antarctophthirus microchir* y la edad de las crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens* (ver Figura 3.2)

(Los grados de libertad equivalentes, que fueron los mismos en todos los test de F (3,94 y 111,26, respectivamente), se redondearon al entero más cercano para calcular el valor *p*)

Estadio	Intensidad log-transformada		Valores Z de la intensidad log-transformada	
	F	P	F	P
Ninfas 1	3,545	0,014	0,993	0,535
Ninfas 2	2,846	0,027	1,859	0,123
Ninfas 3	3,096	0,029	2,077	0,089
Adultos	4,857	0,001	1,973	0,103
Total	1,334	0,262	1,992	0,101

Figura 3.2 (En página siguiente)- Modelos de regresión LOESS para los valores transformados en el \log_{10} y sus valores correspondientes valores estandarizados, del total de cada estadio y la intensidad total de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*. Las crías con una edad mayor a 30 días se excluyeron de los cálculos. **a/e-** Regresiones de los valores transformados por el \log_{10} . Puntos negros, líneas continuas corresponden al año 2007; puntos blancos, líneas de guiones, a la muestra del 2008; **f/j-** regresiones de los valores estandarizados de las transformaciones logarítmicas combinando la información de ambos años de muestreo. Las líneas de puntos delimitan los intervalos de confianza del 95% de las curvas LOESS. **a,f-** Total de la población; **b, g-** ninfas 1; **c, h-** ninfas 2; **d, i-** ninfas 3; **e, j-** adultos



(Referencia en página anterior)

En la Figura 3.3 se muestran las curvas obtenidas de las posibles combinaciones de tiempo generacional con valores de historia de vida estimados para *A. microchir*. La variabilidad en las curvas fue altamente dependiente de la duración de período de incubación de los huevos, con cambios menores asociados a la duración de los estadios ninfales (Figura 3.3). Esto no resulta sorprendente dado que el período de incubación determina el momento en el que aparece la segunda generación de piojos, afectando fuertemente la curva de crecimiento poblacional (considerando las ninfas más los adultos). Las curvas empíricas de crecimiento poblacional fueron similares en 2007 y 2008: 0,76 (IC 95%: 0,5- 0,100) y 0,73 (IC 95%: 0,56- 0,88), respectivamente.

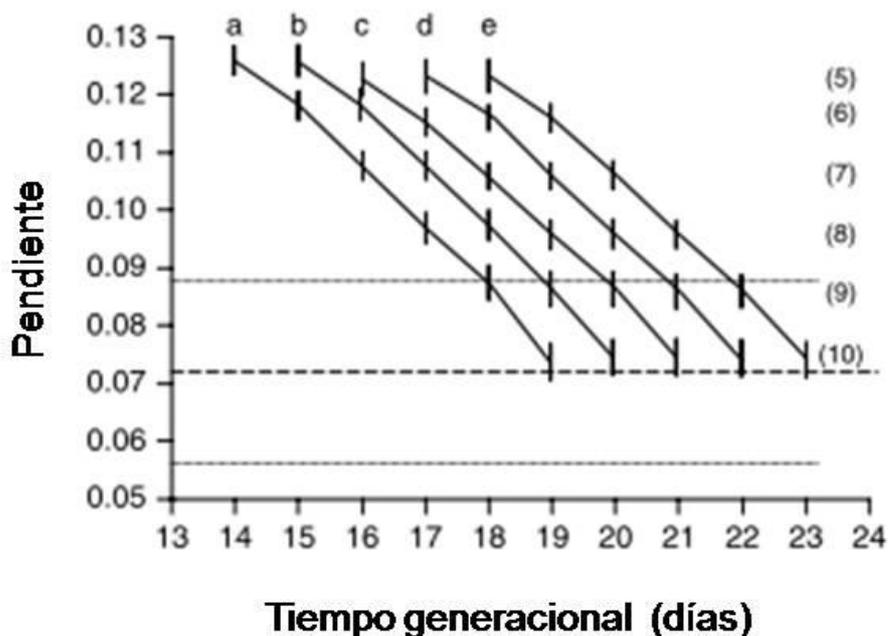


Figura 3.3- Promedio de las pendientes de las regresiones teóricas entre el tamaño poblacional de *Antarctophthirus microchir* transformado logarítmicamente (\log_{10}) y la edad de las crías de lobo marino, para todas las crías ≤ 15 días de edad. Se consideraron un total de 30 combinaciones diferentes de duración de los estadios; la columna de la derecha indica el período de incubación de los huevos, y la letra arriba identifica el período de duración de las ninfas 1, 2 y 3 (a: 2, 2 y 3 días; b: 3, 3, 3; c: 2, 4, 4; d: 3, 4, 4; e: 4, 4, 4); en todos los casos se consideró un período de preoviposición de un día. Por ejemplo, la combinación en el extremo inferior derecho asume un período de incubación de 10 días, 4 días de duración para cada uno de los estadios, más un período de 1 día correspondiente a la pre-oviposición; por lo tanto, el tiempo generacional (de huevo a huevo) de esta combinación es de 23 días. Variando la tasa de fecundidad diaria y la tasa de supervivencia de cada estadio se obtuvieron 100 modelos de regresión para cada una de las 30 combinaciones posibles entre la duración de los estadios ninfales (ver explicación detallada en el texto). Las barras verticales representan los intervalos de confianza del 95% para las pendientes promedio. La línea de guiones representa la pendiente empírica observada para *A. microchir*, y las líneas de puntos definen el intervalo de confianza.

El ANCOVA indicó que las curvas no difirieron significativamente entre años ($F_{(1,63)} = 0,040, p=0,842$) y, por tanto, se analizó una única curva agrupando los datos de ambos años. La comparación entre las curvas teóricas y empíricas de crecimiento poblacional sugirió un tiempo generacional entre 18 a 23 días (el valor máximo se determinó por defecto), y un período mínimo de incubación de 9 días (Figura 3.3). De hecho, se observa un alza en la tendencia de incremento de las ninfas 1 en ambos años en las crías de 9 días o mayores (Figura 3.2b, g), lo cual probablemente sea un indicativo de que una nueva generación está siendo reclutada en las crías ≥ 9 días de edad.

En la Figura 3.4, se ilustran dos ejemplos de proyecciones poblacionales para cada estadio en crías de ≤ 30 días de edad, para tiempos generacionales de 18 y 23 días. El único supuesto extra que se ha asumido es una esperanza de vida de los adultos mayor a 30 días. Nótese que la forma general de la proyección concuerda con los datos empíricos (Figura 3.2g, j), y no se ve alterada asumiendo que existen eventos adicionales de transmisión vertical u horizontal (cría a cría) en crías de más de 10 días.

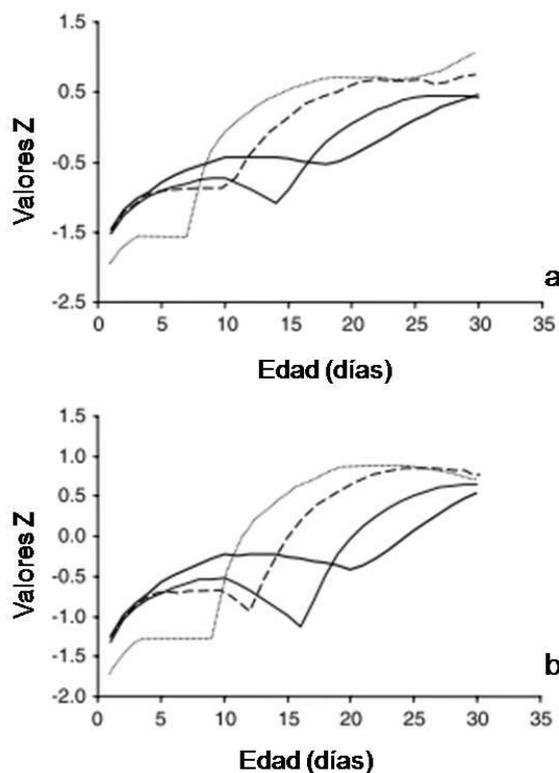


Figura 3.4- Dos ejemplos de las proyecciones poblacionales teóricas (a partir de la estandarización de los valores de abundancia transformados logarítmicamente) de los diferentes estadios de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo de 1 a 30 días de edad. Se consideró sólo la transmisión vertical durante los primeros 10 días de vida, considerando “paquetes” diarios de 2 ninfas 1, 6 ninfas 2, 6 ninfas 3 y 7 adultos. Línea de puntos: ninfas 1. Línea de guiones: ninfas 2. Línea continua fina: ninfas 3. Línea continua gruesa: adultos. **a-** Tiempo generacional: 18 días. Duración de los estadios (en días): huevo 6, N1 3, N2 4, N3 4, adultos >30 . Tiempo de pre-oviposición 1 día. **b-** Tiempo generacional: 23 días. Duración de los estadios (días): huevo 10, N1 4, N2 4, N3 4, adultos >30 . Tiempo de preoviposición 1 día. En ambos ejemplos se consideró una tasa de supervivencia diaria de 0,90 para todos los estadios, y una tasa de fecundidad diaria de 8 huevos/hembra (ver en el texto para más detalles).

Discusión

En el presente capítulo se analiza por primera vez la dinámica poblacional de una especie de equinoftrido en condiciones naturales y utilizando muestras replicadas. Sin embargo, este estudio se basa en el análisis de los piojos presentes solo en una parte del cuerpo del hospedador. Ante una situación similar, Thompson y colaboradores (1998) contabilizaron individuos de *Echinophthirius horridus* sólo en la superficie dorsal de las aletas posteriores de las focas comunes (*Phoca vitulina*). La decisión se justificó a partir de evidencia previa que indicaba que dicha región era el microhábitat preferido por los piojos. El muestreo de *A. microchir* se basa en el mismo criterio, dado que la zona ventral es la preferida por la mayoría de los estadios (ver Capítulo V sobre selección de hábitat).

Como se mencionara en la Introducción general, *A. microchir* cuenta con un período acotado de un mes para reproducirse en las crías recién nacidas de *O. flavescens*. Posteriormente, las crías comienzan a nadar y a cambiar el pelaje, y ambos procesos generan importantes eventos de mortalidad para los piojos (Murray 1976, 1987). Los datos obtenidos sugieren que las ninfas 1 se ven más afectadas por las inmersiones que los restantes estadios, observándose un claro descenso en su número en crías de más de 30 días de edad. Las ninfas 1 constituyen el único estadio que carece de escamas en su superficie cuticular (ver Capítulo II) y es aparentemente el más afectado por las inmersiones de su hospedador. Esto indicaría, por un lado, la dependencia fisiológica de *A. microchir* del oxígeno atmosférico y por otro, una posible relación entre la supervivencia subacuática y la presencia de escamas.

Como se explicará en mayor detalle en el capítulo VI, la transmisión vertical de *A. microchir* se da a las pocas horas de nacida de la cría: la gran mayoría de las crías de 1 día se encontraron infectadas y todas las crías no infectadas tenían ≤ 3 días. Kim (1972, 1975) reportó infecciones de *A. callorhini* en crías del lobo peletero del norte a las 7 horas de nacidas. Resulta evidente que existen diferencias en el potencial de transmisión entre los diferentes estadios. En ambos años de estudio se encontró un patrón congruente de incremento de número siguiendo un patrón ontogénico, desde las ninfas 1 a los adultos, en crías de ≤ 3 días, lo cual probablemente sea reflejo del

potencial de transmisión de cada uno de los estadios. Takano Lee y colaboradores (2005) demostraron, a través de una serie de experimentos realizados con el piojo de la cabeza, *Pediculus humanus capitis*, que la velocidad y la capacidad de dispersión son mínimas en las ninfas 1 y se incrementan en estadios de desarrollo más avanzados. Esta hipótesis es compatible con estudios realizados en otras especies de equinoftridos, que reportaron muy pocas o ninguna ninfas 1 en crías recién nacidas (Murray y Nicholls, 1965; Kim, 1972, 1975).

Los resultados de este capítulo sugieren que la forma del incremento poblacional para cada estadio de *A. microchir* en función de la edad de la crías es congruente en los 2 años analizados. Los modelos de crecimiento poblacional, si bien son simples, sugieren que este patrón básico sería reflejo de la dinámica de reclutamiento y reproducción: el reclutamiento dependería principalmente de la transmisión vertical (Leidenberger *et al.*, 2007), principalmente durante los primeros 10 días de vida de las crías, mientras que la reproducción sería continua durante todo el período en tierra (Murray, 1976) y, por tanto, una segunda generación tendría lugar en este intervalo de tiempo. Sin embargo, la tendencia específica de cambios en la abundancia difirió entre los años en todos los estadios de *A. microchir*. Estas diferencias no resultan sorprendentes dado que los piojos en general se ven fuertemente afectados por diferentes factores que pueden producir cambios en la estructura poblacional (ver Murray, 1987; Price y Graham, 1997 y las referencias en ellos). Particularmente en este caso los factores ambientales podrían ser relevantes en este caso. En el año 2008, las crías recién nacidas aparentemente adquirieron más piojos de sus madres. Sin embargo, aunque el número de adultos permaneció alto en crías de mayor edad, se observó un importante descenso en el número de ninfas 1 en comparación a 2007. De hecho, este descenso afectó a todos los estadios y estuvo relacionado con la edad de la cría (lo cual se representa con la línea de guiones en los gráficos de LOESS, Figura 3.2). Parece que durante ese año se hizo presente, probablemente 10 días después de comenzado el periodo de muestreo, algún factor importante de mortalidad que indujo, bien una menor tasa reproductiva, bien un aumento en la mortalidad de los huevos. Es probable que estos factores sean de tipo ambientales (como por ejemplo, temperatura, radiación solar, humedad relativa), dado

que los factores asociados al hospedador (como ser, densidad poblacional, cambios en el pelaje, rascado, etc.) no cambian drásticamente en unos pocos días.

En los análisis realizados, se utilizaron valores realísticos de supervivencia, duración de los estadios y fecundidad para modelar el crecimiento poblacional de *A. microchir* y poder de esta manera determinar el tiempo generacional. Se obtuvo un rango de tiempo entre 18 y 23 días, lo cual es congruente con la información disponible para otros equinoftridos. La robustez de estos resultados se apoya en que las curvas de crecimiento poblacional para una determinada combinación de factores varían muy poco al cambiar otros factores, como la fecundidad y la supervivencia. Sin embargo, el tiempo de generación mínimo estimado depende de un periodo de incubación de los huevos relativamente largo (≥ 9 días). La duración del periodo de incubación en los anopluros varía notablemente en función de las condiciones del microhabitat en el cual se desarrollan (Price y Graham, 1997). La pregunta que surge es, pues, si en años con condiciones ambientales óptimas, podría acortarse el período de incubación y por lo tanto, disminuir el tiempo de generación.

Para responder a esta cuestión se deben considerar las presiones selectivas que modelaron la dinámica poblacional de *A. microchir*. Esta especie podría llegar a desarrollar, como máximo, 3 generaciones en el mejor de los casos, durante el período de lactancia de las crías. La reproducción en otras clases de edad resulta poco probable dado que ninguna permanece en la playa el tiempo suficiente como para que los huevos completen su desarrollo, y mucho menos que las ninfas 1 muden a ninfas 2 (Campagna y Le Boeuf, 1988a). Para tener un punto de comparación de lo que esta restricción temporal supone, cabe recordar que un piojo típicamente terrestre, el piojo del cerdo *Haematopinus suis*, presenta entre 6 a 12 generaciones anuales (Price y Graham, 1997). En este contexto, es muy probable que *A. microchir* enfrente un compromiso (*trade-off*) entre el tiempo de generación y la fecundidad (Stearns, 1992; Gemmill *et al.*, 1999). Por un lado, un tiempo de generación corto (como podrían ser 14 días) permitiría el desarrollo de una tercera generación de piojos antes de que las crías comiencen a nadar, contando con el riesgo de que cualquier situación ambiental adversa (por ejemplo, baja temperatura, mareas extraordinarias, etc.) retrase el

desarrollo y por consiguiente, no se produzca la eclosión de las ninfas 1 de esta tercer generación. Por otro lado, un tiempo generacional largo (23 días), restringiría la posibilidad de producir una tercera generación, pero con la ventaja de que al aumentar el tiempo de generación se podrían desarrollar individuos más grandes, que pondrían más huevos, lo cual aumentaría la fecundidad en detrimento de una generación más (Gemmill *et al.*, 1999). Futuros estudios ecológicos en *A. microchir* y otros equinoftíridos permitirán dilucidar la respuesta evolutiva a este trade-off a partir de la comparación con otros anopluros.

Capítulo IV

Adaptaciones morfológicas de *Antarctophthirus microchir* al medio marino: el uso del SEM como herramienta.

Los contenidos del presente capítulo han sido publicados en:

Leonardi, M.S., E.A. Crespo, J.A. Raga, and M. Fernández. 2011. Scanning Electron Microscopy of *Antarctophthirus microchir* (Phthiraptera: Anoplura: Echinophthiriidae): studying morphological adaptations to aquatic life. *Micron* **43**, 929-936.



Resumen

Los miembros de la familia Echinophthiriidae presentan la particularidad de ser insectos parásitos de mamíferos anfibios. En el transcurso de su evolución desarrollaron características morfológicas que reflejan su adaptación al estilo de vida de sus hospedadores. Conocer en detalle la estructura externa de este grupo de piojos constituye el primer paso necesario para entender el proceso que derivó en la coadaptación de piojos y pinnípedos al medio marino. Por primera vez, se estudia la ultraestructura de todos los estadios de un piojo de la familia. Los resultados se discuten a la luz de sus implicancias evolutivas, funcionales y ecológicas.

Introducción

Es ampliamente reconocido que los insectos exhiben una gran diversidad de especies y una abundancia enorme. Sin embargo, los piojos son los únicos insectos que se convirtieron en organismos parásitos obligados y permanentes durante todos los estadios de su ciclo de vida (Kim, 1985; Bush *et al.*, 2001). Aún más excepcionales resultan los piojos de la familia Echinophthiriidae quienes, además, son de los pocos insectos que lograron colonizar el medio marino. Las mismas adaptaciones que favorecieron a sus hospedadores en el paso al nuevo ambiente, también tuvieron implicancias directas sobre sus piojos.

En la mayoría de los mamíferos marinos, el aislamiento térmico se logra por medio de una desarrollada capa de grasa. Sin embargo, el aire que queda retenido entre las fibras capilares provee de aislación primaria en los lobos finos y las nutrias, manteniendo la piel seca aún cuando el animal se encuentra sumergido (Yochem y Stewart, 2008). Por lo tanto, los piojos que infectan estas especies viven en un ambiente virtualmente terrestre aún cuando sus hospedadores se encuentran sumergidos. Sin embargo, fócidos, lobos marinos y morsas, dependen principalmente de la grasa como sistema de aislamiento, por lo cual su pelaje es permeable (Mostman Liwanag, 2008). Consecuentemente, los piojos de estas especies se encuentran expuestos a condiciones realmente acuáticas, presentando adaptaciones morfológicas específicas que permiten su supervivencia subacuática.

En el presente capítulo se discutirán las principales adaptaciones morfológicas de *Antarctophthirus microbir* en el lobo marino de un pelo (*Otaria flavescens*). Como punto de partida se analizará la ultraestructura de esta especie, utilizando para ello imágenes tomadas con microscopía electrónica de barrido (MEB). El MEB es una herramienta poderosa que permite el análisis meticuloso de la superficie externa de los organismos, de lo cual puede inferirse su funcionalidad al complementarlo con los estudios que se discutirán a lo largo de los capítulos siguientes.

Existen trabajos previos con MEB en las siguientes especies de equinoftridos: *Antarctophthirus trichechi* y *Echinophthirus horridus* (ver Scherf, 1963); *E. horridus*, *Antarctophthirus callorhini* y *Proechinophthirus fluctus* (ver Miller, 1971); *Antarctophthirus callorhini* y *Proechinophthirus fluctus* (ver Kim, 1971); *Proechinophthirus zumpti* (ver Castro *et*

al., 2002); *Antarctophthirus ogmorhini* (ver Mehlhorn *et al.*, 2002), y *Lepidophthirus macrorhini* (ver Green y Turner, 2004).

Kim (1971) describió todos los estadios de desarrollo de las especies presentes en el lobo fino del norte, *Callorhinus ursinus*, utilizando microscopía óptica. Este autor analizó las principales características morfológicas de *A. callorhini* y *P. zumpti*, discutiéndolas en relación a su significancia en la adaptación al medio marino y en función del microhábitat utilizado por cada especie. Sin embargo, en los restantes estudios o no incluyeron todos los estadios de la especie o bien no se centraron en los rasgos exclusivos de los equinoftíridos. Scherf (1963) y Miller (1971) abordaron el estudio de las estructuras sensoriales de patas y antenas, respectivamente. Mehlhorn y colaboradores (2002) reconocieron la importancia de las escamas, proponiendo su potencial como plastrón, hipótesis propuesta originalmente por Hinton (1976). Por su parte, Castro y colaboradores (2002) utilizaron el MEB como herramienta para identificar caracteres diagnósticos de *P. fluctus*. Finalmente, Green y Turner (2004) discutieron específicamente las adaptaciones morfológicas asociadas a la fijación al hospedador.

58

En el presente capítulo se analizan, utilizando MEB todos los estadios de *A. microchir*, identificando estructuras específicas y especializadas que se discuten en función de sus implicancias ecológicas, funcionales y evolutivas. Este capítulo constituye el primer paso para entender las adaptaciones de un organismo originalmente terrestre al medio marino.

Materiales y métodos

Especímenes examinados

Los piojos se colectaron de crías de lobo marino de un pelo en la Reserva Natural Punta León, durante la temporada reproductiva 2006/07. Para recolectar los parásitos, se siguió la metodología descrita en la Introducción General. Los piojos colectados se clasificaron según su estadio de desarrollo siguiendo los criterios establecidos en el Capítulo II. Se examinaron diez machos, diez hembras, diez ninfas 1 (N1), diez ninfas 2 (N2) y diez ninfas 3 (N3) de *A. microchir* utilizando MEB.

Microscopía Electrónica de Barrido

Los especímenes seleccionados (cinco de cada estadio en vista dorsal y cinco en vista ventral), se deshidrataron en serie de alcoholes de gradación creciente, se desecaron por punto crítico con CO₂ y se montaron en soportes con la ayuda de cinta adhesiva de carbono de doble cara. Se recubrieron con una fina capa de 25-30 nm de oro-paladio en un recubridor Bio-Rad Sc 500 y se examinaron en un MEB de vacío S-4100 a 10 Kv. (Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, Universitat de València, España). Para la descripción morfológica se siguió la terminología establecida en el Capítulo II: las **espinas** son setas largas y espiraladas; las **escamas** son setas anchas y aplanadas, y los **pelos** son setas largas y finas.

Resultados

Descripción de los estadios

Huevos (Figura 4.1)- Se hallan cementados individualmente a un único pelo; muestran una superficie lisa, con el opérculo distintivo y elevado, sin ornamentaciones, apuntando hacia el extremo del pelo.

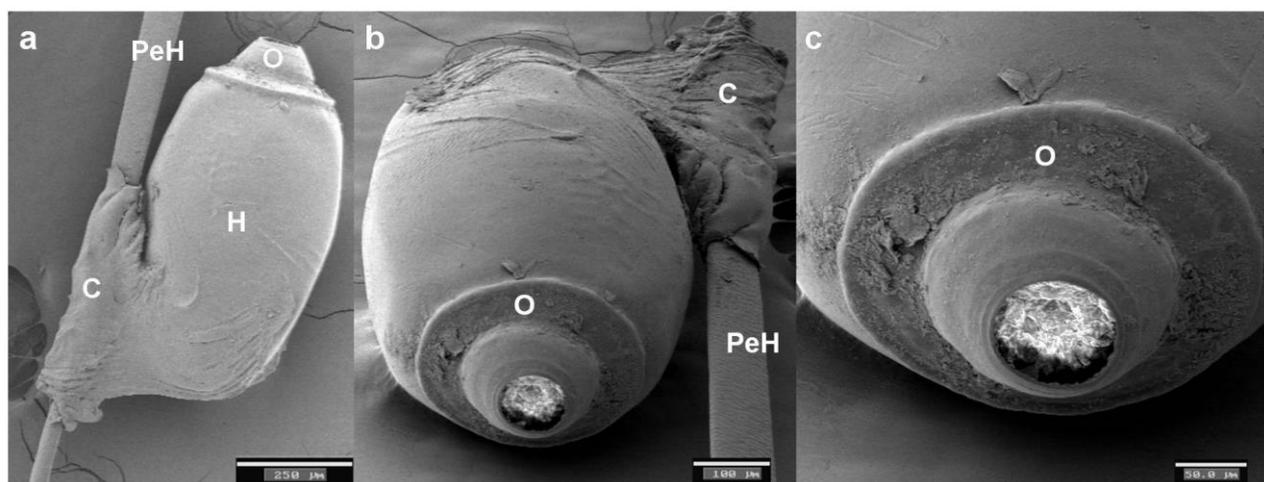


Figura 4.1- Fotografía en MEB del huevo de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Vista lateral del huevo (H), cementado a un pelo del hospedador (PeH); nótese el cemento (C) con el cual está fijado al pelo y el opérculo (O), elevado y sin ornamentaciones; **b-** Vista desde el opérculo; se aprecia la superficie lisa; **c-** Detalle del opérculo.

Ninfas 1 (Figura 4.2)- Caracterizadas por la ausencia de escamas. Las patas son proporcionalmente más largas en relación al largo del cuerpo si se compara con los restantes estadios ninfales. Resulta claramente visible el patrón de distribución de

espinas, distribuidas principal y uniformemente a lo largo de los segmentos abdominales.

Ninfas 2 (Figura 4.3)- En este estadio aparecen las escamas, manteniendo el mismo patrón que se observa en los adultos. A medida que se avanza en la ontogenia, los pelos y las escamas se vuelven, respectivamente, más largos y densos, tal y como se observan ya las ninfas 3.

Ninfas 3 (Figura 4.4)- El patrón de quetotaxia y las principales características son similares a las observadas en adultos. Las escamas y las espinas son más densas que en las ninfas 2. Las apófisis occipitales del tórax convergen en el ápice.

Adultos (Figura 4.5)- Resulta notable la ausencia de placas torácicas y esternales, estando el cuerpo completamente cubierto de escamas. Las hembras (Figura 4.5a) son más grandes y sus abdómenes más redondeados que en los machos (Figura 4.5b); la abertura genital de las hembras se encuentra rodeada por un penacho de setas.

Principales caracteres

Quetotaxia- Una de las principales características de los equinoftíridos es la presencia de setas modificadas en tres tipos: espinas (Figura 4.6a), escamas (Figura 4.6b) y pelos (Figura 4.6c). Las escamas de *A. microchir* recubren completamente el abdomen, distribuyéndose siguiendo un patrón imbricado (Figura 4.7).

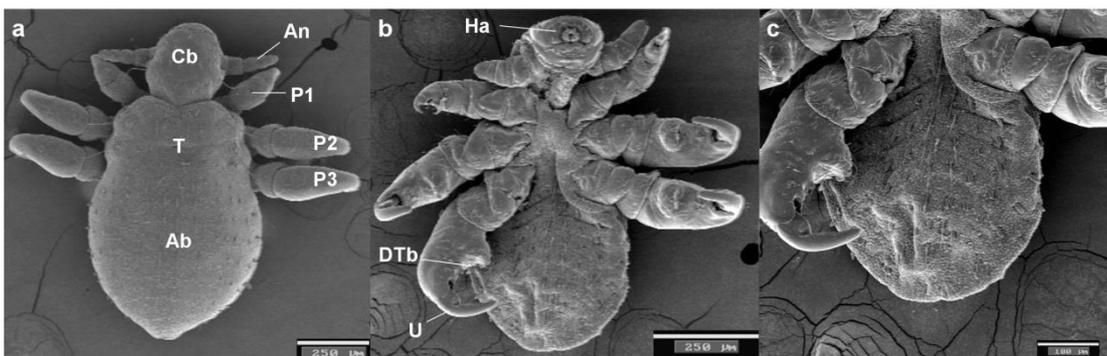


Figura 4.2- Fotografía en MEB del primer estadio ninfal de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Vista completa dorsal; nótese la ausencia de escamas en el abdomen (Ab) y tórax (T); las patas (P1, P2 y P3) son significativamente más largas en relación al cuerpo que en otros estadios; la antena (An) tiene cuatro segmentos; **b-** Vista ventral; resulta evidente la estructura membranosa del abdomen y el *haustellum* (Ha); **c-** Detalle del abdomen.

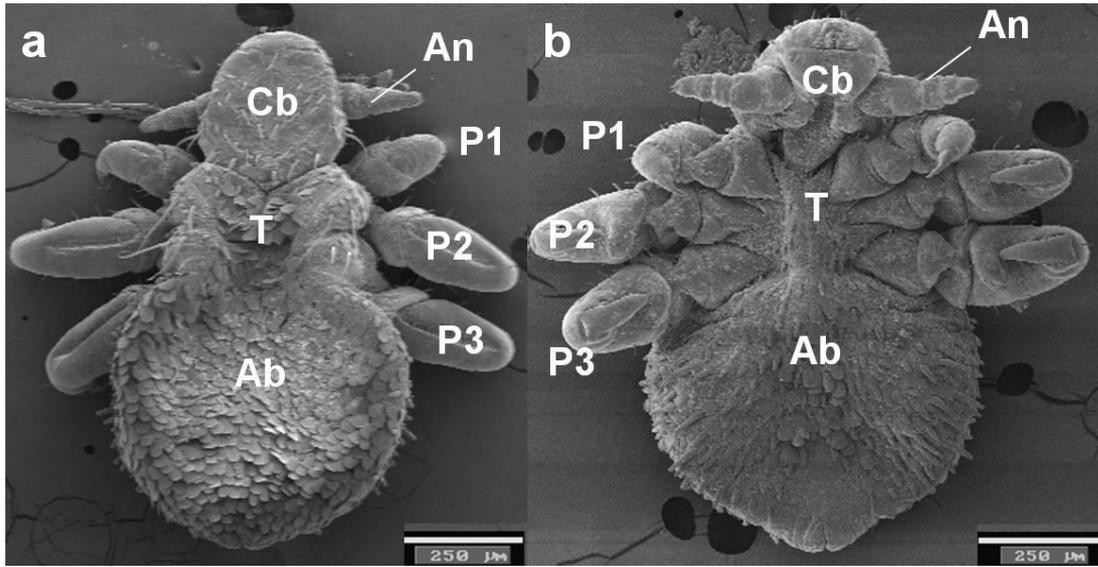


Figura 4.3- Fotografía en MEB del segundo estadio ninfal de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Vista dorsal; nótese la presencia de escamas abdominales; **b-** Vista ventral. Referencias: An, antena; Cb, cabeza; T, tórax; Ab, abdomen; P1-P2-P3, patas anteriores, medias y posteriores, respectivamente.

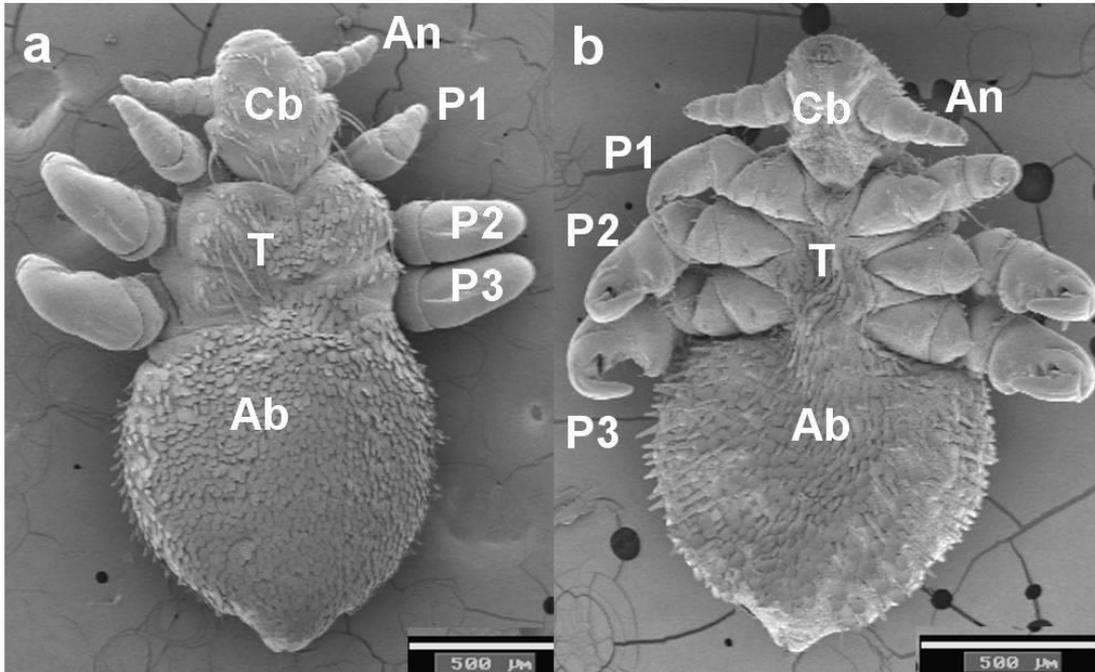


Figura 4.4- Fotografía en MEB del tercer estadio ninfal de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Vista dorsal; **b-** Vista ventral. Nótese la similitud entre este estadio y el adulto. Referencias: An, antena; Cb, cabeza; T, tórax; Ab, abdomen; P1-P2-P3, patas anteriores, medias y posteriores, respectivamente.

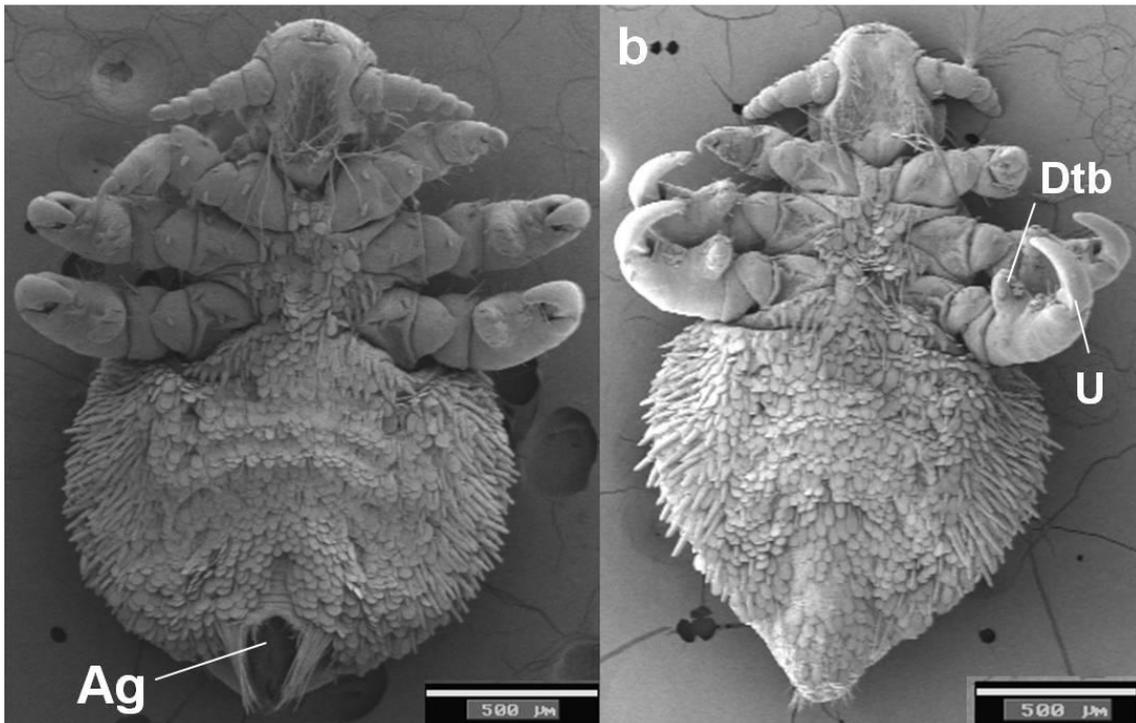


Figura 4.5- Fotografía en MEB de ejemplares adultos de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Vista ventral de la hembra, donde es claramente visible la abertura genital (Ag) rodeada por setas; **b-** Vista ventral del macho, nótese el alto grado de desarrollado de las patas del medio y posteriores con el característico proceso distotibial (DTb) y las fuertes uñas (U) utilizadas para aferrarse al pelo del hospedador.

Espiráculos (Figura 4.8)- La figura muestra la disposición de los espiráculos; se ve claramente que alrededor de los mismos no hay escamas. Se encuentran modificados en una estructura membranosa, visible en la Figura 4.8c

Patatas (Figura 4.9)- Las patas anteriores son más pequeñas que las del medio y las posteriores (Figura 4.9a). El segmento tibiotarsal del segundo y tercer par de patas se encuentra modificado y posee uñas grandes y fuertes (Figura 4.9b), mientras que el primer par es débil, pequeño y presenta el segmento tibiotarsal reducido (Figura 4.9c). El proceso distotibial (Figura 4.10a) se encuentra presente en las patas modificadas de *A. microchir* y se caracteriza por la presencia de una seta modificada con aspecto de almohadilla (Figura 4.10b).

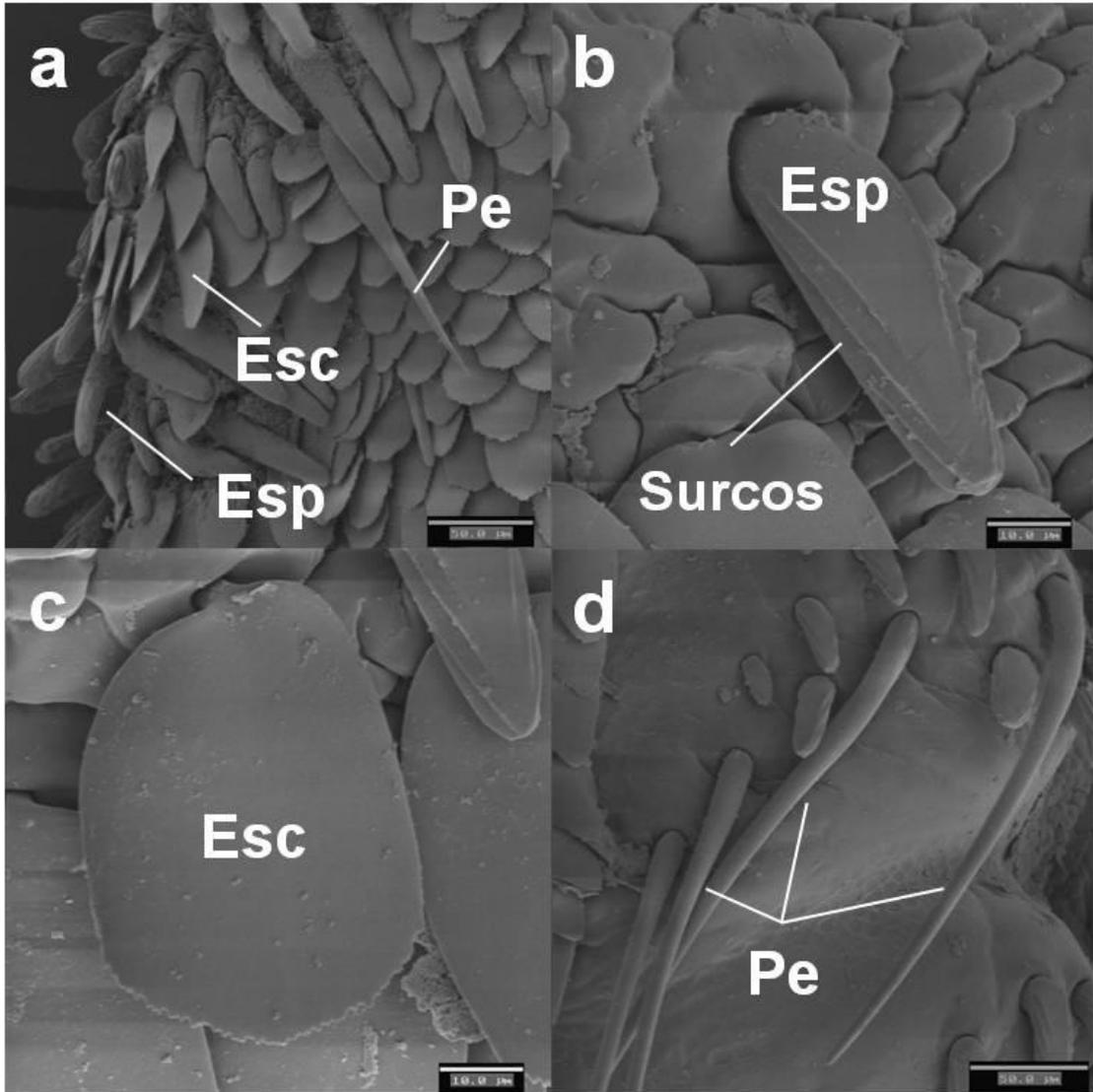


Figura 4.6- Fotografía en MEB de las setas modificadas de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Vista general de espinas (Esp), escamas (Esc) y pelos (Pe); **b-** detalle de las espinas donde se observan los surcos característicos; **c-** escamas; **d-** pelos.

Cabeza (Figura 4.11)- La cabeza carece de ojos; presenta un *haustellum* (Figura 4.11a) con 8 ganchos largos dispuestos en 2 filas (Figura 4.11b); no se observa ningún proceso ni ornamentación.

Antenas (Figura 4.12)- Con 5 segmentos, el basal con una espina (Figura 4.12a), presente desde el primer estadio ninfal. El segmento terminal con sensilas, 2 órganos porosos; no se observan *sensila basiconicas* (Figura 4.12.b)

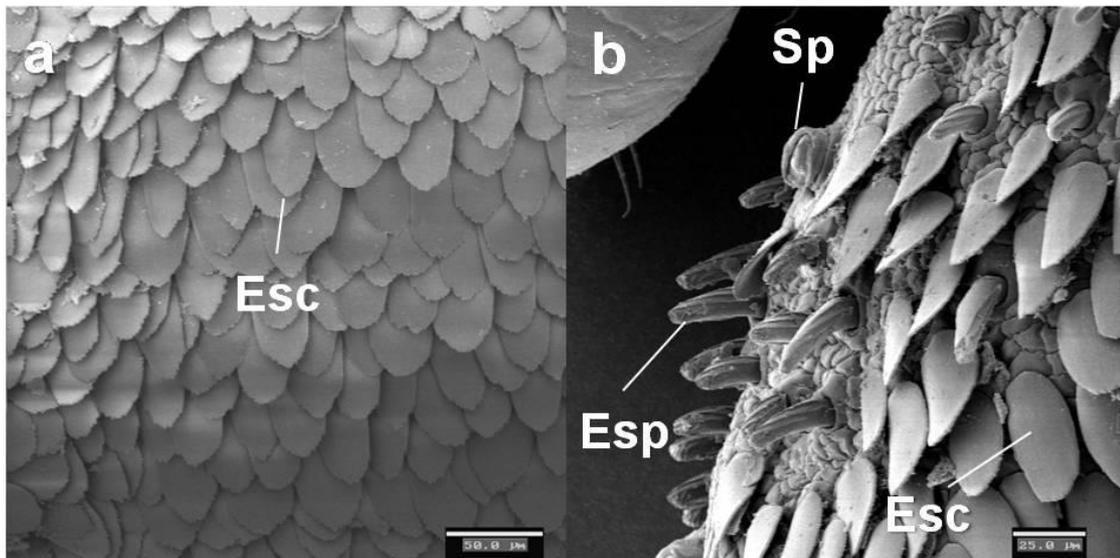


Figura 4.7- Fotografía en MEB del plastrón de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Distribución de escamas siguiendo un patrón imbricado; **b-** Detalle de la disposición de las escamas mostrando su potencial como plastrón.

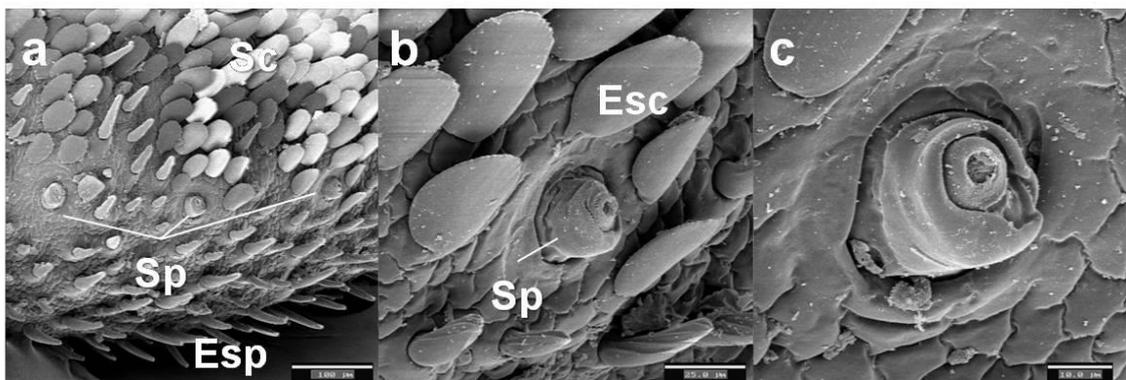


Figura 4.8- Fotografías en MEB de los espiráculos (Sp) de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Vista general de los 3 espiráculos abdominales; **b-** Detalle del espiráculo; **c-** Detalle del sistema membranoso de oclusión.

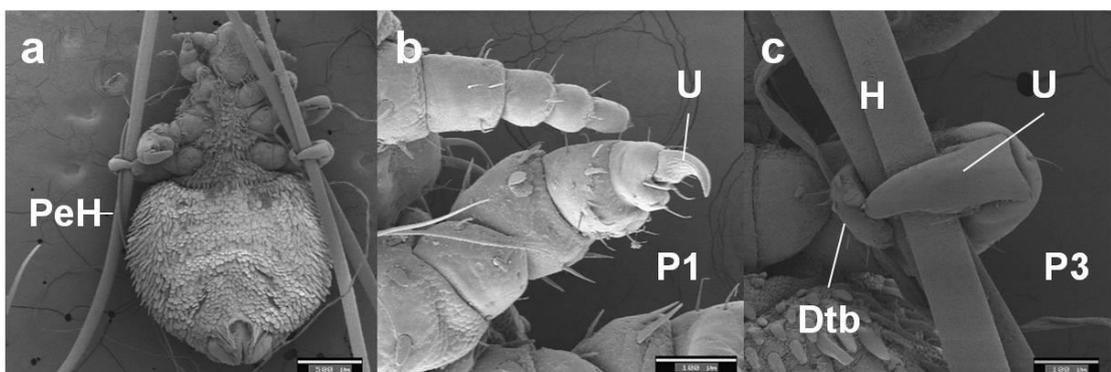


Figura 4.9- Fotografías en MEB en vista ventral de una hembra de *Antarctophthirus microchir* aferrada a un pelo del hospedador (PeH) por las uñas del segundo y tercer par de patas. **a-** Vista general; **b-** Detalle de las patas anteriores, modificada para cumplir con una función sensitiva; **c-** Detalle de las patas posteriores; nótese el segmento tibiotarsal modificado para el agarre, el proceso distotibial (DTb) altamente desarrollado, y las fuertes uñas (U).

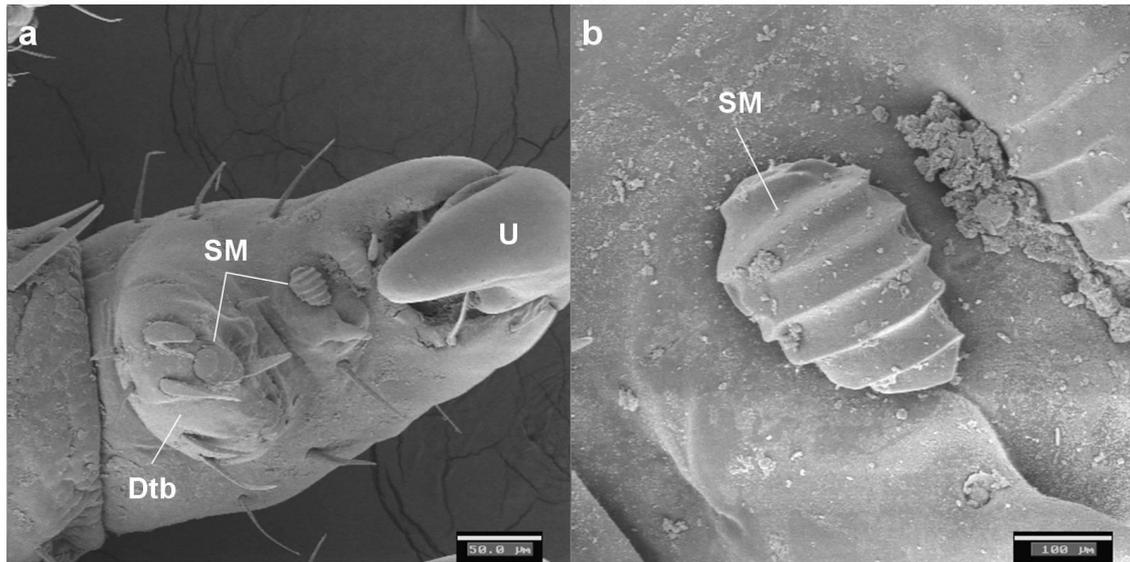


Figura 4.10- Fotografías en MEB de las patas modificadas como estructuras de agarre. **a-** Vista general del segmento tibiotarsal: (U) uña, (DTb) proceso distotibial, (SM) seta modificada; **b-** Detalle de la seta modificada, la cual probablemente sea de valor taxonómico.

Tórax- El tórax es trapezoidal, más fuerte en la región correspondiente a las patas del medio y posteriores. Las apófisis occipitales se van desarrollando hasta converger en el ápice desde la ninfa 1 a la 3.

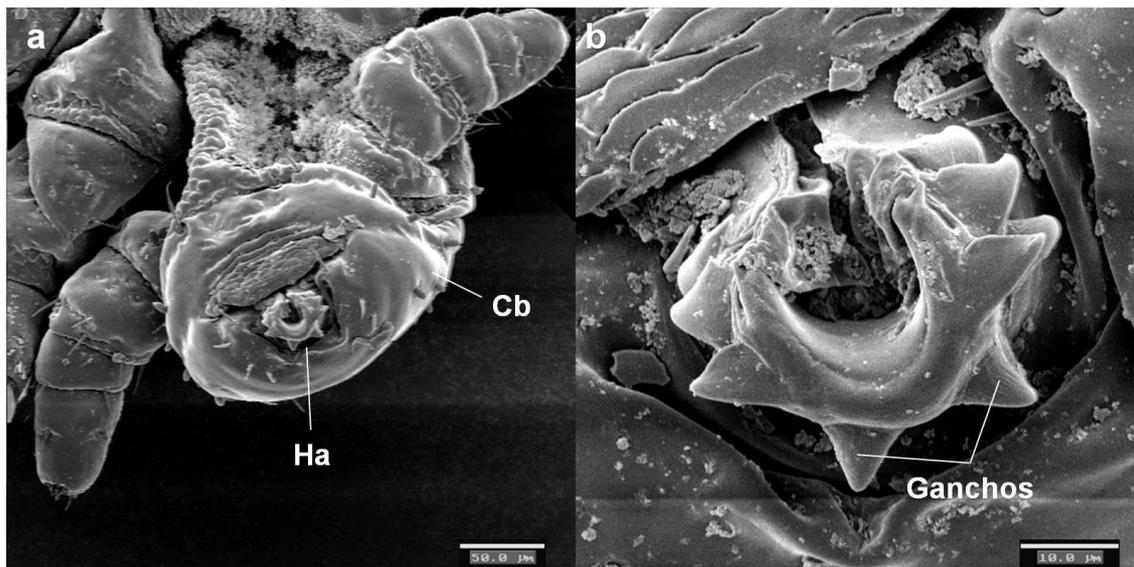


Figura 4.11- Fotografías en MEB de la cabeza de una ninfa de *Antarctophthirus microchir*. **a-** Vista del *haustellum* (Ha); **b-** Detalle de los ganchos utilizados para perforar la piel del hospedador.

Abdomen- El abdomen es membranoso y exhibe una textura escamosa. Es redondeado y puntiagudo en los machos. Con excepción de las ninfas 1, se encuentra cubierto de escamas en todos los estadios.

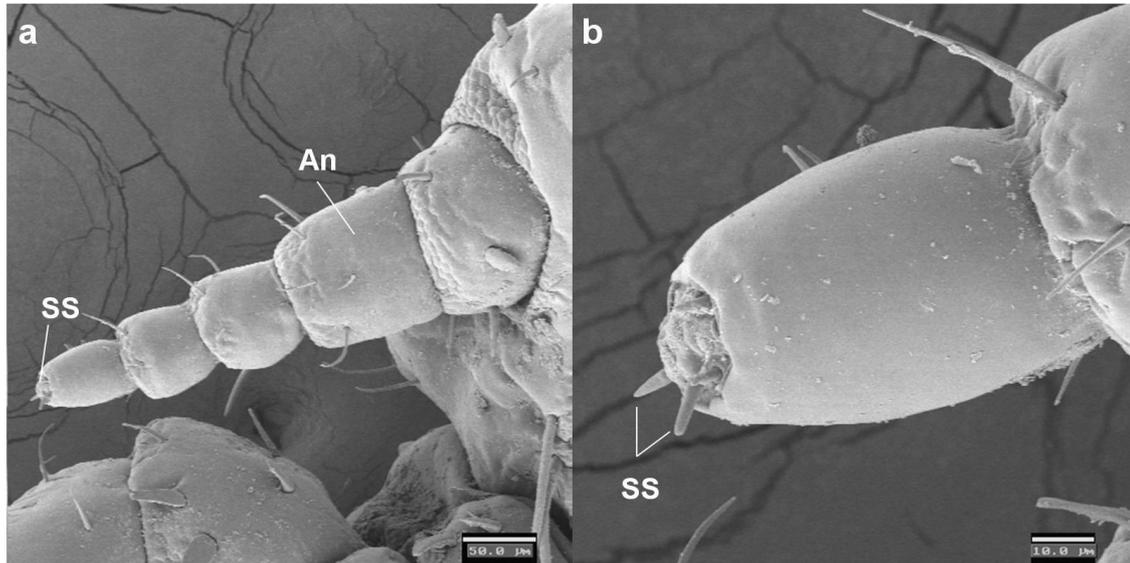


Figura 4.12- Fotografías en MEB de la antena de *Antarctophtbirus microchir*. **a-** Antena con 5 segmentos; **b-** Detalle del segmento terminal con las estructuras sensoriales (SS) en su extremo.

Discusión

En este capítulo se analiza, por primera vez, la ultraestructura de todos los estadios del ciclo de vida de un equinoftrido en el marco del análisis de sus adaptaciones morfológicas a la vida marina. Como se mencionara anteriormente, el estilo de vida anfibio adoptado a través de sus hospedadores convierte a estas especies de piojos en un caso excepcional dentro de los insectos. Resulta evidente que la adaptación al medio marino es resultado de un largo proceso evolutivo durante el cual desarrollaron características morfológicas, ecológicas y fisiológicas que permitieron su supervivencia. Parte de estas características se reflejan en su morfología, siendo el MEB una herramienta extraordinaria para su análisis. Analizar e interpretar estas adaptaciones externas es el primer paso para entender completamente el proceso de coadaptación al medio marino.

A diferencia de *Proechinophtbirus zumpti* que deposita sus huevos tanto individualmente como en grupos (Castro *et al.*, 2002), *A. microchir* cementa cada huevo

individualmente a una fibra capilar. Mehlhorn y colaboradores (2002) observaron el mismo patrón en *A. ogmorhini* en focas de Weddell. El opérculo de *A. microchir* y *A. ogmorhini* (Mehlhorn *et al.*, 2002) carece de ornamentaciones mientras que en *P. zumpti* es irregular y levemente elevado (Castro *et al.*, 2002). La posición del huevo en relación al largo de la fibra capilar sugiere que el comportamiento de oviposición de *A. microchir* es similar al de otras especies del género, como *A. ogmorhini* (Mehlhorn *et al.*, 2002). Se considera que las ornamentaciones del huevo están implicadas en el proceso de eclosión de las ninfas (Berman *et al.*, 1980). Por lo tanto, a pesar de ser una estructura simple, tanto la morfología del huevo como el patrón de oviposición pueden ser utilizados como caracteres taxonómicos y comportamentales, respectivamente, propios de cada género.

Como se mencionó en el Capítulo II, las ninfas 1 se caracterizan por la ausencia de escamas, presentes en todos los demás estadios. Las ninfas 2 y 3 son muy similares entre sí, diferenciándose por la cantidad y densidad de escamas abdominales y las apófisis occipitales (ver Capítulo II). Este patrón fue reportado previamente por Kim (1971) y parece ser propio de la familia.

La presencia de setas en los Anoplura se encuentra primariamente asociado a una función sensitiva (Kim y Ludwig, 1978). Tal como se explicara en el Capítulo II, una de las principales características de los equinofthíridos es la presencia de setas modificadas en tres tipos: espinas, escamas y pelos. Además, el patrón de quetotaxia es una de las características morfológicas más distintivas de la familia, por lo cual podría estar relacionado con su estilo de vida acuático (Kim 1971, 1985). Sin embargo, la función precisa de estas adaptaciones morfológicas se encuentra aún en discusión.

Mehlhorn y colaboradores (2002) observaron que el largo de las espinas parece ser especie específico. Las espinas de *A. microchir* son más afines a las de *Echinophthirius horridus*, *Lepidophthirus macrorhini* y *A. trichechi* (Murray, 1976; Scherf, 1963), mientras que las de *A. ogmorhini* son más cortas (Mehlhorn *et al.*, 2002). El patrón de distribución de espinas está conservado a lo largo de la ontogenia, desde las ninfas 1 hasta los adultos. Este hecho, considerando también la distribución, tamaño y largo de las espinas, sugiere una función sensitiva. Las observaciones de Nuttal (1918),

quién reportó la existencia de conexiones nerviosas asociadas las espinas, apoyan esta hipótesis.

Sin embargo, diversos autores han propuestos funciones alternativas para las espinas; por ejemplo la protección contra las bajas temperaturas. Las focas de Weddell producen un sebo que las protege de las bajas temperaturas de la Antártida. Mehlhorn y colaboradores (2002) propusieron que las espinas de *A. ogmorhini* retendrían este sebo, el cuál cumpliría la misma función que en sus hospedadores. Si bien las espinas también se encuentran presentes en *A. microchir* en lobos marinos comunes, que se reproducen durante el verano austral con temperaturas máximas cercanas a los 40°C, hay que considerar que durante los buceos los lobos alcanzan profundidades donde el agua se encuentra alrededor de 8-9°C. Por lo tanto, las espinas podrían cumplir una función de protección contra el frío reteniendo el sebo impermeable producido por el hospedador. Esta hipótesis se ve reforzada si se considera que los pinnípedos constituyen un grupo monofilético cuyo origen se remonta al Oligoceno (27 millones de años antes del presente), probablemente en el Pacífico Norte (Berta, 2009), lo que implica que los pinnípedos ancestrales se enfrentaron a condiciones de frío extremo al comienzo de su evolución (Bowen, 2007).

El género *Antarctophthirus* se caracteriza por la presencia de escamas (Kim, 1971), siendo su función específica un tema de ardua discusión. Mehlhorn y colaboradores (2002) determinaron que son propias de especies antárticas y árticas. Sin embargo, *Antarctophthirus* posee una distribución cosmopolita (Kim, 1971).

Hinton (1976) propuso que las escamas actúan como un plastrón, es decir, una superficie que permite retener una capa de gas, creando así una interfase aire-agua. Las escamas de *A. microchir* recubren todo el abdomen y siguen una distribución imbricada; esta disposición de escamas permitiría la retención de aire entre ellas (Figura 4.13). Murray (1976) argumentó que las escamas no están relacionadas con la respiración submarina ya que no existe conexión con el sistema traqueal. Sin embargo, la teoría del plastrón propuesta por Hinton implica que exista respiración cutánea. Dado que las escamas no están dispuestas alrededor de los espiráculos, resulta evidente que la respiración acuática es independiente del sistema traqueal central. Los piojos de la familia Echinophthiriidae carecen de estructuras esclerotizadas en el

abdomen, lo cual proveería una superficie adecuada para el intercambio gaseoso (Kim, 1971). Una hipótesis para corroborar es si existe un sistema de branquias asociadas a las setas, como el descrito en especies de escarabajos acuáticos (Kehl y Dettner, 2009). En este grupo de coléopteros, el intercambio gaseoso se realiza a través de un sistema de traqueolas asociadas a las setas, las cuáles actuarían a modo de branquias.

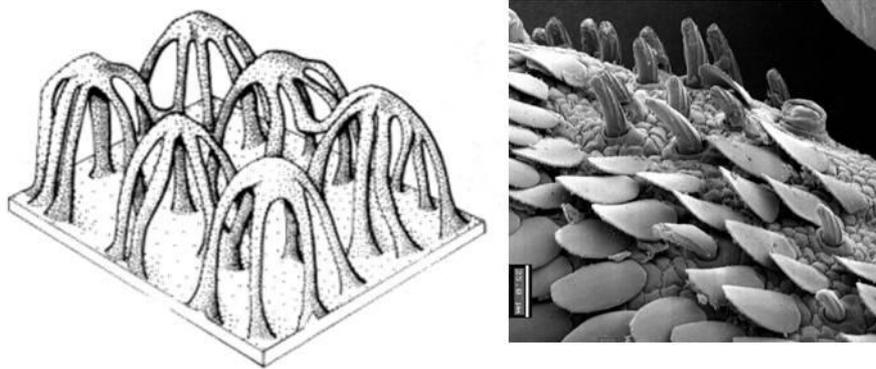


Figura 4.13- En la figura de la izquierda se observa un plastrón generalizado de un insecto tipo (modificado de Hinton, 1976). A la derecha se observa en detalle la disposición de escamas que permitiría suponer su función como plastrón.

La hipótesis de que las escamas están relacionadas con la respiración se ve apoyada por particularidades ecológicas y fisiológicas del hospedador. Entre las especies de equinoftíridos se observa que existe una asociación entre el hábitat seleccionado y la presencia o ausencia de escamas. Las especies de *Proechinophthirus* habitan en la capa de pelos de guarda de los lobos finos, donde el aire es retenido entre las fibras capilares. Es decir, dichas especies viven en un ambiente con características terrestres aun cuando su hospedador se encuentra sumergido. Por tanto, estas especies carecen de escamas. Las especies de *Antarctophthirus* se encuentran verdaderamente expuestas a condiciones acuáticas, ya que el pelaje de sus hospedadores se moja completamente (Mostman Liwanag, 2008). Por lo tanto, dichos piojos necesitan de estructuras especializadas para sobrevivir bajo el agua. El primer estadio ninfal de *A. microchir* carece de escamas y, como se describió en el Capítulo III, es el único estadio que parece verse afectado negativamente cuando las crías de lobo marino de un pelo comienzan a nadar. Esta disminución en el número de ninfas

1 podría deberse a su imposibilidad de sobrevivir bajo el agua, por carecer de las estructuras de respiración necesarias. Incluso, la ausencia de escamas puede interpretarse como la retención de una característica primitiva, conservada por las especies de *Proechinophthirus* (Kim, 1971, 1988).

De acuerdo con Green y Turner (2004), la falta de estructuras quitinosas permitiría también una fácil compresión del cuerpo cuando es sometido a alta presión, evitando así potenciales daños. Por lo tanto, las escamas también podrían cumplir una función de protección de la cutícula a este respecto.

En cuanto a los pelos, por un lado es probable que tengan una función sensorial y por otro, son de valor taxonómico dado que su número y distribución son especie-específicos (Mehlhorn *et al.*, 2002): *A. ogmorhini* tiene grupos de cuatro pelos (Mehlhorn *et al.*, 2002), *A. trichechi* tiene 2 pelos a cada lado del tórax (Scherf, 1963) y *A. microchir* tiene largos pelos torácicos.

Una importante adaptación de los equinoftridos se refleja en la morfología de sus patas. Como consecuencia de su estilo de vida marino, estos piojos son ciegos (Kim, 1985) y presentan el primer par de patas modificado para cumplir una función sensorial. El segmento tibiotarsal del segundo y tercer par de patas de *A. microchir* se encuentra modificado para aferrarse a los pelos del hospedador. En este momento no existe información sobre la relación potencial entre el tamaño de las patas y/o las uñas con las características de grosor, largo y ultraestructura del pelo del hospedador. Se podría, sin embargo, trazar un paralelismo con los piojos masticadores y considerar que esta relación muy probablemente exista. Reed y colaboradores (2000) encontraron una correlación positiva entre el diámetro del pelo de las tuzas (familia Geomyidae) y la ranura rostral de los piojos del género *Geomydoecus*. Los piojos masticadores utilizan la ranura rostral como estructura de agarre al pelo de su hospedador del mismo modo que los piojos chupadores utilizan sus patas. Es necesario profundizar en este aspecto para poder determinar si existe una correlación entre las dimensiones de las patas de los Echinophthiriidae y el diámetro del pelo de los pinnípedos y/o la forma de las setas modificadas y la ultraestructura del pelo.

El análisis de la ultraestructura de *A. microchir* evidencia muchas de las adaptaciones morfológicas de estos organismos que permitieron su adaptación al

medio marino. Esta información se complementará en los próximos capítulos con estudios ecológicos con el fin de entender mejor el proceso evolutivo que derivó en la coadaptación de los piojos y sus hospedadores anfibios.

Adaptaciones ecológicas. Primera Parte.

Selección de hábitat de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo

Los contenidos del presente capítulo han sido publicados en:

Leonardi, M.S., E.A. Crespo, D.G. Vales, M. Feijoo, J.A. Raga, and F.J. Aznar. 2012. Life begins when the sea lion is ashore: habitat use by a louse of a diving mammal host. *Bulletin of Entomological Research* **102**, 444- 452.



Resumen

Estudios previos de selección de hábitat realizados en equinoftíridos de fócidos señalan que el lugar preferido por los piojos son las aletas, mientras que en lobos finos la selección se da en función del tipo de pelaje. En el presente capítulo se estudió la selección de hábitat de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo (*Otaria flavescens*) en Patagonia Argentina, durante el verano austral 2008-2009. Se encontró un claro patrón de selección: los huevos se depositan en el dorso de la cría y, por tanto, las ninfas 1 eclosionan allí y posteriormente migran a la región ventral, donde se desarrollan hasta llegar al estado adulto y copulan; finalmente, las hembras ovígeras regresan a la superficie dorsal. Las ninfas 1 se caracterizan por tener poca capacidad de locomoción por lo que, el hecho de que migren hacia la región ventral luego de eclosionar los huevos sugiere una presión que restringe la selección de microhábitats. El patrón descrito de selección respondería a los requerimientos fisiológicos de cada uno de los estadios de desarrollo, los cuáles varían en función del proceso que se considere (oviposición, morfogénesis, eclosión o desarrollo ontogenético). Sugerimos que *A. microchir* preferiría la región ventral del cuerpo del hospedador para su desarrollo y cópula, y el área dorsal para la oviposición. Sin embargo, no queda del todo claro a cuál de los múltiples factores involucrados responde este patrón. Considerando que diariamente las crías de lobo marino se mojan por la influencia de la marea, y que la alta humedad relativa consecuencia de estas inmersiones prolongadas es un factor de mortalidad de los huevos, se podría inferir que los piojos seleccionan el área dorsal para la oviposición dado que esta zona se seca más rápidamente. Sin embargo, la zona ventral, al mantener una humedad mayor, sería el sitio de preferencia de los restantes estadios ya que ello minimizaría el riesgo de desecación en un lugar con baja humedad relativa, tan árido como la Patagonia.

Introducción

Como se explicara en la Introducción General, los piojos de la familia Echinophthiriidae incluye a aquellas especies adaptadas a sobrevivir en pinnípedos (Durden y Musser, 1994), un grupo de mamíferos que incluye a los lobos marinos comunes y finos (Otariidae), las morsas (Odobenidae) y las focas (Phocidae); la Tabla 5.1 resume las principales diferencias entre las familias. Actualmente, Echinophthiriidae incluye 12 especies distribuidas en 5 géneros (Tabla 5.1, Figura 5.1):

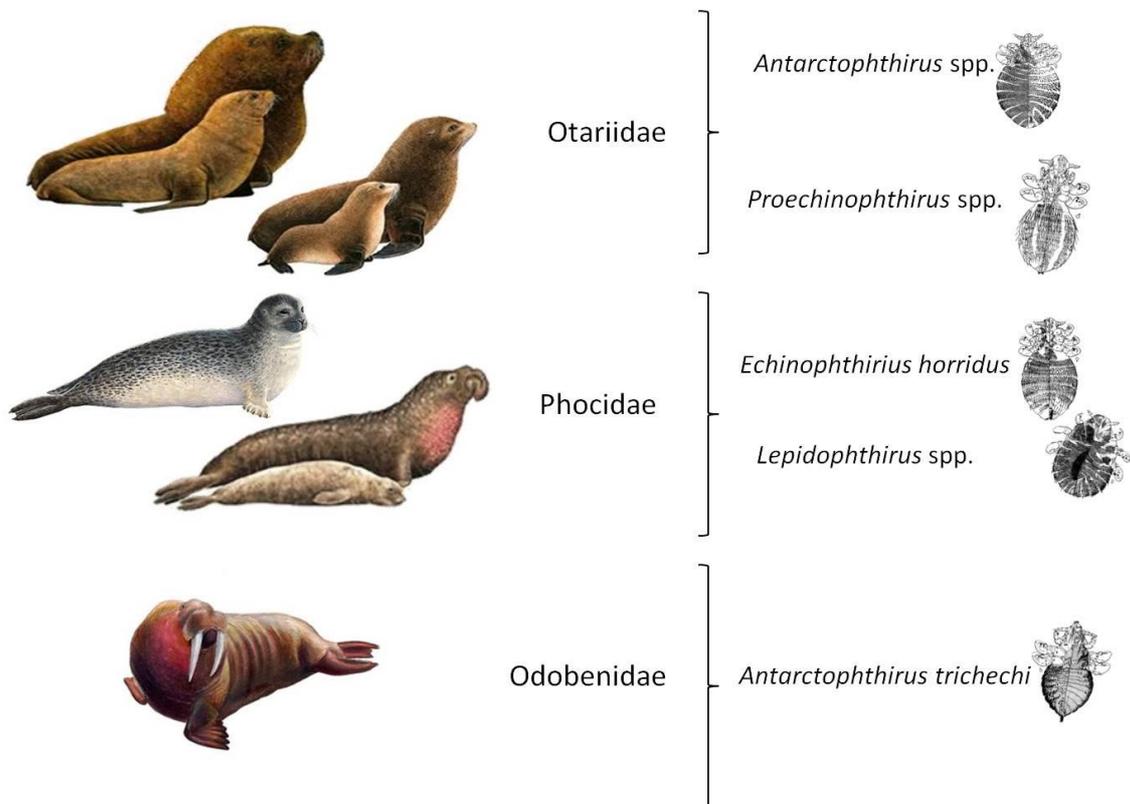


Figura 5.1- Asociaciones parásito-hospedador entre las familias de pinnípedos y los piojos de la familia Echinophthiriidae. Imágenes de pinnípedos tomadas de www.discoverlife.org, los dibujos de piojos pertenecen a Ferris (1934).

Tabla 5.1- Características principales de las 3 familias de Pinnipedia de acuerdo a su diversidad, distribución geográfica, especies de piojos asociadas y rasgos biológicos que podrían influir en la selección de hábitat de sus piojos (Kim, 1985; Durden y Musser, 1994; Berta, 2006; Mostman Liwanag, 2008; y sus referencias).

	Familia		
	Otariidae (lobos finos y comunes) (14 spp.)	Phocidae (focas) (18 spp.)	Odobenidae (morsas) (1 sp.)
Diversidad	Lobos finos (9 spp.): géneros <i>Arctocephalus</i> (8 spp.) y <i>Callorhinus</i> (1 sp.). Lobos comunes (5 spp): géneros <i>Phocartos</i> (1 sp.); <i>Neophoca</i> (1 sp.); <i>Eumetopias</i> (1 sp.); <i>Zalophus</i> (1 sp.) y <i>Otaria</i> (1 sp.)	Géneros <i>Mirounga</i> (2 spp.) <i>Monachus</i> spp. (2 spp.); <i>Leptonychotes</i> (1 sp.); <i>Lobodon</i> (1 sp.); <i>Ommatophoca</i> (1 sp.); <i>Hydrurga</i> (1 sp.) <i>Halichoerus</i> (1 sp.); <i>Cystophora</i> (1 sp.); <i>Erignathus</i> (1 sp.); <i>Pagophilus</i> (1 sp.); <i>Histiophoca</i> (1 sp.) and <i>Phoca</i> (5 spp.)	<i>Odobenus rosmarus</i>
Distribución geográfica	Océano Pacífico, aguas antárticas y subantárticas; Océano Atlántico Sur (<i>A. australis</i> , <i>A. pusillus</i> , <i>O. flavescens</i>)	Regiones polares y sub-polares; mares paleárticos templados (<i>Pusa</i> , <i>Phoca</i>); agus tropicales y templadas (<i>Monachus</i>); antitropical en los Océanos Pacífico y Atlántico (<i>Mirounga</i>)	Océano Ártico y aguas sub-árticas
Especies de piojos	<i>Proechinophthirus fluctus</i> (en <i>Callorhinus</i>); <i>P. zumpti</i> (en 2 especies of <i>Arctocephalus</i>); <i>Antarctophthirus callorhini</i> (en <i>Callorhinus</i>); <i>A. microchir</i> (en todas las species de lobos comunes).	<i>Lepidophthirus macrorhini</i> (en <i>Mirounga</i>); <i>L. piriformis</i> (en <i>Monachus</i>), <i>Echinophthirus horridus</i> (en <i>Halichoerus</i> , <i>Cystophora</i> , <i>Erignathus</i> , <i>Pagophilus</i> y <i>Phoca</i>); <i>Antarctophthirus ogmorhini</i> (en <i>Leptonychotes</i> y <i>Hydrurga</i>); <i>A. mansoni</i> (en <i>Ommatophoca</i>) y <i>A. lobodontis</i> (en <i>Lobodon</i>).	<i>Antarctophthirus trichechi</i>
Pelaje	Lobos finos: muy denso, retiene aire, impermeable, capa interna densa de pelo fino y sedoso, cubierta por la capa de pelo grueso menos denso Lobos comunes: poco denso, permeable, grueso, en una capa	Poco denso, permeable, pelaje corto y grueso	Pelos de guarda cortos y dispersos
Aislación térmica	Lobos finos: primaria por el pelaje Lobos comunes: principalmente grasa	Principalmente grasa (el pelaje es importante en las crías)	Grasa
Temperatura de la piel	Cercana a la T ^a corporal	Cercana a la T ^a ambiente	Cercana a la T ^a ambiente
Aletas	Pueden colocarse bajo el cuerpo. Lado dorsal con poco pelo, lado ventral desnudo	No pueden colocarse bajo el cuerpo. Cubiertas por pelo en ambos lados	Pueden colocarse bajo el cuerpo. Sin pelos
Locomoción terrestre	Sobre las 4 patas, la tracción es producida tanto por las aletas posteriores como las anteriores	Por movimientos ondulatorios del cuerpo	Peso del cuerpo recae sobre el abdomen. El avance se logra por estocadas y apoyo sobre las aletas

Tal como se explicó en el Capítulo IV, los equinoftridos se caracterizan por poseer características morfológicas exclusivas, derivadas del proceso de adaptación a la vida anfibia de sus hospedadores. Todas las especies poseen (1) el segmento tibio-tarsal del segundo y tercer par de patas modificados para aferrarse firmemente a las fibras capilares de sus hospedadores; (2) un abdomen membranoso que aumentaría la eficiencia en el intercambio gaseoso subacuático; (3) espiráculos modificados con un sistema exclusivo de cierre que permitiría reservar oxígeno atmosférico y/o evitar la entrada de agua al sistema respiratorio central durante el período de inmersión (Kim, 1975). Sin embargo, algunas especies presentan adaptaciones particulares que habrían evolucionado en función del mecanismo de aislamiento de sus hospedadores.

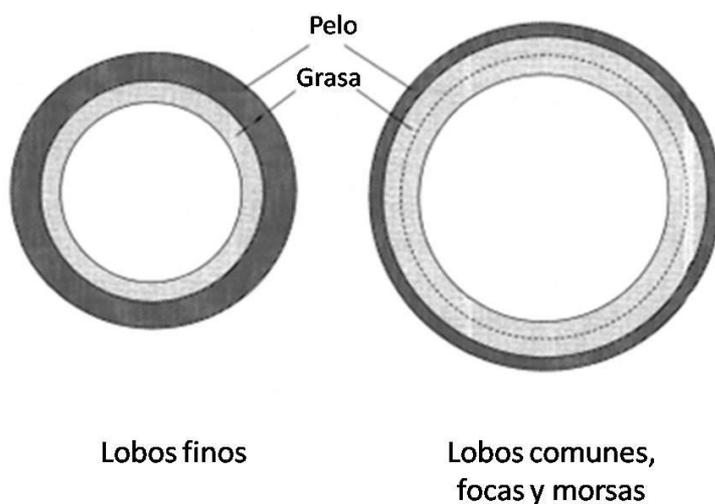


Figura 5.2- Representación esquemática de los mecanismos de aislamiento térmico en Pinnípedos. Nótese la diferencia de grosor entre las capas de grasa y de pelo. (Modificado de Mostman Liwanag, 2008).

Los lobos finos se caracterizan por poseer dos tipos de folículos pilosos, uno que da lugar al pelo de guarda y otro que da lugar a varios pelos más pequeños y finos que proveen el aislamiento (Tabla 5.1, Figura 5.2), la cual genera un ambiente virtualmente terrestre para las especies de *Proechinophthirus* incluso cuando los lobos se encuentran sumergidos. Sin embargo, en los lobos marinos, las focas y las morsas, el aislamiento térmico está principalmente ligado a la grasa corporal, por lo cual carecen de pelos de guarda y su pelaje se moja completamente durante las inmersiones (Tabla 5.1, Figura 5.2). Por lo tanto, los equinoftridos que infestan estas especies se

encuentran expuestos a condiciones acuáticas reales, lo cual se refleja en sus adaptaciones morfológicas. Las especies de *Antarctophthirus*, *Lepidophthirus* y *Echinophthirus* presentan espinas modificadas en escamas que recubren toda la superficie del cuerpo y que actuarían como plastrón o como protección de la fina cutícula (ver Capítulo IV).

Las diferencias entre los pinnípedos con pelaje impermeable (lobos finos) o permeable (los restantes pinnípedos), parecerían influir en las estrategias de historia de vida de sus especies de piojos. Existe la hipótesis de que tanto *Proechinophthirus fluctus* como *Antarctophthirus callorhini*, parásitos del lobo fino del norte, *Callorhinus ursinus*, serían capaces de reproducirse tanto cuando su hospedador esta en tierra como bajo el agua (Kim, 1975). Sin embargo, en al menos 3 especies de piojos (*Lepidophthirus macrorhini*, *Antarctophthirus ogmorhini* y *A. microchir*) que infectan hospedadores con pelaje permeable, se cree que la reproducción se encuentra restringida a los períodos que los hospedadores pasan suficiente tiempo en tierra. Esto sería consecuencia a que, como se explicara en los capítulos anteriores, se ha demostrado experimentalmente que los huevos no sobreviven bajo el agua. Resulta entonces interesante investigar si estas presiones selectivas también podrían influir en la selección de microhábitat de estos piojos. Esto quiere decir que se espera que, si estas especies tienen restricciones temporales en su reproducción, elijan como lugares de oviposición aquellos que garanticen o incluso “aceleren” el desarrollo de los huevos.

Otra diferencia importante entre los diferentes grupos de pinnípedos es el modo de locomoción en tierra (Tabla 5.1), que se refleja en la estructura y morfología de sus extremidades (King, 1983; Berta, 2006). Las aletas de las focas (Phocidae) están cubiertas de pelos y no participan en la locomoción terrestre; en las morsas (Odobeniidae) son peladas y participan parcialmente en el movimiento ondulatorio implicado en la locomoción; mientras que en los lobos marinos (Otariidae), las aletas participan activamente en la locomoción. Debido a ello, las aletas de los lobos marinos están cubiertas por un fino y corto pelaje en la parte ventral y por una piel gruesa a modo de palma en la parte dorsal (Tabla 5.1; Figura 5.3). Las diferencias estructurales y morfológicas de las aletas podrían influir en los lugares que los piojos eligen para

alimentarse y ovopositar. Específicamente, los piojos necesitan de la presencia de fibras capilares donde cementar los huevos (Murray, 1987) y probablemente eviten aquellas zonas de alta perturbación física (como la ocasionada por el contacto de las aletas con el sustrato en los otáridos).



Figura 5.3- Detalle de las aletas de crías de lobo marino de un pelo, donde se evidencia la falta de pelaje y las particulares “palmas” propias de los otáridos.

Por otra parte, los pinnípedos habitan tanto regiones polares como templadas y subtropicales (Tabla 5.1). De hecho, los equinofíridos son, probablemente, los piojos anopluros sometidos a la mayor variedad de condiciones climatológicas (Durden y Musser, 1994). Esta amplia distribución es fundamental para entender la biología del grupo dado que la temperatura es un factor crucial para la actividad y reproducción de los piojos. El pelaje del hospedador puede atenuar, pero no eliminar, el impacto de la temperatura atmosférica (ya sea alta o baja) sobre la piel del hospedador (Murray, 1987). Por lo tanto, es esperable encontrar diferentes estrategias en la selección de hábitat de los piojos en respuesta a los gradientes térmicos a los que los someten sus hospedadores.

Existen estudios sobre selección de hábitat de 4 especies de equinofíridos que infestan fócidos (3 de ellos en regiones polares-subpolares y uno en una región frío-

templada) y de 2 especies presentes en el lobo fino del Norte, en una región fría (Tabla 5.2). Si bien estos estudios son en general cualitativos y basados en pequeñas muestras, describen dos patrones generales. Primero, las 4 especies presentes en fócidos tienden a estar concentradas en las aletas posteriores de sus hospedadores, mientras que en las especies presentes en el lobo fino la distribución es más amplia y varía en función de la edad del hospedador, pero para ninguna de las 2 especies las aletas constituyen el hábitat preferido (Tabla 5.2). Segundo, independientemente de su posición taxonómica, por lo menos las 3 especies que infestan fócidos en las regiones polares y sub-polares, también utilizan las aletas posteriores como sitio de oviposición (no existe información disponible al respecto para los piojos del lobo fino del norte, véase la Tabla 5.2). Murray y Nicholls (1965) y Murray y colaboradores (1965) sugirieron que esta preferencia por las aletas posteriores se debe a que la rica vascularización de éstas las convierte en hábitat rico en alimento y un punto importante de disipación de calor. Este último proceso es fundamental en una región polar, ya que las aletas ofrecerían así la temperatura necesaria para el desarrollo de los huevos y la actividad de los restantes estadios.

En el presente capítulo se investigó el patrón de selección de hábitat de *Antarctophthirus microchir* en el lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, en Patagonia. Como consecuencia de las dificultades metodológicas que implicaría trabajar con adultos, el estudio se focalizó en las crías, la clase de edad clave en la dinámica poblacional del piojo (véase el Capítulo III). Por primera vez en el estudio de los equinoftridos, se proporcionan datos específicos sobre la distribución de cada uno de los estadios de desarrollo desde el huevo al adulto (Tabla 5.2). Esta asociación parásito-hospedador resulta particularmente interesante por 3 motivos que serán discutidos en el desarrollo del capítulo: (1) el pelaje del lobo marino de un pelo se moja durante las inmersiones (Tabla 5.1) y las crías son el único grupo de edad que permanece suficiente tiempo en tierra (aproximadamente 1 mes) para garantizar el éxito en la reproducción de los piojos. Surge por lo tanto la pregunta de cómo será la selección de hábitat en una especie cuya reproducción está temporalmente tan limitada. (2) Como se explicó anteriormente, los lobos marinos caminan sobre sus 4 patas, por lo tanto resulta interesante determinar si *A. microchir* utiliza este

microhábitat para alimentarse o reproducirse. (3) Los lobos marinos comunes se reproducen durante el verano austral, cuando la temperatura puede alcanzar los 38°C en el momento de máxima irradiación, mientras que por la noche puede bajar a menos de 15°C. Esta condición térmica contrasta con las descritas en los estudios previos en otras especies de equinoftíridos (Tabla 5.2), lo cual lleva a plantearse cuál es la importancia de la temperatura ambiente sobre la selección de hábitat de *A. microchir*.

Tabla 5.2- Estudios de selección de microhábitat en piojos de la familia Echinophthiriidae durante el período reproductivo en tierra de sus hospedadores. Los microhábitats se representan en la Figura 1.

Especie de hospedador	Especie de piojo	Localidad [Latitud]	n	Metodología	Microhábitat preferidos	Oviposición
Phocidae Foca de Weddell, <i>Leptonychotes weddelli</i> ¹	<i>Antarctophthirus ogmorhini</i>	Estrecho de McMurdo (Antártida) [77°51'S]	30	Focas muertas de diferentes edades Estimación cuantitativa	Aletas posteriores, tobillos, rabo, cadera. En menor medida alrededor del ano y la abertura peneana	Superficie dorsal de las aletas posteriores
Foca cangrejera, <i>Lobodon carcinophagus</i> ¹	<i>A. lobodontis</i>	Estrecho de McMurdo (Antártida) [77°51'S]	1	Macho juvenil Estimación cuantitativa	Aletas posteriores, tobillos, rabo, cadera, alrededor de la abertura peneana	Aletas posteriores
Elefante marino del sur, <i>Mirounga leonina</i> ²	<i>Lepidophthirus macrorhini</i>	Isla Mcquarie (Is. Subantárticas) [54°30'S]	21	Focas vivas de diferentes edades Estimación cuantitativa (46-80% de los piojos en las aletas posteriores en 4 hospedadores)	Aletas posteriores	Aletas posteriores
Foca común, <i>Phoca vitulina</i> ³	<i>Echinophthirus horridus</i>	Moray Firth (Escocia) [57°40'N]	87	Focas vivas de diferentes edades. Conteos solo en la superficie dorsal de la aleta posterior izquierda. Observación no sistemática en otras partes del cuerpo	Aletas posteriores	?
Otariidae Lobo fino del norte, <i>Callorhinus ursinus</i> ⁴	<i>A. callorhini</i>	Isla St. Paul (Alaska) [57°10'N]	8 (?) crías negras (1-3 meses de edad) 3 crías plateadas (4 meses). 4 adultos	Crías vivas retenidas durante 45-60 min; adultos (?). Estimación cuantitativa general (porcentajes).	Crías negras: fosas nasales, canal auditivo, párpados, área umbilical y abertura peneana Crías plateadas: Cabeza, cadera, dorso, vientre Adultos: Cadera.	?
Lobo fino del norte, <i>Callorhinus ursinus</i> ⁴	<i>Proechinophthirus fluctus</i>	Ídem <i>A. callorhini</i>	Ídem <i>A. callorhini</i> .	Ídem <i>A. callorhini</i>	Crías negras: cadera, abdomen Crías plateadas: cabeza, dorso, abdomen Adultos: cuello, abdomen, dorso, cadera	?

Fuentes: Murray *et al.* (1965); 2. Murray y Nicholls (1965); 3. Thompson *et al.* (1998); 4. Kim (1972, 1975).

Materiales y métodos

Recolección de datos

El estudio se llevó a cabo durante la temporada reproductiva 2008/9, en la Reserva Natural Punta León. Como se mencionara en la Introducción General, Punta León es una reserva científica, localizada 10 km al sur de Punta Ninfas. La colonia de lobos marinos se localiza sobre una amplia playa de canto rodado de unos 7 km de extensión, bordeada de acantilados de 50-100 m de altura (Figura 5.4). En enero la temperatura media es de 20°C, pudiendo alcanzar temperaturas máximas de 38°C (Yorio *et al.*, 1995).



Figura 5.4- Vista área de la colonia de lobos marinos comunes, *Otaria flavescens*, localizada en la Reserva Natural Turística y Unidad de Investigación Biológica Punta León, Provincia de Chubut, Argentina.

Se examinaron 25 crías de lobo marino de un pelo, definiéndose 3 microhábitats: (1) las aletas posteriores, (2) el dorso y (3) el vientre. Para poder comparar los resultados obtenidos con los existentes de estudios previos se realizaron las siguientes equivalencias (Figura 5.5): las “aletas posteriores” incluyen también el rabo y los tobillos; el “dorso” incluye la cadera y la espalda; el “vientre” incluye la panza, el pecho, la región anal y umbilical, y el orificio genital en los machos. El cuello, la cabeza y las aletas anteriores no pudieron ser examinados debido a que son los puntos por los cuáles se retiene a la cría (ver Figura 1.8 en la Introducción General). La cabeza, especialmente, debe ser sostenida de forma continuada para evitar mordiscos. Sin embargo, se logró realizar revisiones oportunistas de las orejas, los

ojos y los orificios nasales. Los piojos se colectaron siguiendo la metodología planteada en la Introducción General, clasificándolos posteriormente según su estadio de maduración. El estado reproductivo de las hembras (ovígeras o no ovígeras) se registró en función de si la presencia o no de huevos, los cuales son claramente visibles por transparencia (Figura 5.6).

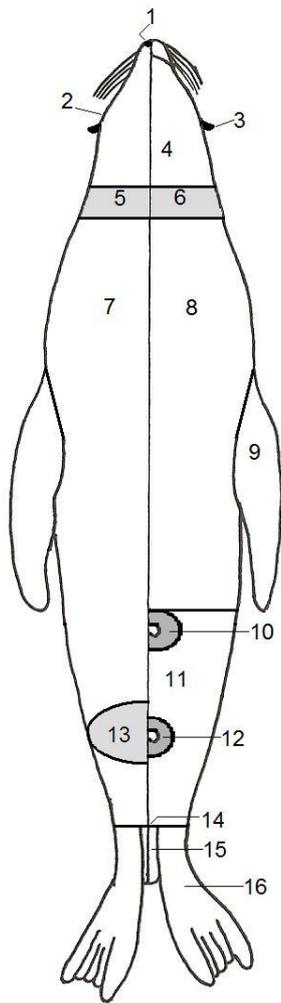


Figura 5.5- Representación esquemática de la superficie externa de un pinnípedo mostrando los microhábitats definidos para los equinoftridos.

- 1- Fosas nasales
- 2- Párpados
- 3- Canal auditivo
- 4- Cabeza
- 5- Región dorsal del cuello
- 6- Región ventral del cuello
- 7- Dorso
- 8- Pecho
- 9- Aletas pectorales
- 10- Región umbilical
- 11- Vientre
- 12- Orificio peneal
- 13- Cadera
- 14- Ano
- 15- Rabo
- 16- Aletas posteriores

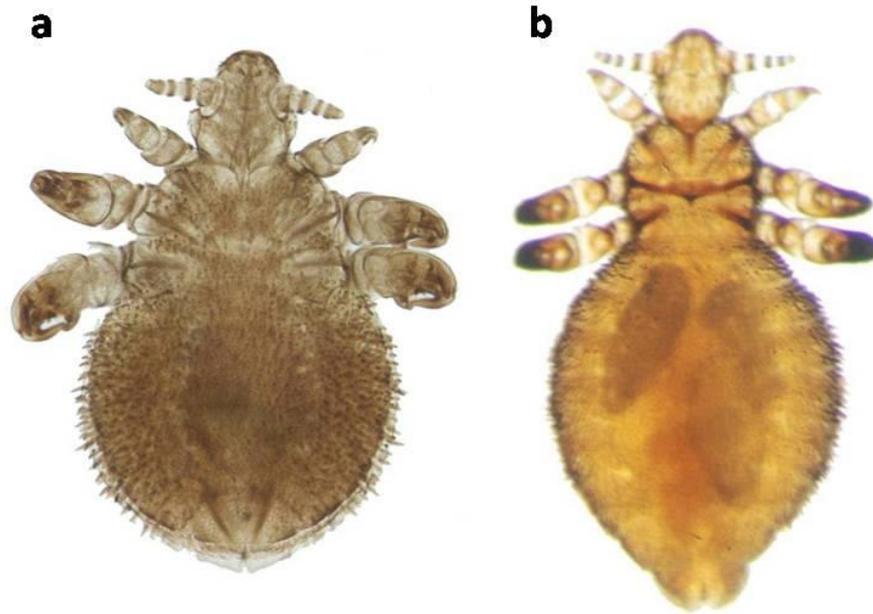


Figura 5.6- Determinación del estado reproductivo de las hembras de *Antarctophthirus microbir*. **a-** Hembra no ovígera; **b-** hembra ovígera (nótese la presencia de huevos).

Caracterización del microhábitat

Para poder determinar la existencia de diferencias en la temperatura en diferentes regiones del cuerpo, se seleccionaron al azar 8 crías con el pelaje seco. Las mediciones se tomaron de forma secuencial y aleatoria con un termómetro infrarrojo (modelo TFA Flash3 31.1114, rango de temperatura -33°C a 250°C ; precisión 2% o 2°C) en las siguientes zonas del cuerpo: (1) sobre el pelaje del dorso, (2) en el dorso sobre la superficie de la piel, (3) en la panza (el pelaje es muy corto para poder diferenciar entre mediciones en la punta del pelo y sobre la piel) y (4) en las aletas posteriores. Cada una de las medidas se tomó 2 veces entre las 12 y las 14 hs, esto es, la hora de máxima radiación solar. Así mismo se tomaron mediciones de la temperatura ambiente y del sustrato y de la humedad relativa, utilizando para ello una estación meteorológica portátil (Skywatch ATMOS, Mod.06. GEOS 11. WSC-888).

Se tomaron muestras de pelo de 20 crías, seleccionadas aleatoriamente y recolectando muestras del dorso y del vientre; no se colectó pelo del lado dorsal de la aleta ya que es demasiado corto para arrancarlo sin lastimar a la cría. De cada uno de los pelos se tomaron medidas de largo y ancho utilizando para ello un microscopio estereoscópico (aumento 80x).

Análisis estadístico

Los parámetros de infección se estimaron siguiendo a Rózsa *et al.* (2000). Se diferenciaron 7 categorías poblacionales: huevos, ninfas 1, 2 y 3, machos, hembras no ovígeras y hembras ovígeras. La prevalencia se definió como la frecuencia de aparición, expresada como porcentaje, de una categoría determinada en el total de la población o en un microhábitat específico (por ejemplo, la panza). Los intervalos de confianza del 95% se estimaron mediante el Método Exacto de Sterne, que se basa en la distribución binomial negativa (Reiczigel, 2003). La abundancia media se definió como el número de individuos de una categoría poblacional por hospedador o microhábitat en la muestra total de hospedadores. Dado que los datos en bruto no se ajustaban a una distribución normal, ni se pudieron normalizar por medio de transformaciones, se calcularon los intervalos de confianza del 95% de la abundancia media aplicando el procedimiento bootstrap con 20000 réplicas (Rózsa *et al.*, 2000).

De los 3 hábitats definidos en el muestreo, sólo se encontraron piojos en 2 de ellos (panza y dorso). Las diferencias estadísticas en la abundancia de cada categoría poblacional entre estos dos microhábitats se determinaron mediante el test no paramétrico de Wilcoxon para observaciones pareadas (Conover, 1999).

Los datos de largo y ancho del pelo de panza y dorso siguieron una distribución normal. Dado que los pelos se tomaron de diferentes hospedadores, la comparación de las medidas se realizó mediante un test de Student para muestras independientes. Sin embargo, los datos de temperatura, no se ajustaban a una distribución normal y, por tanto, se utilizó un test no paramétrico de Friedman para muestras pareadas para determinar diferencias significativas entre la superficie dorsal, la piel del dorso, el vientre y las aletas.

Tanto los parámetros de infección como los intervalos de confianza se obtuvieron utilizando el software de distribución gratuita Quantitative Parasitology v.3 (Reiczigel y Rózsa, 2005). Los restantes análisis se realizaron con el programa SPSS v.17 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). La significancia estadística se estableció en un valor $p < 0,05$.

Resultados

Con excepción de un individuo, todas las crías de lobo marino estuvieron infestadas con *A. microchir* (prevalencia 96%, IC 95% 80,4- 99,7). Se colectaron un total de 449 piojos, con una abundancia media de 18 individuos (IC 95% 12,6- 29,0) por hospedador.

Los piojos resultaban visibles a simple vista, sobre todo en la región ventral, donde el pelo es más corto (véase a continuación), encontrándose más bien extendidos sobre la superficie que en agregaciones alrededor del ombligo o el ano (Figura 5.7). No se encontraron individuos ni huevos en la parte dorsal o ventral de las aletas posteriores. En la Tabla 5.3 se muestran los resultados obtenidos de prevalencia y abundancia media para cada estadio de desarrollo en relación a la población total, tanto en la región dorsal como la ventral. Se encontró que la prevalencia y abundancia media de los huevos y las hembras ovígeras fue mayor en la región dorsal que en la ventral, mientras que para todos los estadios ninfales, los machos y las hembras no ovígeras, se observó el patrón opuesto. Todas las referencias resultaron estadísticamente significativas excepto en el caso de las ninfas 1 (Tabla 5.3).

Resulta evidente a simple vista que existen diferencias entre el pelaje de la región dorsal y el de la ventral (Figura 5.8). Las muestras de pelos analizadas confirman que los pelos del dorso son más largos y gruesos que los del vientre: la longitud media (\pm DS) fue $12,0 \pm 1,5$ contra $10,2 \pm 1,8$ mm ($t=4,599$; 19 g.l.; $p<0,001$) y el grosor medio fue de $6,3 \pm 1,0$ contra $4,8 \pm 1,3$ μ m ($t=3,485$; 19 g.l.; $p<0,001$).



Figura 5.7- Individuos de *Antarctophthirus microchir* en el vientre de una cría de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*.

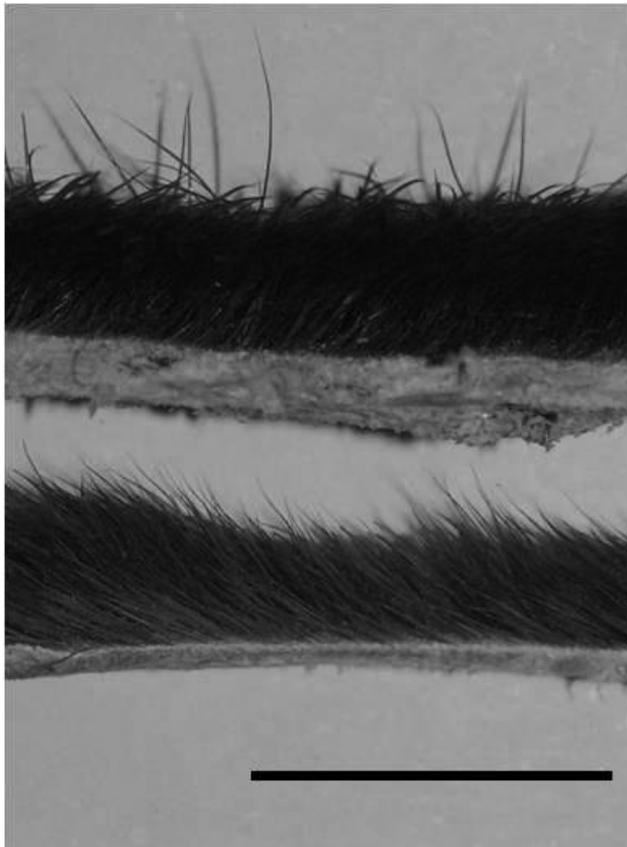


Figura 5.8- Fotografía del pelaje dorsal (superior) y ventral (inferior) de una cría de lobo marino de un pelo. Nótese las diferencias en largo y densidad (Barra= 10mm).

Tabla 5.3- Prevalencia (P) y abundancia media (AM), con los intervalos de confianza del 95% entre paréntesis, de los diferentes estadios del piojo *Antarctophthirus microchir* en relación al total de la población y según la zona del cuerpo analizada (dorso o vientre) de 24 crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, en Patagonia, Argentina. Se señalan también los valores obtenidos del test de Wilcoxon que compara las abundancias entre dorso y abdomen para cada estadio (valores $p < 0,05$ se consideran no significativos).

Estadio	Población total		Dorso		Vientre		Test de Wilcoxon	
	P	AM	P	AM	P	AM	Valor Z	P
Huevo	56,0 (25,8-74,4)	3,2 (1,6-6,6)	48,8 (29,6-68,3)	3,0 (1,5-6,2)	16,0 (5,6-35,7)	0,2 (0,04-0,4)	2,991	0,003
Ninfa 1	36,0 (19,6-56,1)	4,6 (0,7-14,1)	8,0 (1,5-25,6)	1,4 (0,0-5,7)	32,0 (16,1-52,0)	3,2 (0,4-13,7)	-1,434	0,151
Ninfa 2	64,0 (43,9-80,4)	3,1 (1,8-5,0)	12,0 (3,4-30,3)	0,7 (0,04-2,6)	56,0 (35,0-74,4)	2,4 (1,4-3,8)	-2,447	0,014
Ninfa 3	80,0 (60,2-91,8)	4,4 (3,0-6,3)	8,0 (1,5-25,6)	0,1 (0,0-0,4)	76,0 (56,1-89,0)	4,3 (2,8-6,2)	-3,873	<0,001
Macho	80,0 (60,2-91,8)	2,1 (1,4-2,9)	4,0 (0,2-19,6)	0,04 (0,0-0,12)	80,0 (60,2-91,8)	2,0 (1,4-2,8)	-3,970	<0,001
Hembras	84,0 (64,3-94,3)	3,4 (2,3-4,9)	56,0 (35,8-74,4)	1,1 (0,6-1,6)	64,0 (43,9-80,4)	2,4 (1,4-3,5)	-2,280	0,023
Hembras no ovígeras	56,0 (35,8-74,4)	1,9 (1,1-3,0)	4,0 (0,2-19,6)	0,04 (0,0-0,12)	56,0 (35,8-74,4)	1,9 (1,1-2,9)	-3,314	0,001
Hembras ovígeras	68,0 (48,0-83,9)	1,5 (1,0-2,4)	68,0 (48,0-83,9)	1,5 (1,0-2,4)	32,0 (16,1-52,0)	0,5 (0,2-0,8)	2,018	0,044

En la tabla 5.4 se presentan los datos de la temperatura tomada del ambiente, el sustrato y el cuerpo de la cría. La temperatura del sustrato fue mayor que la del pelaje y cercana a la registrada en la superficie dorsal de la cría. El Test de Friedman reveló diferencias generales de temperatura entre la superficie dorsal, la piel dorsal, el vientre y las aletas ($\chi^2=16,53$; 8 g.l.; $p=0,001$). Sin embargo, en el análisis post hoc sólo se encontraron diferencias entre la superficie dorsal y todos las demás regiones del cuerpo ($p < 0,05$) (Tabla 5.4).

Tabla 5.4- Promedio, varianza y rango de las temperaturas medidas en el ambiente, el sustrato y las diferentes partes del cuerpo en crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, en Punta León, Patagonia Argentina. Se incluye también la información sobre la humedad relativa (HR) del ambiente.

	Ambiente	Sustrato		Cría			
	T (°C)	HR (%)	T (°C)	Superficie dorsal T (°C)	Piel del dorso T (°C)	Superficie ventral T (°C)	Aletas T (°C)
N	26	26	4	8	8	8	7
Promedio	31,3	28,0	41	41,1	34,0	32,7	33,2
(Varianza)	(3,7)	(24,0)	(2,2)	(19,3)	(6,8)	(10,3)	(4,2)
Rango	27,0-34,0	21,5-42,5	39,7-42,9	34,9-50,3	29,0-37,1	27,2-39,3	28,8-36,3

Discusión

Los resultados del presente capítulo indican 3 claros patrones de selección de hábitat de *Antarctophthirus microchir* en las crías de lobo marino de un pelo:

- (1) No se encuentran piojos ni huevos en las aletas posteriores;
- (2) Los huevos y las hembras ovígeras son más abundantes en la región dorsal del cuerpo;
- (3) Las ninfas, los machos y las hembras no ovígeras son más abundantes en la zona del vientre.

En ninguno de los estudios previos realizados con equinoftíridos se había reportado la selección de microhábitat específica para cada estadio de desarrollo (Tabla 5.2). Sin embargo, es necesario tener en cuenta algunas consideraciones y restricciones metodológicas al momento de interpretar estos resultados. En primer lugar, existen puntos precisos de los que se carece de información sobre la distribución de los piojos por ser los lugares por los cuales se retiene a la cría, i.e. cabeza, cuello y aletas anteriores. Sin embargo, estas regiones son potenciales microhábitats para *A. microchir*, sobre todo considerando que en una especie congénérica, *A. callorhini*, los párpados, el canal auditivo y las fosas nasales resultaron ser microhábitats preferidos por los piojos en el lobo fino del norte (Tabla 5.2). Sin embargo, las observaciones en campo nos permiten asumir en el hecho de que los puntos de restricción no son un hábitat frecuente de los piojos ya que estos son visibles a simple vista (Figura 5.7), pero dicha asunción no puede aplicarse al caso de los huevos.

Segundo, los estudios previos fueron realizados con largos periodos de examinación de crías vivas (entre 45 y 60 min), o con adultos muertos o retenidos en el laboratorio (Murray y Nicholls, 1965; Murray *et al.*, 1965; Kim, 1972, 1975). Sin embargo, la manipulación de las crías de lobos marinos comunes fue muy breve (menos de 5 min.) lo que resulta beneficioso para las crías pero limita el muestreo de piojos. Para coleccionar piojos se utilizó un peine de dientes finos y tal como se explicó en el Capítulo III, si bien esta metodología resulta confiable, se evitó comparar abundancias entre diferentes estadios. Resultó más dificultoso peinar la región dorsal de las crías, donde el pelaje es más grueso y denso (Figura 5.8). Sin embargo, se intentó mantener un esfuerzo equitativo de muestreo, terminando de peinar cuando al pasar el peine ya no se coleccionaban más piojos. El hecho que los huevos y las ninfas 1, que son los estadios más difíciles de muestrear, fueran más abundantes en el dorso, sugiere que el patrón descrito de distribución no se ve influenciado por la técnica de muestreo.

Tercero, el muestreo se realizó durante el momento de mayor radiación solar. Esto permitió replicar de las condiciones de muestreo de forma fiable, a costa de analizar un menor número de hospedadores. Sin embargo, no se puede descartar que la distribución de los piojos cambie a lo largo del día en función de la temperatura u otros factores. De hecho, Murray (1987) reportó que bajo condiciones polares, *A. ogmorhini* restringe su distribución a las zonas de disipación de calor de las focas de Weddell (Tabla 5.2). Sin embargo, cuando estas mismas focas se transportaron al Acuario de Nueva York, con 14°C de temperatura, los piojos se dispersaron por todo el cuerpo.

Por último, las inferencias realizadas sobre la selección de hábitat de *A. microchir* se restringen a las crías. Es probable que el patrón cambie en función de la edad, tal como fue observado por Kim (1972) para *A. callorhini* (Tabla 5.2). Sin embargo, dicho autor reconoció no poder determinar las causas de esta variación. Es posible que este patrón sea consecuencia de un error de muestreo, debido al pequeño tamaño muestral.

La comparación de la abundancia de huevos entre los microhábitats sugiere que las hembras de *A. microchir* seleccionan el dorso de las crías como sitio de

oviposición. Esta interpretación se ve apoyada a la vez por la mayor abundancia de hembras ovígeras en esta zona. Resulta también interesante que las ninfas 1 sean relativamente más abundantes en el dorso si se compara como los demás estadios de desarrollo, que se encuentran concentrados en la panza. Dado que las ninfas 1 también fueron abundantes en la panza, este patrón sugiere que eclosionan en el dorso y luego migran hacia la panza.

Este patrón de oviposición contrasta con el descrito para especies que aparecen en focidos, donde las aletas posteriores son el lugar preferido de oviposición (Tabla 6.2). Tanto en *Lepidophthirus macrorhini* en el elefante marino del sur, como *A. ogmorhini* en la foca de Weddell, las hembras parecen seleccionar los sitios de disipación de calor (Murray *et al.*, 1965; Murray y Nicholls, 1965). Por ejemplo, en los elefantes marinos estando expuestos a una temperatura ambiente de 1,8°C, mantienen una temperatura corporal entre 1-6°C, pero de 29-32°C en las aletas. Por lo tanto, las aletas proporcionarían el rango óptimo de temperatura para garantizar el desarrollo de los huevos. En general, el proceso de oviposición en los piojos se ve fuertemente influenciado por la temperatura (Murray 1955, 1957 a, b, c, d, 1960, 1987; Murray *et al.*, 1965; Murray y Nicholls, 1965). Sin embargo, en las crías de lobo marino de un pelo se encontraron pequeñas diferencias de temperatura entre las aletas y el resto del cuerpo, lo cual parece sugerir que no existen diferencias de temperatura entre los microhábitats. La gran varianza que presentaron las mediciones podría deberse a cuán secas estaban las crías al momento de tomar la temperatura (véase más abajo).

La presencia y el grosor del pelo son factores fundamentales de los cuales depende la oviposición de los piojos ya que la hembra no puede poner los huevos si el pelo no puede ser sostenido por el gonopodo (Murray, 1957d; Murray, 1987). En el caso de las crías de lobo marino de un pelo, el pelo del dorso resultó ser más largo y grueso que el del vientre (Figura 5.8); mientras que el lado ventral de las aletas carece de pelo y en el lado dorsal el pelo es fino y corto (Figura 5.3). El grosor del pelo parecería entonces ser el factor determinante en la selección del hábitat de oviposición, dado que las hembras de *A. microchir* deben cementar los huevos a los pelos y que para que estos suceda la fibra capilar debe poseer un ancho y largo preferente.

Otro factor que podría influenciar el comportamiento de oviposición es la humedad relativa (HR). En diversas especies de Phthiraptera, la morfogénesis se desarrolla bajo un amplio rango de HR pero la humedad extremadamente alta (que puede darse, por ejemplo, cuando se moja el pelaje) afecta la eclosión de las ninfas (Murray, 1987). Mougabure-Cueto *et al.* (2006) demostraron recientemente que el piojo de la cabeza humano (*Pediculus capitis humanus*) tiene una tasa de eclosión extremadamente baja cuando la humedad es cercana al 100%. En especies de equinoftridos, como *L. macrorhini*, Murray y Nicholls (1965) demostraron experimentalmente que los piojos no pueden eclosionar cuando se sumerge los huevos en agua de mar. En el caso de *A. microchir*, los huevos no eclosionaron luego de mantenerlos 24 h en un rango de 0° a 35°C (Leonardi, datos no publicados). La letalidad de la alta humedad sobre los huevos es una de las características más notorias de los piojos de esta familia: a lo largo de su evolución pudieron adaptarse a condiciones de frío extremo y a pasar largos períodos sumergidos, pero al igual que sus hospedadores dependen de condiciones aéreas para reproducirse (ver Capítulo III).

Si bien las crías de lobo marino no comienzan a nadar hasta el mes de vida (obs. pers.), diariamente se ven expuestas a la acción de la marea, ya sea por el ciclo mismo o por el comportamiento termorregulatorio (Campagna y Le Boeuf, 1988b). En días de mucho calor, los lobos permanecen cerca de la línea de marea (Campagna y Le Boeuf, 1988b), mientras que de noche o los días más frescos se alejan de la misma. De hecho, muchas de las crías que se capturaron en este estudio en particular, y a lo largo de los años para esta tesis, estaban mojadas. Resulta por ello interesante que el dorso de las crías se seque más rápidamente que el vientre, principalmente los días de mayor radiación solar. Por un lado, porque el dorso se ve más expuesto a los rayos del sol y, por otro, porque el vientre se encuentra en contacto casi permanente con el sustrato. En Punta León, como en otras playas de canto rodado en Península Valdés, las piedras se conservan húmedas, lo cual es utilizado por los animales para disipar calor (Campagna y Le Boeuf, 1988b). Resulta pues posible, que las hembras de *A. microchir* eviten ovopositar en el vientre para minimizar los efectos letales de la

alta humedad. Sin embargo, es una hipótesis que debería ser puesta a prueba en el futuro.

Tanto las ninfas 2 y 3 como los machos y las hembras no ovígeras de *A. microchir* fueron significativamente más abundantes en la panza de las crías de lobo marino de un pelo en el horario de mayor radiación solar. En estudios previos se identificó a la temperatura como el factor determinante de la distribución de equinoftíridos en focas (Murray *et al.*, 1965; Murray y Nicholls, 1965; Tabla 5.2); pero como se mencionó anteriormente, no se encontraron diferencias de temperatura en la parte del cuerpo de las crías analizadas. La ausencia de piojos en las aletas resulta lógica considerando que estas se encuentran implicadas en el proceso de locomoción en tierra (Tabla 5.1), por lo cual los piojos en esta región se verían sometidos a la abrasión contra el sustrato.

Resulta complejo determinar los factores que influyen la selección de la panza como hábitat preferido por la mayoría de los estadios. Estudios experimentales han demostrado que tanto el plumaje como el pelaje de aves y mamíferos, respectivamente, amortiguan la baja humedad del ambiente (Murray, 1987; Moyer *et al.*, 2002). En el caso de *A. microchir* en Patagonia, la humedad no sería una cuestión menor dado por un lado lo árido del ambiente (28% HR promedio) y por otro el riesgo de desecación de los piojos. Los piojos de la familia Echinophthiriidae se caracterizan por poseer una cutícula muy fina (Mehlhorn *et al.*, 2002), lo cual favorecería la respiración bajo el agua. Sin embargo, cuando el hospedador se encuentra en tierra en condiciones de altas temperaturas y baja humedad ambiente los piojos corren el riesgo de deshidratarse. En este contexto, resultaría ventajoso para *A. microchir* seleccionar la panza como hábitat.

Como conclusión, el presente estudio sugiere que la selección de hábitat de *A. microchir* varía según el estadio de desarrollo considerado y que el patrón descrito difiere del de los equinoftíridos que infestan lobos finos y focas. Resulta probable que la combinación de un ambiente seco y caluroso, más la constante influencia de la marea sean los factores que condicionan en mayor medida la selección de hábitat de *A. microchir*. Sin embargo, se necesita mayor información para fundamentar esta hipótesis. Más allá de las causas que condicionan este comportamiento, resulta

evidente que los equinoftridos constituyen un fascinante ejemplo de la capacidad de algunos parásitos para adaptarse a una gran variedad de escenarios ecológicos.

Capítulo VI

Adaptaciones ecológicas. Segunda Parte.

Transmisión vertical de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo

Los contenidos del presente capítulo han sido publicados en:

Leonardi, M.S., E.A. Crespo, J.A. Raga, and F.J. Aznar. Lousy mums: patterns of vertical transmission of an amphibious louse. *Parasitology Research* **112**, 3315-3323.



Resumen

En el presente capítulo se estudiaron los patrones de transmisión vertical del piojo anfibio *Antarctophthirus microchir* (Echinophthiriidae), en crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, en Patagonia. Dado que las crías son las únicas que permanecen en tierra el tiempo suficiente para garantizar la reproducción de los piojos, la transmisión vertical resulta clave para mantener la estabilidad a largo plazo de las poblaciones de *A. microchir*. En total se examinaron 72 crías de lobo marino, todas ellas con menos de una semana de nacidas. Los parámetros de infección y la estructura poblacional de *A. microchir* no mostró diferencias entre las crías nacidas a principios, mediados o finales de la temporada reproductiva; lo cual sugiere que el patrón de transmisión vertical no se ve afectado por el crecimiento poblacional de la colonia durante ese período. Alrededor del 60% de las crías de 1 día de edad se encontraron infestadas con *A. microchir* y el reclutamiento aumentó en crías de hasta 3 días de edad, nivelándose en crías mayores. En las crías de 1 día de edad se encontraron más adultos que ninfas, pero este patrón se revirtió en crías de mayor edad. El número de ninfas 1 fue significativamente menor que el de ninfas 2 y 3, como así también el número de machos respecto a las hembras, especialmente en crías de 1 día de edad. Estos patrones podrían ser explicados por tres hipótesis: el reclutamiento es el reflejo de la estructura poblacional de *A. microchir* en las hembras de lobo marino, la habilidad de transmisión de los piojos aumenta en función de su estadio de desarrollo, y/o la selección natural favorece la transmisión de adultos, especialmente hembras, porque ellas garantizan un mayor *fitness*. La importancia de esta última hipótesis no debería ser subestimada en especies con períodos tan limitados para la reproducción.

Introducción

Los piojos son los únicos insectos que presentan un estilo de vida parásito, obligado y permanente durante todo su ciclo vital, viviendo como ectoparásitos sobre la superficie de su hospedador (Kim, 1985; Bush *et al.*, 2001). Siendo insectos sin alas, incapaces de sobrevivir largos períodos fuera de su hospedador, los piojos tienen pocas oportunidades de dispersión, dependiendo en gran medida del contacto físico entre hospedadores para poder transmitirse entre ellos (Demastes *et al.*, 1998; Galloway, 2012; Toloza *et al.*, 2009). Potencialmente esta transmisión puede ser vertical u horizontal. La transmisión vertical implica el movimiento de los piojos de padres a crías, mientras que la transmisión horizontal se da entre hermanos o durante la cópula (Brooke, 2010). Las consecuencias evolutivas y ecológicas de cada tipo de transmisión tienen profundas implicancias tanto para los piojos como para sus hospedadores en cuestiones asociadas a la evolución de la virulencia (Clayton y Tomkins, 1994; Darolova *et al.*, 2001; Brooke, 2010), el patrón de co-especiación (Demastes *et al.*, 1998; Vas *et al.*, 2012, y las referencias en ellos) o la selección sexual (Lee y Clayton, 1995).

Sorprendentemente, pocos estudios han analizado los patrones de transmisión vertical u horizontal en piojos, y la mayoría de ellos se centran en piojos de aves (Lee y Clayton 1995; Galloway 2012, y sus referencias). Sin embargo, estos estudios representan la base fundamental para entender las presiones selectivas que actúan sobre la transmisión en función de la historia de vida del hospedador (Brooke, 2010). Así, por ejemplo, la transmisión horizontal resulta fundamental para entender los patrones epidemiológicos del piojo de la cabeza, *Pediculus humanus capitis*, en las sociedades modernas (Toloza *et al.*, 2009; Rózsa y Apari, 2012). La transmisión cabeza a cabeza se encuentra en gran medida restringida a los niños, al punto que la pediculosis se considera una pandemia pediátrica (Rózsa y Apari, 2012). Mientras que se ha sugerido que la transmisión vertical juega un rol fundamental en aquellas especies de piojos cuyos hospedadores tienen escaso contacto físico, como por ejemplos los vencejos comunes (Lee y Clayton, 1995) o en las tuzas (Demastes *et al.*, 1998). Los estadios ninfales y sexos que se transmiten predominantemente dependen de los compromisos (*trade-off*) de cada estadio, lo cual a su vez depende de la biología

del hospedador. Por ejemplo, las hembras del piojo chupador *Haemodispsus setoni* constituyen el estadio predominante en los juveniles de los conejos de Florida, *Sylvilagus floridanus*, en Canadá. Galloway (2012) sugirió que las hembras fertilizadas pueden establecer rápidamente poblaciones fundadoras en un hábitat (los conejos juveniles) relativamente libre de competidores y con una menor presión en relación al acicalamiento y/o la inmunidad del hospedador. Por otro lado, se ha registrado que los piojos masticadores *Dennyus hirundinis* se transmiten de los vencejos comunes padres a sus pichones principalmente como ninfas, las cuales se desarrollarían a adultos y reproducirían en sincronía con el proceso de emplumado de los pichones (Lee y Clayton, 1995).

En el presente capítulo se registra por primera vez el patrón de transmisión vertical de un piojo anfibio en base a un muestreo realizado sobre un gran número de hospedadores en condiciones naturales. Los piojos que infectan hospedadores buceadores resultan particularmente interesantes dado las condiciones adversas que deben enfrentar para sobrevivir y transmitirse en comparación a los piojos estrictamente terrestres (Felső y Rózsa, 2006, 2007). Como se mencionara en los capítulos anteriores, los piojos de la familia Echinophthiriidae presentan adaptaciones morfológicas asociadas a su adaptación al medio marino (Mehlhorn *et al.*, 2002; Capítulo IV). La colonización de este nuevo ambiente impuso importantes restricciones en el desarrollo del ciclo reproductivo de estas especies, ya que como se mencionara anteriormente, los huevos de los anopluros no sobreviven largos períodos inmersos (Murray, 1976). Particularmente, los equinoftridos que infectan pinnípedos con un pelaje permeable (lobos marinos, morsas y focas) mantienen la dependencia del ambiente terrestre para reproducirse y, por lo tanto, el número de generaciones anuales se ve restringido por la duración de los períodos en tierra de su hospedador (Murray y Nicholls, 1965; Murray *et al.*, 1965; Capítulos III y V).

Como se mencionó en los capítulos anteriores, la reproducción de *Antarctophthirus microchir* dependería en gran medida de las crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, dado que son las únicas que permanecen suficiente tiempo en tierra. Como se describió en el Capítulo III, *A. microchir* tiene un lapso de 1 mes para reproducirse, ya que al mes de nacidas las crías comienzan a nadar y mudan su pelaje.

Los resultados de los modelos de proyección indican que *A. microchir* completa su ciclo en aproximadamente 20 días; se requieren 9 días para que se desarrollen los huevos y un mínimo de 8 días para que se desarrollen los tres estadios ninfales. Por lo tanto, sólo 1 ó 2 generaciones de piojos pueden ser producidas anualmente en esta especie hospedadora (Capítulo III).



Figura 6.1- Hembra de lobo marino de un pelo amamantando a su cachorro en la Reserva Natural Punta León.

La transmisión de los equinoftridos entre sus hospedadores pinnípedos sólo es posible durante los períodos de descanso o reproducción en tierra de éstos (Kim, 1975; Leidenberger *et al.*, 2007). Las oportunidades de dispersión de los piojos se ven afectadas por el comportamiento de sus hospedadores (Murray and Nicholls, 1965; Murray, *et al.* 1965; Kim, 1972, 1975). En general, en especies antárticas y árticas la mayor transmisión se da entre la madre y el cachorro durante el amamantamiento (Figura 6.1), siendo que las crías son infectadas a las pocas horas de nacer (Kim, 1972). La transmisión horizontal parecería jugar un rol importante en las crías, cuando se congregan (Figura 6.2) mientras su madres se encuentran en viaje de alimentación (Kim, 1972, 1975), pero tendría un rol menor entre los adultos (Kim, 1975).

Teniendo en cuenta estas importantes restricciones temporales, resulta evidente que la transmisión vertical durante la primer semana de vida de la cría es un proceso fundamental en la dinámica de *A. microchir*. Como se describiera en la Introducción

General, las hembras de lobo marino de un pelo dan a luz a un único cachorro 2 ó 3 días después de arribar a la colonia reproductiva. Las madres permanecen entre 8 y 9 días con su cachorro para luego partir en viaje de alimentación por un período de 1 a 4 días; los viajes de alimentación se alternan con 2 días de amamantamiento en tierra (Campagna y Le Boeuf, 1988a; Werner y Campagna, 1995; Cappozzo y Perrin, 2009). Por lo tanto, si bien existen varios momentos a lo largo de la temporada reproductiva para que se produzca la transmisión de madres a crías, aquellos piojos que se transmitan más tardíamente (es decir, después de los 8 ó 9 días de edad de la cría) disponen de menos tiempo para que los huevos se desarrollen antes de que la cría comience con sus primeras inmersiones en el mar.



Figura 6.2- Crías de lobo marino de un pelo en la Reserva Natural Punta León. (Foto Gisela Giardino)

En crías con una edad menor o igual a 7 días, el reclutamiento se debería casi exclusivamente a los piojos transmitidos por sus madres (ver Capítulo III). Este patrón de reclutamiento dependería, en teoría de 3 factores no exclusivos. Primero, la estructura poblacional de los piojos en las crías de lobo marino sería el reflejo de la carga parasitaria de su madre (Kim, 1975). Esto constituye prácticamente una “hipótesis nula”: se esperaría que los estadios más representados en una cría sean aquellos que son más abundantes en su madre. Segundo, Takano-Lee y colaboradores (2005) demostraron experimentalmente que la velocidad de traslado, y consecuentemente la habilidad de dispersión, es mínima en el primer estadio ninfal del piojo humano de la cabeza, *Pediculus humanus capitis*, y se incrementa en los estadios más avanzados. Parece ser que la eficacia de la transmisión aumenta a medida que

aumenta el grado de desarrollo del piojo, simplemente por la maduración y la consecuente mejora en la capacidad locomotriz. Si algo similar ocurre en *A. microchir*, se esperaría que se transmitan desde las madres más adultos que ninfas, y más ninfas 2 y 3 que ninfas 1. Tercero, la selección natural favorecería particularmente la transmisión de algunos estadios. La transmisión rápida de ejemplares adultos generaría mayores beneficios reproductivos que si se transmiten ninfas, dado que pueden comenzar a producir huevos en un plazo de tiempo menor; de hecho, los adultos que se transmiten más tempranamente podrían producir 2 generaciones exitosas en el transcurso de un mes (Capítulo III). Es más, dentro de los adultos, sería aún más beneficioso transmitir hembras dado que las hembras de piojo fecundadas en la madre pueden directamente ovopositar en el cachorro. Resumidamente, se puede predecir que los piojos adultos se transmiten a las crías en mayor medida que las ninfas, y a su vez es mayor la transmisión de hembras que de machos.

El objetivo del presente Capítulo fue describir el patrón de transmisión vertical de *A. microchir* en crías de lobo marino de un pelo para determinar la influencia de cada uno de los tres factores descritos anteriormente como factores determinantes en el patrón de transmisión. Lo ideal sería poder comparar la estructura poblacional de *A. microchir* entre madres y crías. Sin embargo, esto resulta metodológicamente complejo, dado que la manipulación de ejemplares adultos de lobo marino implica su anestesia, lo cual no es ética ni logísticamente recomendable en animales en período reproductivo. Por lo tanto, el muestreo se limitó a las crías. Se investigó también cómo la población colonizadora de piojos en las crías de hasta una semana de edad se constituye en el tiempo, y se testeó si la estructura poblacional se ajustaba a las predicciones realizadas anteriormente, es decir, que las crías están infectadas por más adultos que ninfas, y más hembras que machos. A pesar de la falta de información sobre la estructura poblacional de los piojos en las madres, la evidencia global resultó informativa y permitió entender mejor este excepcional sistema parásito-hospedador.

Materiales y métodos

Recolección de datos

El estudio se llevó a cabo durante la temporada reproductiva de 2009/10, en la Reserva Natural Punta León. En total se examinaron 72 crías con una edad ≤ 7 días. Todas las crías estaban con sus madres al momento de ser capturadas y su edad se determinó en función del grado de cicatrización del cordón umbilical (ver Introducción General). Las crías se capturaron aleatoriamente al principio (primer semana de enero, $n=21$), mediados (después del 14 de enero, $n=33$) y fines (última semana de enero) de la temporada reproductiva. La elección y definición de cada período respondió a cuestiones logísticas. La edad de las crías aumentó entre el primer y el tercer muestreo (Tabla 7.1) debido que al avanzar en la temporada reproductiva, disminuye la probabilidad de encontrar crías recién nacidas.

Los piojos se colectaron siguiendo la metodología explicada en la Introducción General, clasificándolos posteriormente según su estadio de maduración (Capítulo II).

Análisis estadístico

En primera instancia se determinó la influencia del momento de muestreo (principios, mediados o fines de la temporada reproductiva) sobre los parámetros de infección y la estructura poblacional de *A. microchir*. La prevalencia se comparó mediante un test Exacto de Fisher y la intensidad con un test de Kruskal- Wallis. Por otro lado, se utilizó un análisis permutacional de la covarianza (del inglés *permutational analysis of covariance*, PERMANCOVA) basado en matrices de similitud (Anderson *et al.*, 2008) para investigar el efecto del período de muestreo y la edad de la cría en la abundancia de cada uno de los estadios ninfales, machos y hembras. Las crías que no se encontraron infectadas al momento del muestreo no fueron incluidas en este análisis. Se definió al período de muestreo como un factor fijo y la edad de la cría como covariable. El incluir la edad de la cría en el análisis permite generar y analizar las interacciones entre “período de muestreo” y “edad”; de esta manera, se puede determinar si el patrón de reclutamiento difiere en los diferentes momentos de la temporada reproductiva. La interacción no resultó significativa (ver en los Resultados)

y se removió de los análisis posteriores para aumentar la sensibilidad del análisis y para permitir la correcta interpretación de los efectos que se analizan (Engqvist, 2005). Para construir los modelos, los datos en bruto de la intensidad de cada estadio se transformaron mediante su raíz cuadrada, a continuación se obtuvo la matriz de similitud de Bray- Curtis entre infracomunidades. Por medio de un procedimiento permutacional se obtuvieron los estadísticos de Pseudo-F; i.e. los grupos fueron aleatoriamente mezclados entre las diferentes unidades, y este procedimiento se repitió 10000 veces, de acuerdo al procedimiento descrito por Anderson *et al.* (2008) para modelos que incluyen covariables. Dado que se trataba de un diseño no balanceado, se utilizó la suma de cuadrados tipo III para asegurar la independencia de todos los efectos testeados (Anderson *et al.*, 2008).

El momento de muestreo (principios, mediados o fines de la temporada reproductiva) no afectó los parámetros de infección ni la estructura poblacional de *A. microchir* (ver Resultados). Por lo tanto, se utilizó la muestra en su conjunto para aumentar el poder estadístico en la detección de patrones de transmisión vertical. Se utilizó un ANOVA de una vía con contraste polinomial para examinar el patrón general de reclutamiento en relación a la edad de la cría. El número de *A. microchir* por cría (incluyendo a las crías que no presentaron infección) se utilizó como variable dependiente, aplicando una transformación $\log_{10}+1$. La edad se consideró un factor ordenado con 5 niveles: edades del 1 al 5, el quinto nivel incluyó también a las crías de 6 y 7 días de edad. (Tabla 6.1). El análisis de los residuales indicó que el modelo de ANOVA planteado fue satisfactorio.

Las comparaciones restantes se realizaron utilizando test no paramétricos dado que la distribución de las abundancias de todos los estadios no se ajustó a la distribución normal incluso aplicando transformaciones logarítmicas. Se utilizó un test de Friedman para comparar el número de ninfas 1, ninfas 2 y ninfas 3; realizando una comparación *post hoc* apareada (Conover, 1999). Este test se repitió utilizando sólo las crías con una edad menor o igual a 3 días para minimizar los cambios en el desarrollo de los estadios que se pueden dar en la cría. Tal como se determinó en el Capítulo III, se considera una duración mínima de 3 días para cada uno de los estadios ninfales. Por medio de un test de Wilcoxon se comparó el número de adultos vs.

ninfas y de hembras vs. machos. Se calculó también la diferencia entre el número de adultos y de ninfas, y entre hembras y machos, examinándose si estas diferencias cambiaban en función de la edad de la cría utilizando la correlación de Spearman.

Los parámetros de infección se estimaron siguiendo a Bush *et al.* 1997 y Rózsa *et al.* (2000). La prevalencia, definida como la frecuencia de ocurrencia, expresada como porcentaje, de una categoría determinada (ninfas 1 a 3, machos, hembras y total) en el total de la población de hospedadores. Los intervalos de confianza del 95% se estimaron por medio del Método Exacto de Sterne basado en una distribución binomial negativa (Reiczigel, 2003).

El análisis de PERMANCOVA se realizó con el paquete estadístico Permanova+ para Primer v.6 (Clarke y Warwick, 2001); los intervalos de confianza del 95% se calcularon con el programa libre Quantitative Parasitology v.3 (Reiczigel y Rózsa, 2005); los restantes análisis se realizaron con el SPSS v. 19. La significancia estadística se estableció en un valor $p < 0,05$. En el caso de las comparaciones múltiples, los valores de p se corrigieron por el mecanismo secuencial de Bonferroni (Rice, 1989).

105

Resultados

Los parámetros de infección de *A. microbir* en crías nacidas a comienzos, mediados y fines de la temporada reproductiva se muestran en la Tabla 6.1. No se encontraron diferencias en la prevalencia (Test de Fisher, valor $p = 0,743$) ni en la intensidad mediana (Test de Kruskal- Wallis, $\chi^2 = 4,642$; GdL= 2; valor $p = 0,098$). Como se mencionó en Materiales y Métodos, la heterogeneidad en la muestra se debió a la dificultad en encontrar crías recién nacidas a medida que transcurre la temporada reproductiva. Este incremento en la edad de la cría se dio en paralelo al aumento en la intensidad media de *A. microbir* (Tabla 6.1).

Tabla 6.1. Frecuencias de edad de crías de 1 a 7 días y edad media de las muestra de cría de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, analizadas a principios, mediados y fines de la temporada reproductiva en la colonia Punta León, Argentina durante el 2010 (ver detalles en el texto). También se presentan los parámetros de infección de *Antarctophthirus microchir* (entre paréntesis, los intervalos de confianza del 95%)

Período	n	Edad cría (días)							Parámetros de infección		
		Frecuencia							Media (D.S)	Prevalencia (95% I.C.)	Intensidad media (95% I.C.)
		1	2	3	4	5	6	7			
Principio	21	13	3	1	2	2	-	-	1,9 (1,4)	85,7 (64,6-96,0)	4,4 (2,8-7,1)
Mediados	33	11	5	6	4	6	-	1	2,8 (1,7)	75,8 (57,7-88,3)	9,0 (6,0-13,5)
Final	18	4	3	2	3	4	1	1	3,4 (1,9)	83,3 (58,6-95,3)	20,1 (10,0-35,9)
Total	72	28	11	9	9	12	1	2	2,7 (1,7)	80,6 (69,6-88,4)	10,5 (7,3-15,7)

En la Tabla 6.2 se observan los modelos de PERMANCOVA que evalúan cambios en la estructura poblacional de *A. microchir* entre los momentos de muestreo. En el modelo completo, la “edad de la cría” resultó un predictor significativo de los cambios en la estructura poblacional, pero ni el “momento de muestreo” ni la interacción “momento de muestreo x edad de la cría” resultaron significativas. No se detectaron cambios en la estructura poblacional en el modelo más simple que consideró a “momento de muestreo” como predictor (Tabla 6.2). Por lo tanto, se asumió que el “momento de muestreo” no influye sobre la estructura poblacional y se tomaron los datos en su conjunto para los análisis posteriores.

Diecisiete de las 28 crías de 1 día de edad se encontraron infectadas con *A. microchir* (prevalencia 60,7%; IC 95%= 40,9- 77,1). La intensidad media en estas 17 crías fue 2,2 (IC 95%= 1,5- 3,6). Tal como se observa en la Figura 6.3, la abundancia de *A. microchir* aumenta con la edad de la cría. Sin embargo, tanto los términos lineales ($F_{(1,67)} = 36,831$; valor $p < 0,0001$) como cuadráticos ($F_{(1,67)} = 36,831$; valor $p = 0,0001$)

del contraste polinomial fueron significativos, indicando que el reclutamiento aumenta en crías mayores a 3 días de edad pero luego se estabiliza (Figura 6.3).

Tabla 6.2. Modelos alternativos del Análisis de Covarianza Multivariado Permutacional (PERMANCOVA, del inglés *Permutational Multivariate Analysis of Covariance*) comparando el efecto del momento de muestreo (MM) y la edad de las crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, sobre el número de ninfas 1, 2 y 3, hembras y machos de *Antarctophthirus microchir*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Pseudo-F	Valor- <i>p</i>
Modelo 1				
MM	2	1087,9	0,276	0,9376
Edad	1	13547	6,880	0,0003
MMxEdad	2	1970,4	0,500	0,8091
Residual	52	102398,4		
Modelo 2				
MM	2	1076,8	0,279	0,0002
Edad	1	13364	6,915	0,9356
Residual	54			
Modelo 3				
MM	2	4105,6	0,959	0,4553
Residual	55	117727,5		

Al analizar las ninfas como un único grupo, su número en la muestra total de crías infectadas fue mayor que el de adultos (Figura 6.4). Estas diferencias resultaron significativas (Test de Wilcoxon, $Z = -1,999$, $n = 58$, valor $p = 0,0045$) pero inconsistentes entre las crías de diferente edad. En las crías de un día de edad, se encontraron más adultos que ninfas (Figura 6.4), siendo esta diferencia altamente significativa (Test de Wilcoxon, $Z = 2,675$, $n = 17$, valor $p = 0,0007$). Además, esta diferencia entre el número de ninfas y el de adultos incrementó significativamente con la edad (Correlación de Spearman, $r = 0,457$, $n = 58$, valor $p < 0,001$; Figura 6.4).

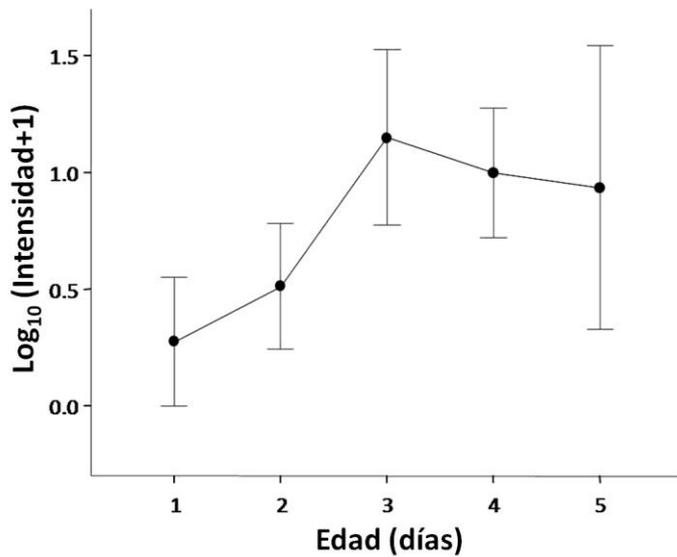


Figura 6.3- Valores transformados de las abundancias de *Antarctophthirus microchir* en crías de lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, de 1 a 5 días de edad. Las barras verticales indican los intervalos de confianza del 95%.

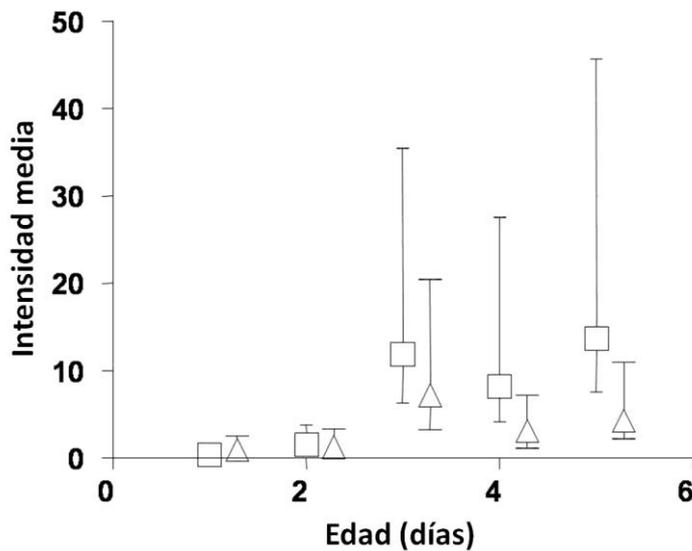


Figura 6.4- Abundancia media de adultos y ninfas de *Antarctophthirus microchir* en crías lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, de 1 a 5 días de edad. Triángulo: adultos; cuadrado: ninfas (N1 a N3). Las barras verticales indican los intervalos de confianza del 95%.

Se encontraron diferencias significativas en el número de N1, N2, N3 y adultos de *A. microchir* en las crías infectadas (Test de Friedman, $\chi^2 = 43,601$, GdL= 3, n= 58, valor $p \ll 0,001$). La comparación post hoc reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los adultos y los restantes estadios, y entre las N2 y N3, con respecto a las N1. Se llegó al mismo resultado cuando se consideraron sólo las crías con 3 o menos días de edad (n=36). El patrón de reclutamiento en función de la edad de cada estadio de desarrollo en las crías con 3 o menos días de edad indicó que (i) las diferencias entre los estadios en general se conservaron y (ii) este patrón de

reclutamiento fue similar fue similar en todos los estadios, con excepción de las N1, que fueron recluidas en menor cantidad (Figura 6.5).

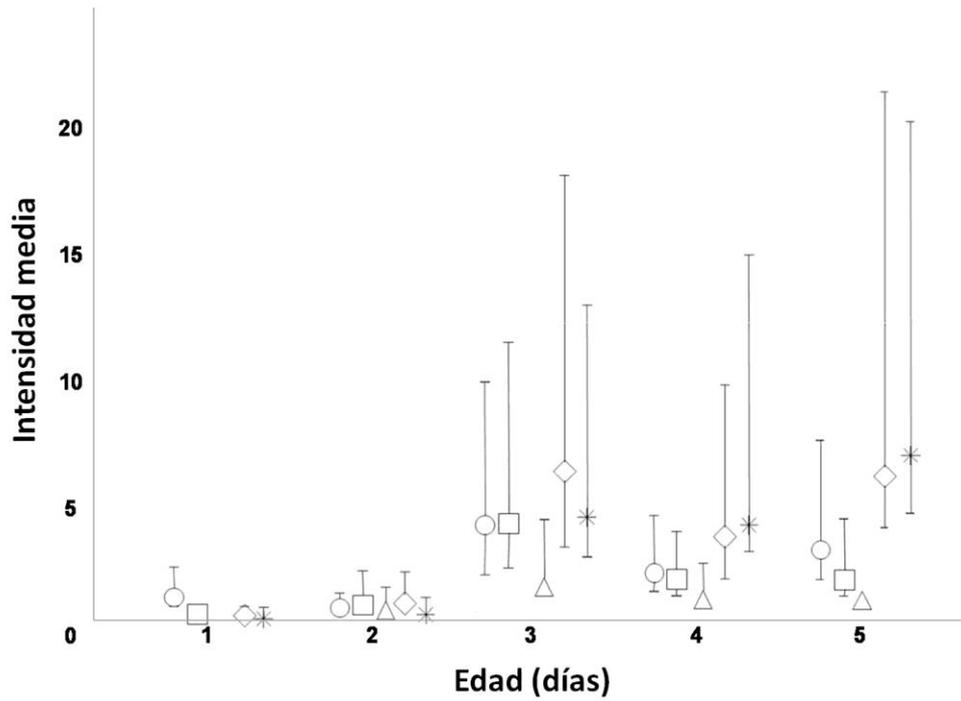


Figura 6.5- Abundancia media de *Antarctophthirus microchir* en crías lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, de 1 a 5 días de edad. Círculo: hembras; cuadrado: machos; triángulo: ninfas 1; rombo: ninfas 2; asterisco: ninfas 3. Las barras verticales indican los intervalos de confianza del 95%.

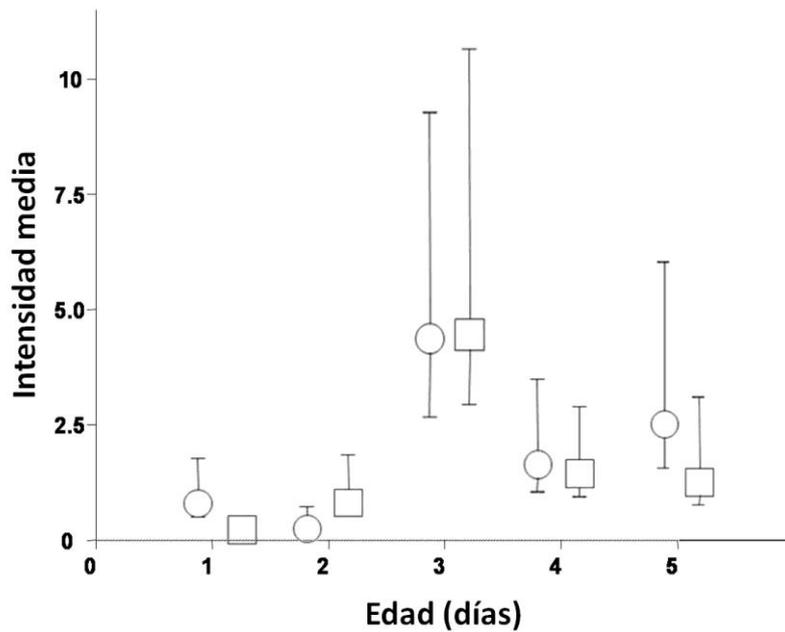


Figura 6.6- Abundancia media de adultos de *Antarctophthirus microchir* en crías lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens*, de 1 a 5 días de edad. Triángulo: hembras; cuadrados, machos. Las barras verticales indican los intervalos de confianza del 95%.

En las crías que se encontraron infectadas con piojos adultos, el número de hembras fue mayor al de machos (Test de Wilcoxon, $Z= 2,076$, $n= 52$, valor $p= 0,035$, Figura 6.6). Estas diferencias no fueron consistentes en crías de diferente edad (Figura 6.6), pero se conservó claramente en las crías de un día de edad (Test de Wilcoxon, $Z= 2,639$, $n= 16$, valor $p= 0,008$). Esta diferencia entre el número de hembras y de machos no cambió en función de la edad de la cría (Correlación de Spearman, $r= -0,039$, $n= 52$, valor $p= 0,785$, Figura 6.6).

Discusión

Los estudios previos que reportan información sobre los patrones de transmisión de los equinoftridos se basaron en un número reducido de focas adultas de vida libre, en cautiverio o retenidas, y/o cachorros retenidos, que fueron examinados por largos períodos de tiempo, i.e. 45 a 60 minutos (Murray y Nicholls, 1965; Murray *et al.*, 1965; Kim 1972, 1975). El presente estudio se basa en un gran número de hospedadores, estudiados bajo condiciones naturales; lo cual por un lado representa un beneficio pero por otro limita el tiempo de manipulación de los animales. En trabajos con pinnípedos en condiciones naturales, se recomienda que el tiempo de manipulación sea lo más breve posible (Gales *et al.*, 20009), lo cual impide colectar la población total de piojos de un individuo. El uso de censos parciales de la población es comúnmente utilizado en estudios que involucran hospedadores de gran tamaño o delicados, aún así, permite realizar inferencias válidas sobre la estructura poblacional y la dinámica de transmisión en muchos sistemas piojo-hospedador (por ejemplo, Thompson *et al.*, 1998 con piojos de focas y Darolova *et al.*, 2001 con piojos de abejarucos). En el caso de las crías de lobo marino, como se mencionó en los capítulos anteriores, la técnica de peinado demostró ser un método útil tanto en los estudios de dinámica poblacional (Capítulo III), selección de hábitat (Capítulo V) y patrones de transmisión, como se reflejó en los resultados del presente capítulo. Recientemente, Gallardo *et al.* (2013) encontraron diferencias en la eficacia en la remoción de los diferentes estadios de *Pediculus humanus capitis* en función de la marca comercial de los peines utilizados. Sin embargo, consideramos que el peinado es una técnica confiable en relación a los objetivos del presente Capítulo, dado que la distancia entre los dientes de los peines utilizados es lo suficientemente pequeña (300

μm) para minimizar las diferencias en el muestreo de los diferentes estadios de desarrollo (el largo y ancho promedio de las ninfas 1 es 980 y 450 μm , respectivamente, ver Capítulo II).

Como es sabido, la densidad de hospedadores afecta positivamente la tasa de transmisión de los parásitos de transmisión directa (ver Anderson y May, 1978; May y Anderson, 1978; Arneberg *et al.*, 1998).

En el caso de los piojos, se ha demostrado que este factor actúa en varias escalas espaciales. Por ejemplo, Rukke *et al.* (2011) encontraron que, en Noruega, la prevalencia de piojos es significativamente mayor en aquellos municipios más densamente poblados. En una escala más pequeña, Hoi *et al.* (1998) reportaron un incremento en la tasa de infección de *Meropoeus meropis* en los abejarucos a medida que aumenta el tamaño de la colonia. En general se considera que este patrón se debe al aumento del contacto físico entre los individuos a medida que aumenta el tamaño de la población. Dado que las colonias del lobo marino de un pelo incrementan su tamaño hasta 10 veces a lo largo del período reproductivo (Campagna, 1985; Campagna y Le Boeuf, 1988a), es esperable que aumenten las oportunidades de transmisión horizontal de *A. microchir* a medida que se avanza en la temporada reproductiva, como consecuencia de un mayor contacto físico entre los individuos. Sin embargo, los resultados indicaron que este proceso potencial no tiene un efecto significativo en los patrones de transmisión vertical temprana. Las crías con una edad igual o menor a los 7 días, nacidas a diferentes momentos de la temporada reproductiva presentaron infecciones de piojos similares en tamaño y estructura poblacional. Esto podría en parte explicarse por el hecho de que las crías tan pequeñas pasan la mayor parte del tiempo en contacto cercano con su madre, presentando poca movilidad durante el período de amamantamiento (Rivas y Trimble, 2009), lo cual reduce la posibilidad de contacto con otros individuos de la colonia.

Los resultados indican que la transmisión madre- cría es rápida; alrededor del 60% de las crías de un día de edad se encontraba infectadas con *A. microchir*. Es importante destacar que esta cifra es conservativa porque no se analizó un análisis total de la población. Kim (1972, 1975) reportó, bajo condiciones controladas, que la infección de *A. callorhini* en crías de lobo marino de dos pelos del norte, *Callorhinus*

ursinus, se daba a las siete horas de nacidas las crías (i.e., tan pronto como la cría se secaba de los fluidos propios del parto).

En cualquier caso, el reclutamiento de *A. microchir* en crías de hasta una semana de edad se describe mejor por una tendencia curvilínea, con el aumento máximo ocurriendo en los primeros 3 días. Sorprendentemente, hay muy pocos estudios realizados en piojos terrestres para poder comparar la transmisión vertical. Los estudios realizados con piojos de aves altriciales no son comparables ya que las infecciones suelen demorarse hasta que el plumaje de los pichones se desarrolla (Clayton y Tompkins, 1994; Lee y Clayton, 1995). Hasta dónde sabemos, un único trabajo midió la velocidad de transmisión de un piojo de mamífero. Takano-Lee *et al.* (2005) utilizaron “cabezas” humanas artificiales conectadas por un puente de pelo y midieron la transmisión de piojos de cabezas infectadas a cabezas no infectadas. Incluso a bajas densidades de piojos ($n \leq 30$), el movimiento entre las cabezas se detectó a los 5 minutos de iniciada la prueba, y fue evidente a la hora de conectadas las cabezas. Esto sugeriría que la tasa de transmisión observada en *A. microchir* y en otros equinoftíridos no es particularmente rápida.

Ni los sexos ni los estadios se encontraron equitativamente representados en las poblaciones de *A. microchir* en crías con una edad menor o igual a los siete días, las cuales se componen exclusivamente del reclutamiento (ver Capítulo III). Como se mencionara anteriormente, tres hipótesis no auto-excluyentes podrían explicar los patrones de transmisión vertical observados: el reclutamiento refleja la estructura poblacional de *A. microchir* en las hembras de lobo marino de un pelo (Hipótesis 1, H1); la habilidad para desplazarse aumenta en los estadios más desarrollados (H2); y la selección natural favorece la transmisión de adultos, especialmente de hembras, porque acumulan de esta manera mayor *fitness* (H3). A continuación se discuten los patrones de reclutamiento a la luz de estas hipótesis.

El número de ninfas 1 fue significativamente menor que el de cualquier otro estadio, particularmente en crías más viejas. Este patrón es compatible con las hipótesis 2 y 3: las ninfas 1 posiblemente tenga menor capacidad de dispersión como consecuencia de la poca maduración de su exoesqueleto y su poco valor reproductivo (y por lo tanto, menos presión de selección para infectar crías). Sin embargo, las ninfas

podrían ser comparativamente escasas en las hembras de lobo marino. Las hembras preñadas llegan a la playa luego de un largo viaje de alimentación, por lo cual no tendrían huevos viables de *A. microchir* de los cuales pudieran reclutarse nuevas ninfas 1. Como se describió el Capítulo III las ninfas 1 se ven afectadas en mayor medida que los restantes estadios por las inmersiones. Consecuentemente, es probable que las hembras de lobo marino de un pelo se encuentren infectadas principalmente por ninfas 2 y 3 y adultos al momento de arribar a la playa a dar a luz. En otras especies de equinoftridos también se ha descripto la ausencia o escasez de ninfas 1 en crías de lobo marino de dos pelos del norte y en elefantes marinos del sur (Murray y Nicholls, 1965; Murray *et al.*, 1965; Kim, 1972, 1975). Estas observaciones sugieren que al menos alguno de los procesos mencionados opera en estos sistemas piojo-hospedador.

La abundancia de ninfas fue mayor que la de adultos, incrementándose esta diferencia con la edad de la cría; sin embargo, las crías de un día de edad estuvieron infectadas en mayor medida por adultos. Éste patrón no puede ser explicado por una única hipótesis, sino por una combinación de ellas: los adultos al tener una capacidad de dispersión mayor que las ninfas (H1 y/o H2) aparecerían primero en las crías, pero las ninfas rápidamente los superan en número en crías de mayor edad, dado que su número en las madres es mayor. Obviamente, esto último constituye una hipótesis ad hoc que no se soporta consistentemente con la información disponible de otros equinoftridos: *A. callorhini* en los lobos de dos pelos del norte se transfiere principalmente como ninfa 2 (Kim, 1972, 1975), pero *A. ogmorhini* en crías de foca de Weddell (Murray *et al.*, 1965), *L. macrorhini* en el elefante marino del sur (Murray y Nicholls, 1965) y *P. fluctus* en el lobo marino de dos pelos del norte (Kim, 1972, 1975) serían transmitidos principalmente como adultos. Ninguna de las hipótesis planteadas puede, por si sola, explicar el patrón general hallado en *A. microchir*. Sin embargo, parecería posible que los piojos adultos, que poseen mayor capacidad de dispersión que las ninfas (en función de la H1 y/o H2), aparezcan primero en las crías, con las ninfas superando el número de adultos en crías de mayor edad, dado que su número es mayor en las madres. Se debe tener en cuenta que la última hipótesis asume que la

probabilidad de transmisión de las madres a sus cachorros de cada estadio de desarrollo está influenciado positivamente por su densidad en las madres.

Finalmente, se observó una abundancia mayor de hembras que de machos, hecho compatible con las H1 y H3; H2 no predice nada específico al respecto. En relación a la H1, Marshall (1981) en su estudio sobre las proporciones de sexos en insectos, encontró que el 62% de 359 poblaciones analizadas presentaron una desviación hacia las hembras, el 7% hacia los machos y el 30% no difirieron significativamente de la unidad. Es importante resaltar que la proporción de sexos en piojos suele tener una tendencia al error por muestreo, particularmente cuando las muestras son pequeñas (Szczykutowicz *et al.*, 2006). Aparentemente, las hembras adultas de las especies de insectos parásitas tienen por lo general una mayor esperanza de vida que los machos (Marshall, 1981), esto explicaría por qué la mayoría de las poblaciones de piojos tienen un sesgo hacia las hembras. La información disponible sobre la proporción de sexos en equinoftíridos ofrece evidencia contrastante. En hospedadores adultos, la proporción de sexos no difiere del 1:1 en *A. callorhini* pero se encuentra levemente sesgado a las hembras en *P. fluctus* (Kim, 1972). En el caso de *A. microchir* resulta interesante el hecho de que las diferencias entre machos y hembras varían en crías de diferente edad; las crías entre uno y cuatro días de edad presentaron las mayores diferencias entre sexos. Aparentemente, las hembras infectarían a las crías en mayor medida que los machos desde su nacimiento, lo cual concuerda con las predicciones de la H3. Nótese, sin embargo, que un requisito importante de esta hipótesis es que los piojos hembra son capaces de reconocer a las crías como hospedadores. Esto no parece ser algo irreal en el caso de los ectoparásitos artrópodos. Por ejemplo, Christie *et al.* (2007) demostraron experimentalmente que una especie de ácaro de murciélago podía discriminar entre hospedadores machos y hembras, siendo éstas últimas preferentemente infectadas por ser el sexo más rentable (Khokhlova *et al.*, 2011).

En resumen, las crías de lobo marino de un pelo recién nacidas (edad menor o igual a los siete días) se contagian la mayor cantidad de *A. microchir* de sus madres, los resultados del presente capítulo sugieren que este proceso no se vería afectado por el momento de nacimiento a lo largo de la temporada reproductiva del hospedador.

Por otra parte, los patrones de transmisión vertical descritos son compatibles con las tres hipótesis planteadas, pero la evidencia sugiere que las fuerzas selectivas que modelan las estrategias de transmisión en especies con restricciones en su ciclo reproductivo no pueden ser subestimadas. La estabilidad en el tiempo a lo largo del tiempo de las poblaciones de *A. microchir* depende de la transmisión vertical, dado que los piojos poseen un tiempo muy acotado para reproducirse (Capítulo III). Por lo tanto, los estadios que presentan un mayor valor reproductivo deberían ser transmitidos a las crías en mayor medida. Esta conclusión concuerda con la limitada evidencia obtenida de otros sistemas piojo-hospedador que son particularmente susceptibles a la hora de medir la transmisión vertical (generalmente aves y sus piojos masticadores), lo cual confirma la versatilidad adaptativa de los piojos de acuerdo a la ecología de sus hospedadores (Lee y Clayton, 1995; Darolova *et al.*, 2001; Brooke, 2010). Para poder comprender completamente este proceso es fundamental la información sobre la estructura poblacional de las hembras preñadas. Es por este motivo que revisar las carcasas de los animales encontrados en buen estado puede brindar información invaluable al respecto (Aznar *et al.*, 2010).

Capítulo VII

Conclusiones generales



El objetivo principal de la presente tesis fue estudiar el proceso coevolutivo entre *Antarctophthirus microchir* (Trouessart y Neumann, 1888) y el lobo marino de un pelo, *Otaria flavescens* en Patagonia. La tesis fue planteada en base a tres ejes principales: la resolución de la taxonomía de la especie en estudio, su dinámica poblacional y las principales adaptaciones, morfológicas y ecológicas. Los resultados obtenidos aportan evidencias al proceso adaptativo de *A. microchir* en función de los hábitos acuáticos de su hospedador. Como así también, la estrecha relación entre el comportamiento y la biología del parásito con la de su hospedador.

En primer lugar, se realizó la redescrición de los adultos de *A. microchir*. Se determinaron caracteres diagnósticos de la especie, como la presencia de un “flequillo” de setas en la parte dorsal de la cabeza, presente solo en *A. trichechi* y *A. callorbini*. Sin embargo, *A. trichechi* se caracteriza por una prominente proboscis provista de grandes ganchos, y *A. callorbini* presenta menos escamas abdominales, que difieren en forma y tamaño. Otra característica propia de *A. microchir* es el patrón uniforme de escamas ovoides y las espinas con característicos surcos longitudinales en su superficie. El primer estadio ninfal difiere de los restantes por la ausencia de escamas y porque el tórax no posee espinas ventrales ni pelos. Las ninfas 2 y 3 pueden distinguirse entre sí por la disposición de las apófisis occipitales. De esta manera, esta tesis contribuyó al conocimiento de la morfología de adultos de *A. microchir*, la descripción inédita de sus estadios ninfales y, luego de la exhaustiva búsqueda del holotipo, la determinación de la especie como parásito de *O. flavescens*.

Por primera vez para la especie se describieron los estadios ninfales. Las ninfas 1 se distinguen de los otros estadios ninfales por tener apófisis occipitales y fragmas torácicos más cortos, la ausencia de escamas y por no tener espinas ni pelos en el tórax. Las ninfas 2 y ninfas 3 son distinguibles entre sí por las apófisis occipitales, que son paralelas en las ninfas 2 y convergentes en el ápice en las ninfas 3.

Por otra parte, se evidenció el carácter críptico de la especie, imposibilitando diferenciarla por medio de caracteres morfológicos de *A. microchir* proveniente de otras especies hospedadoras, i.e. lobo marino de Steller, lobo marino de Australia, de Nueva Zelanda y de California. Quedará por resolver mediante estudios moleculares

si efectivamente la misma especie de piojo infecta a estas 5 especies de lobos marinos, o si en realidad, constituye un complejo de especies crípticas.

El análisis de la dinámica poblacional de la especie brindó el contexto necesario para entender los procesos adaptativos abordados en los capítulos siguientes. Se modeló el crecimiento poblacional de *A. microchir* en base a valores realísticos de supervivencia, duración de los estadios y fecundidad. Se estableció una duración del ciclo entre 18 a 23 días, se requieren 9 días para que se desarrollen los huevos y un mínimo de 8 días para que se desarrollen los tres estadios ninfales.

Los resultados evidenciaron las restricciones temporales de *A. microchir* para completar exitosamente su ciclo reproductivo. El hecho que los huevos de una especie parásita infectando hospedadores anfibios no sobrevivan a las inmersiones, condiciona su ciclo a los períodos en tierra de sus hospedadores. El tiempo generacional estimado fue mayor a lo ponderado previamente, lo cual restringiría la posibilidad de producir más de dos generaciones. Probablemente, la estrategia adoptada por esta especie consistiría en producir individuos más grandes, que produzcan mayor número de huevos, aumentando así su fecundidad. Futuros estudios comparando las estrategias de otras especies de equinofúridos infectando hospedadores con diferentes historias de vida, permitirán dilucidar la respuesta evolutiva a este *trade-off* a partir de la comparación con otros Anoplura.

La utilización de microscopía electrónica de barrido permitió analizar la ultraestructura de todos los estadios del ciclo de vida de la especie, permitiendo identificar muchas de las estructuras corporales de estos organismos que permitieron su adaptación al medio marino. Los huevos se hallan cementados individualmente a un único pelo, mostrando una superficie lisa, con el opérculo distintivo y elevado, sin ornamentaciones, apuntando hacia el extremo del pelo. Tanto la morfología del huevo como el patrón de oviposición pueden ser utilizados como caracteres taxonómicos y comportamentales, respectivamente, propios de cada género. Las ninfas 1 se caracterizan por la ausencia de escamas. Sus patas son proporcionalmente más largas en relación al largo del cuerpo si se compara con los restantes estadios ninfales. En el estadio ninfal 2, aparecen las escamas, manteniendo el mismo patrón que se observa en los adultos. A medida que se avanza en la ontogenia, los pelos y las escamas se

vuelven, respectivamente, más largos y densos, tal y como se observan ya las ninfas 3. En el tercer estadio ninfal el patrón de quetotaxia y las principales características son similares a las observadas en adultos. Este patrón en el desarrollo ontogenético de la quetotaxia concuerda con lo descrito previamente en otras especies de la familia.

El patrón de quetotaxia es una de las características morfológicas más distintivas de la familia, de lo cual se deduce que podría estar relacionado con su estilo de vida acuático. Sin embargo, la función precisa de estas adaptaciones morfológicas se encuentra aún en discusión. En los adultos resulta notable la ausencia de placas torácicas y esternales, estando el cuerpo completamente cubierto de escamas. La presencia de escamas es una característica propia del género *Antarctophthirus*, siendo su función específica un tema en discusión. Las escamas de *A. microchir* recubren completamente el abdomen, distribuyéndose siguiendo un patrón imbricado. Los espiráculos se encuentran modificados en una estructura membranosa; no se observan escamas alrededor de ellos. Se ha propuesto que su función estaría relacionada a la respiración, actuando a modo de plastrón, reteniendo aire entre ellas. Esta posible función implica necesariamente que exista respiración cutánea cuando los piojos se encuentran expuestos a condiciones acuáticas, lo cual no se ha descrito en ninguna de las especies de la familia. Por otro lado, las escamas también podrían cumplir una función de protección de la cutícula cuando el cuerpo es sometido a alta presión.

El patrón de distribución de espinas resultó conservativo a lo largo de la ontogenia, desde las ninfas 1 hasta los adultos. Este hecho, considerando también la distribución, tamaño y largo de las espinas, sugiere una función sensitiva. Sin embargo, se ha sugerido también que las espinas podrían cumplir una función de protección contra el frío reteniendo el sebo impermeable producido por el hospedador. En cuanto a los pelos, por un lado es probable que tengan una función sensorial y por otro, son de valor taxonómico dado que su número y distribución son especie-específicos.

Se describió por primera vez para un piojo anopluro la selección de hábitat de cada uno de sus estadios, lo cual reveló una selección diferencial que respondería a los requerimientos fisiológicos de cada uno de ellos, los cuáles varían en función del

proceso que se considere (oviposición, morfogénesis, eclosión o desarrollo ontogenético). *A. microchir* preferiría la región ventral del cuerpo del hospedador para su desarrollo y cópula, y el área dorsal para la oviposición. Sin embargo, queda pendiente dilucidar a cuál de los múltiples factores involucrados responde este patrón.

El patrón de selección de hábitat descrito para *A. microchir*, difiere del de los equinoftridos que infestan lobos finos y focas. En fócidos el lugar preferido por los piojos son las aletas, mientras que en lobos finos la selección se da en función del tipo de pelaje. La selección de hábitat de *A. microchir* varía según el estadio de desarrollo considerado. Resulta probable que la combinación de un ambiente seco y caluroso, más la constante influencia de la marea sean los factores que condicionan en mayor medida la selección de hábitat de *A. microchir*. Sin embargo, se necesita mayor información para fundamentar esta hipótesis. Más allá de las causas que condicionan este comportamiento, resulta evidente que los equinoftridos constituyen un fascinante ejemplo de la capacidad de algunos parásitos para adaptarse a una gran variedad de escenarios ecológicos.

Por último, se analizó la transmisión vertical de *A. microchir*, como proceso clave en el ciclo reproductivo de la especie, del cual depende el inicio de cada uno de los ciclos anuales y su perpetuación en el tiempo. Las crías de lobo marino de un pelo recién nacidas se contagian la mayor cantidad de *A. microchir* de sus madres, los resultados del presente capítulo sugieren que este proceso no se vería afectado por el momento de nacimiento a lo largo de la temporada reproductiva del hospedador.

Tres hipótesis no auto-excluyentes podrían explicar los patrones de transmisión vertical observados: el reclutamiento refleja la estructura poblacional de *A. microchir* en las hembras de lobo marino de un pelo; la habilidad para desplazarse aumenta en los estadios más desarrollados; y la selección natural favorece la transmisión de adultos, especialmente de hembras, porque acumulan de esta manera mayor *fitness*. Los resultados obtenidos, son compatibles con las tres hipótesis planteadas, pero la evidencia sugiere que las fuerzas selectivas que modelan las estrategias de transmisión en especies con restricciones en su ciclo reproductivo no pueden ser subestimadas. La estabilidad en el tiempo a lo largo del tiempo de las poblaciones de *A. microchir* depende de la transmisión vertical, dado que los piojos

poseen un tiempo muy acotado para reproducirse. Por lo tanto, los estadios que presentan un mayor valor reproductivo deberían ser transmitidos a las crías en mayor medida.

La información presentada en esta tesis contribuye además al conocimiento de la ecología de la especie, brindando una línea de base para el estudio de otras especies de equinoftridos infectando hospedadores con diferentes historias de vida. Estos estudios permitirán interpretar aún mejor la coadaptación entre los piojos de la familia Echinophthiriidae y sus hospedadores anfibios.

Finalmente, se evidenció la versatilidad de estos organismos para adaptarse a una gran variedad de escenarios ecológicos. Por otra parte, la información sobre los procesos coadaptativos será en un futuro contemplada a la luz de los estudios moleculares, para tener una visión filogenética que permita reconstruir la historia coevolutiva de este particular grupo de organismos.

Referencias bibliográficas

- Anderson, M.J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**, 32–46.
- Anderson, M.J., Gorley, R.N. y Clarke, K.R. 2008. PERMANOVA for PRIMER: guide to software and statistical methods. PRIMER–E Ltd., Plymouth, United Kingdom, 214 pp.
- Anderson, R.M. y May, R.M. 1978. Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory process. *Journal of Animal Ecology* **47**, 219–249.
- Arneberg, P., Skorping, A., Grenfell, B. y Read, A.F. 1998. Host densities as determinants of abundance in parasite communities. *Proceedings of the Royal Society of London B* **265**, 1283–1289.
- Aznar, F.J., Fernández, M. y Balbuena, J.A. 2010. Why we should care about the parasite fauna of cetaceans: a plea for integrative studies. pp. 811–820 in C.A. Murray (ed.), *Whales and Dolphins*, Nova Science Publishers, Inc., New York.
- Barker, S.C., Whiting, M., Johnson, K.P. y Murell, A. 2003. Phylogeny of the lice (Insecta, Phthiraptera) inferred from small subunit rRNA. *Zoologica Scripta* **32**, 407–414.
- Berman, E.L., Carter, H.W. y Brodtkin, R. 1980. Scanning electron microscopy and light microscopy of the crab louse (*Pthirus pubis*) egg. *Scanning Electron Microscopy* **3**, 517–522.
- Berta, A. 2006. Musculoskeletal system and locomotion. In: *Marine Mammals: evolutionary biology* (Ed. by Berta, A., Sumich, J.L. and Kovacs, K.M.), pp. 165–212. Academic Press, San Diego, CA.
- Berta, A. 2009. Pinniped Evolution, in: *Encyclopedia of Marine Mammals*. (Ed. by Perrin, W. F., Würsig, B. and Thewissen, J.G.M), pp. 861–868 Academic Press, San Diego, CA.

- Brooke, M. de L. 2010. Vertical transmission of feather lice between adult blackbirds *Turdus merula* and their nestlings: a lousy perspective. *Journal of Parasitology* **96**, 1076-1080.
- Bowen, G.J. 2007. Palaeoclimate: When the world turned cold. *Nature* **445**, 607-608.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. y Shostak, A.W. 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology* **83**, 575-583.
- Bush, A.O., Fernández, J.C., Esch, G.W. y Seed, J.R. 2001. *Parasitism: the diversity and ecology of animal parasites*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Campagna, C. 1985. The breeding cycle of the southern sea lion, *Otaria byronia*. *Marine Mammal Science* **3**, 201-218.
- Campagna, C. y Le Boeuf, B.J. 1988a. Reproductive behaviour of Southern sea lions. *Behaviour* **104**, 233-261.
- Campagna, C. y Le Boeuf, B.J. 1988b. Thermoregulatory behaviour of Southern sea lions and its effect on mating strategies *Behaviour* **107**, 72-90.
- Campagna, C., Bisioli, C., Quintana, F., Perez, F. y Avila, A. 1992. Group breeding in sea lions: pups survive better in colonies. *Animal Behaviour* **43**, 541-548.
- Campagna, C., Werner, R., Karesh, W., Marín, M.R., Koontz, F., Cook, R. y Koontz, C. 2001. Movements and location at sea of South American sea lion (*Otaria flavescens*). *Journal of Zoology* **257**, 205-220.
- Cappozzo, H.L. y Perrin, W.F. 2009. South American sea lion (*Otaria flavescens*). In *Encyclopedia of Marine Mammals. Second Edition*. (eds. Perrin, W. F., Würsig, B. and Thewissen, J. G. M.), pp. 1076-1079. Academic Press/ Elsevier Inc., San Diego.
- Carrara, I.S. 1952. Lobos marinos, pingüinos y guaneras de las costas del litoral marítimo e islas adyacentes de la República Argentina. Ministerio de Educación, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

- Castro, D.C., Romero, M.D. y Dreon, M. 2002. Ultraestructure of *Proechinophthirus zumpti* (Anoplura, Echinophthiriidae) by scanning electron microscopy. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* **97**, 813-818.
- Chaudhuri, R.P. y Kumar, P. 1961. The life history and habits of the buffalo louse, *Haematopinus tuberculatus* (Burmeister) Lucas. *Indian Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry* **31**, 275–287.
- Christe, P., Glaizot, O., Evanno, G., Bruyndonckx, N., Devevey, G., Yannic, G., Patthey, P., Maeder, A., Vogel, P. y Arlettaz, R. 2007. Host sex and ectoparasites choice: preference for, and higher survival on female hosts. *Journal of Animal Ecology* **76**, 703-710.
- Clarke, K.R. y Warwick, R.M. (2001) Change in Marine Communities: An Approach to Statistical Analysis and Interpretation. 2nd edition: PRIMER-E, Plymouth, UK.
- Clayton, D.H. y Tompkins, D.M. 1994. Ectoparasite virulence is linked to mode of transmission. *Proceedings of the Royal Society of London* **256**, 211-217.
- Cleveland, W.S. 1979. Robust locally weighted regression and smoothing scatter-. Plots. *Journal of the American Statistical Association* **74**, 829-836.
- Cleveland, W.S. y Devlin, S.J. 1988. Locally weighted regression: an approach to regression analysis by local fitting. *Journal of the American Statistical Association* **83**, 596–610.
- Conover, W.J. 1999. *Practical nonparametric statistics*. 3rd ed. John Wiley and Sons, New York.
- Craufurd- Benson, H.J. 1941a. The cattle lice of Great Britain. Part I. Biology, with special reference to *Haematopinus eurysternus*. *Parasitology* **33**, 331-342.
- Craufurd- Benson, H.J. 1941b. The cattle lice of Great Britain. Part II. Lice populations. *Parasitology* **33**, 343-358.
- Crespo, E.A. 1988. Dinámica poblacional del lobo marino del sur *Otaria flavescens* (Shaw, 1800), en el norte del litoral patagónico. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.

- Crespo, E.A., y Pedraza, S.N. 1991. Estado actual y tendencia de la población de lobos marinos de un pelo (*Otaria flavescens*) en el litoral norpatagónico. *Ecología Austral* **1**, 87-95.
- Crespo, E.A., Pedraza, S., Dans, S., García, N., Koen Alonso, M., Reyes, L. y Coscarella, M. 1997. Interacciones operacionales entre mamíferos marinos y pesquerías de arrastre en el norte y centro de Patagonia. Informes técnicos del plan de manejo integrado de la zona costera patagónica. *Fundación Patagonia Natural* **30**, 1-28.
- Crespo, E.A., Dans, S.L., Svendsen, G.M., Kowalik, A. y Berón Vera, B. 2002. Cambios estructurales y sociales en Punta León, litoral norte de Patagonia, en una población de lobos marinos en crecimiento. En: *10° RT y 4° Congreso SOLAMAC*. SOLAMAC, Valdivia, Chile. Libro de Resúmenes (ed. Siciliano, S).
- Crespo, E.A., Oliva, D., Dans, S.L. y Sepúlveda, M. (Eds.). 2012. Estado de situación del lobo marino común en su área de distribución. Current situation of the South American Sea Lion along the distribution range. Universidad de Valparaíso.
- Crovetto, E.A., Franjola, R. y Silva, R. 2008. Primer registro en Chile de *Antarctophthirus microchir* (Anoplura) en lobo marino común (*Otaria flavescens*). *Archivos de Medicina Veterinaria* **40**, 305-308.
- Cruickshank, R.H., Johnson, K.P., Smith, V.S., Adams, R.J, Clayotn, D.H. y Page, R.D.M. 2001. Phylogenetic analysis of partial sequences of elongation factor 1 α identifies major groups of lice (Insecta, Phthiraptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **19**, 202-215.
- Damastes, J.W. y Hafner, M.S. 1993. Cospeciation of pocket gophers (*Geomys*) and their chewing lice (*Geomydoecus*). *Journal of Mammology* **74**, 521-530.
- Dans, S.L., Crespo, E.A., Pedraza, S.N., González, R. y García, N. 1996. Estructura y tendencia de los apostaderos de lobos marinos de un pelo (*Otaria flavescens*) en el norte de Patagonia. *Informes Técnicos del Plan de Manejo Integrado de la Zona*

Costera Patagónica - Fundación Patagonia Natural (Puerto Madryn, Argentina) **13**, 1-17.

Dans, S.L., Crespo, E.A., Pedraza, S.N. y Koen Alonso, M. 2004. Recovery of the South American sea lion population (*Otaria flavescens*) in northern Patagonia. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **61**, 1681-1690.

Darolova, A., Hoi, H., Kristofik, J. y Hoi, C. 2001. Horizontal and vertical ectoparasite transmission of three species of malophaga, and individual variation in European bee-eaters (*Merops apiaster*). *Journal of Parasitology* **87**, 256–262.

de Meeûs, T., Michalakis, Y. y Renaud, F. 1998. Santa Rosalia revisited: or why are there so many kinds of parasites in “The Garden of Earthly Delights?”. *Parasitology Today* **14**, 10-13.

Demastes, J.W., Hafner, M.S., Hafner, D.J. y Spradling, T.A. 1998. Pocket gophers and chewing lice: a test of the maternal transmission hypothesis. *Molecular Ecology* **7**, 1065-1069.

Drago, M., Cardona, L., Crespo, E.A. y Aguilar, A. 2009a. Ontogenic dietary changes in South American sea lions. *Journal of Zoology* **279**, 251-261

Drago, M., Crespo, E.A., Aguilar, A., Cardona, L., García, N., Dans, S.L. y Goodall, N. 2009b. Historic diet change of the South American sea lion in Patagonia as revealed by isotopic analysis. *Marine Ecology Progress Series* **384**, 273-286

Drago, M., Cardona, L., Aguilar, A., Crespo, E.A., Ameghino, S. y García, N. 2009c. Diet of lactating South American sea lions, as inferred from stable isotopes, influences pup growth. *Marine Mammal Science* **26**, 309-323.

Durden, L.A. y Musser, G.G. 1994. The sucking lice (Insecta, Anoplura) of the world: a taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographical distributions. *Bulletin of the American Museum of Natural History* **218**, 1-90.

Efron, B. 2005. Bayesians, frequentists, and scientists. *Journal of the American Statistical Association* **100**, 1-5.

- Eichler, W. 1942. Die Entfaltungsregel und andere Gesetzmäßigkeiten in den parasitogenetischen Beziehungen der Mallophagen und anderer ständiger Parasiten zu ihren Wirten. *Zoologischer Anzeiger* **136**, 77-83.
- Enderlein, G. 1906. Schuppen als sekundäre Atmungsorgane, sowie über eine neue antarktische Echinophthiriiden- Gattung. 12. Beitrag zur Kenntnis der antarktischen. *Zoologischer Anzeiger* **29**, 659-665.
- Engqvist, L. 2005. The mistreatment of covariate interaction terms in linear model analyses of behavioural and evolutionary ecology studies. *Animal Behaviour* **70**, 967-971.
- Evans, F.C. y Smith, F.E. 1952. The intrinsic rate of natural increase for the human louse *Pediculus humanus* L. *American Naturalist* **86**, 299–310.
- Fahrenholz, H. 1913. *Ectoparasiten und Abstammungslehre*. *Zoologischer Anzeiger* **41**, 371-374
- Fahrenholz, H. 1939. Beiträge zur Kenntnis der Anopluren. IV. *Mitteilungen aus dem Entomologischen Verein Bremen* **26**, 32-47.
- Felsó, B. y Rózsa, L. 2006. Reduced taxonomical richness of lice (Insecta: Phthiraptera) in diving birds. *Journal of Parasitology* **92**, 867-869.
- Felsó, B. y Rózsa, L. 2007. Diving behaviour reduces genera richness of lice (Insecta, Phthiraptera) of mammals. *Acta Parasitologica* **52**, 82-85.
- Ferris, G.F. 1934. *Contributions toward a monograph of the sucking lice. Part VII*. Stanford University Press, London, U.K., p. 473-526
- Ferris, G.F. 1951. The Sucking Lice. *Memoirs of the Pacific Coast Entomological Society*. Stanford University Press; USA.
- Florence, L. 1921. The hog louse, *Haematopinus suis* Linné; its biology, anatomy and histology. *Cornell University, Agricultural Experimental Station Memoir* **51**, 641–743.
- Gales, N.J., Bowen, W.D., Johnston, D.W., Kovacs, K.M., Littnan, C.L., Perrin, W.F., Reynolds, J.E. y Thompson, P.M. 2009. Guidelines for the treatment of marine mammals in field research. *Marine Mammal Science* **25**, 725-736.

- Gallardo, A., Toloza, A., Vassena, C., Picollo, M.I. y Mougabure-Cueto, G. 2013. Comparative efficacy of commercial combs in removing head lice (*Pediculus humanus capitis*) (Phthiraptera: Pediculidae). *Parasitology Research* **112**, 1363-1366.
- Galloway, T.D. 2012. Ectoparasites of rabbits and hares in Manitoba, Canada, with observations on age-specific dispersal in *Haemodipsus setoni* (Phthiraptera: Anoplura: Polyplacidae). *Canadian Entomologist* **144**, 439–446.
- Gemmill, A.W., Skørping, A. y Read, A.F. 1999. Optimal timing of first reproduction in parasitic nematodes. *Journal of Evolutionary Biology* **12**, 1148–1156.
- Grandi, M.F., Dans, S.L. y Crespo, E.A. 2008. Social composition and spatial distribution of colonies in an expanding population of South American sea lions. *Journal of Mammalogy* **89**, 1218-1228.
- Grandi, M.F. 2010. Dinámica poblacional y cambios estructurales en una población en crecimiento de lobo marino común, *Otaria flavescens*, del litoral norpatagónico. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina.
- Green, E.D. y Turner, M.L. 2004. Functional micromorphology of the elephant louse *Lepidophthirus macrorhini*. *Proceedings of the Microscopy Society of Southern Africa* **34**, 74.
- Hafner, M.S. y Nadler, S.A. 1988. Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. *Nature* **332**, 258-259.
- Hafner, M.S., Sudman, P.D., Villablanca, F.X., Spradling, T.A., Demastes, J.W. y Nadler, S.A. 1994. Disparate rates of molecular evolution in cospeciating hosts and parasites. *Science* **265**, 1087-1090.
- Hafner, M.S., Demastes, J.W., Spradling, T.A. y Reed, D.L. 2003 Cophylogeny between pocket gophers and chewing lice. In *Tangled trees: phylogeny, cospeciation, and coevolution* (ed. R. D. Page), pp. 195–220. University of Chicago Press.
- Hamilton, J. 1939. A second report on the Southern sea lion *Otaria byronia* (de Blainville). *Discovery Reports* **19**, 121-164.

- Hinton, H.E. 1976. Respiratory adaptations of marine insects. In *Marine Insects* (Ed. by L. Cheng), pp. 43-78. American Elsevier Publishing Company INC, New York.
- Hoi, H., Darolova, A., König, C. y Kristofík, J. 1998. The relation between colony size, breeding density and ectoparasite loads of adult European bee-eaters (*Merops apiaster*). *Ecoscience* **5**, 156–163.
- Jacoby, W.G. 2000. Loess: a nonparametric, graphical tool for depicting relationships between variables. *Electoral Studies* **19**, 577–613.
- Kehl, S. y Dettner, K. 2009. Surviving submerged- Setal tracheal gills for gas exchange in adult Rheophilic diving beetles. *Journal of Morphology* **270**, 1348-1355.
- Khokhlova, I.S., Serobyán, V., Degen, A.A. y Krasnov, B.R. 2011. Discrimination of host sex by a haematophagous ectoparasite. *Animal Behaviour* **81**, 275-281.
- Kim, K.C. 1971. The sucking lice (Anoplura: Echinophthiriidae) of the Northern fur seal; descriptions and morphological adaptation. *Annals of the Entomological Society of America* **64**, 280-292.
- Kim, K.C. 1972. Louse populations of the Northern Fur seal (*Callorhinus ursinus*). *The American Journal of Veterinary Research* **33**, 2027-2036.
- Kim, K.C. 1975 Ecology and morphological adaptation of the sucking lice (Anoplura, Echinophthiriidae) on the Northern Fur seal. *Rapport et Procès verbaux des Réunions du conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer* **169**, 504-515.
- Kim, K.C. 1985. *Coevolution of parasitic arthropods and mammals*. John Wiley and Sons, New York.
- Kim, K.C. 1987. Order Anoplura. In: *Immature insects* (Ed. by Stehr, F.W.), pp 224-245. Kendal/Hunt Publishing Company. Iowa.
- Kim, K.C. 1988. Evolutionary parallelism in Anoplura and eutherian mammals. In: *Biosystematics of Haematophagous Insects* (Ed. by Service, M.W.), pp. 91–114. Claredon Press, Oxford, UK.
- Kim, K.C. y Ludwig, H.W. 1978. The family classification of Anoplura. *Systematic Entomology* **3**, 249-284.

- Kim, K.C., Repenning, C.A. y Morejohn, G.V. 1975. Specific antiquity of the sucking lice and evolution of otariid seals. *Rapport et Procès verbaux des Réunions du conseil permanent International pour l'Exploration de la Mer* **169**, 544-549.
- King, J.E. 1983. *Seals of the World*. British Museum (Natural History), London, and Oxford University Press, Oxford, UK.
- Klassen, G.J. 1992. Coevolution: a history of the macroevolutionary approach to studying host-parasite. *Journal of Parasitology* **78**, 573-587.
- Koen Alonso, M., Crespo, E.A., Pedraza, S.N., García, N.A. y Coscarella, M. 2000. Feeding habits of the southern sea lion *Otaria flavescens* of Patagonia. *Fishing Bulletin* **97**, 250-263.
- Lauckner, G. 1985. Diseases of Mammalia: Pinnipedia. In: *Diseases of marine animals*, Volumen IV, part II. (Ed. by O. Kinne). Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, p. 683–793.
- Lee, P.L.M. y Clayton, D.H. 1995. Population biology of swift (*Apus apus*) ectoparasites in relation to host reproductive success. *Ecological Entomology* **20**, 43-50.
- Leidenberger, S., Harding, K. y Härkönen, T. 2007. Phocid seals, seal lice and heartworms: a terrestrial host–parasite system conveyed to the marine environment. *Diseases of Aquatic Organisms* **77**, 235-253.
- Leonardi, M.S. 2007. Dinámica poblacional de *Antarctophthirus microchir* (Anoplura, Echinophthiriidae) en crías de lobo marino de un pelo, en el norte de Patagonia, Argentina. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.
- Light, J.E. y Hafner, M.S. 2007. Cophylogeny and disparate rates of evolution in sympatric lineages of chewing lice on pocket gophers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **45**, 997–1013.
- Light, J.E., Smith, V.S., Allen, J.M., Durden, L.A. y Reed, D.L. 2010. Evolutionary history of mammalian sucking lice (Phthiraptera: Anoplura). *Evolutionary Biology* **10**, 292-307.

- Loader, C. 1999. *Local regression and likelihood*. Springer-Verlag, New York, USA.
- Marshall, A.G. 1981. The sex ratio in ectoparasitic insects. *Ecological Entomology* **6**, 155–174.
- May, R.M. y Anderson, R.C. 1978. Regulation and stability of host-parasite population interactions. II. Destabilising processes. *Journal of Animal Ecology* **47**, 249-268.
- Mehlhorn, B., Mehlhorn, H., y Plötz, J. 2002. Light and scanning electron microscopical study on *Antarctophthirus ogmorhini* lice from the Antarctic seal *Leptonychotes weddellii*. *Parasitology Research* **88**, 651–660.
- Mey, E. 1998. Über den Artbegriff bei Mallophagen (Insecta: Phthiraptera). *Zoologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden* **50**, 77-85.
- Miller, F.H.J. 1971. Scanning electron microscopy of *Echinophthirius horridus* (von Olfers), *Antarctophthirus callorhini* (Osborn) and *Proechinophthirus fluctus* (Ferris) with emphasis on the antennal structures (Anoplura: Echinophthiriidae). *Journal of Parasitology* **57**, 668-674.
- Mostman Liwanag, H.E. 2008. Fur versus blubber: a comparative look at marine mammal insulation and its metabolic and behavioral consequences. PhD Thesis, University of California, Santa Cruz, California, USA.
- Mougabure Cueto, G., Zerba, E. y Picollo, M.I. 2006. Embryonic development of human lice: rearing conditions and susceptibility to spinosad. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **101**, 257-261.
- Moyer B.R., Brown D.M. y Clayton D.H. 2002. Low humidity reduces ectoparasite pressure: Implications for host life history evolution. *Oikos* **97**, 223-228.
- Murray, M.D. 1955. Infestation of sheep with the face louse (*Linognathus ovillus*). *Australian Veterinary Journal* **31**, 22-26.
- Murray, M.D. 1957a. The distribution of the eggs of *Damalinia equi* (Denny) and *Haematopinus asini* (L) on the horse. *Australian Journal of Zoology* **5**, 183-187.
- Murray, M.D. 1957b. The distribution of the eggs of Mammalian Lice on their hosts. III. The distribution of the eggs of *Damalinia ovis* (L) on the sheep. *Australian Journal of Zoology* **5**, 173-182.

- Murray, M.D. 1957c. The distribution of eggs of mammalian lice on their hosts. II. Analysis of the oviposition behaviour of *Damalinia ovis* (L.). *Australian Journal of Zoology* **5**, 19-29.
- Murray, M.D. 1957d. The distribution of the eggs of mammalian lice on their hosts. I. Description of the oviposition behaviour. *Australian Journal of Zoology* **5**, 13-18.
- Murray, M.D. 1958. Ecology of the louse *Lepidophthirus macrorhini* Enderlein 1904 on the elephant seal *Mirounga leonina*. *Nature* **182**, 404-405.
- Murray, M.D. 1960. The ecology of lice on sheep. II. The influence of temperature and humidity on the development and hatching of the eggs of *Damalinia ovis* (L.). *Australian Journal of Zoology* **8**, 357-362.
- Murray, M.D. 1961. The ecology of the louse *Polyplax serrata* (Burm.) on the mouse *Mus musculus*. *Australian Journal of Zoology* **9**, 1-13.
- Murray, M.D. 1964. Ecology of the ectoparasites of seals and penguins. In: *Antarctic Biology*. Proceedings of the 1st S.C.A.R. Symposium of Antarctic Biology. (Ed. by Carrick, R., Prevost, J. and Holdgate, M.W.) pp. 241-245. Paris, France.
- Murray, M.D. 1967. Ectoparasites of Antarctic seals and birds. *Proceedings of the symposium on Pacific- Antarctic sciences. Jare Scientific Reports. Special Issue* **1**, 185-191.
- Murray, M.D. 1976. Insect parasite of marine bird and mammals. In: *Insects parasites of marine birds and mammals* (Ed. by L. Cheng), pp. 79-96. Publishing Company, Amsterdam.
- Murray, M.D. 1987. Arthropods- The pelage of mammals as an environment. *International Journal of Parasitology* **17**, 191-195.
- Murray, M.D. y Gordon, G. 1969. Ecology of lice on sheep. VII. Population dynamics of *Damalinia ovis* (Schrank). *Australian Journal of Zoology* **17**, 179-186.
- Murray, M.D. y Nicholls, D.G. 1965. Studies on the ectoparasites of seals and penguins II. The ecology of the louse *Lepidophthirus macrorhini* Enderlein on the Southern Elephant seal, *Mirounga leonina*. *Australian Journal of Zoology* **13**, 437-454.

- Murray, M.D., Smith, M.S.R. y Soucek, Z. 1965. Studies on the ectoparasites of seals and penguins II. The ecology of the louse *Antarctophthirus ogmorhini* Enderlein on the Weddell seal, *Leptonychotes weddelli* Lesson. *Australian Journal of Zoology* **13**, 761-771.
- Nuttall, G.H.F. 1918. The biology of *Phthirus pubis*. *Parasitology* **10**, 383-405.
- Page, R.D.M. 2003. *Tangled trees. Phylogeny, coespeciation, and coevolution*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Page, R.D.M., Price, R.D. y Hellenthal, R.A. 1995. Phylogeny of *Geomydoecus* and *Thomomydoecus* pocket gopher lice (Phthiraptera: Trichodectidae) inferred from cladistic analysis of adult and first instar morphology. *Systematic Entomology* **20**, 129-143.
- Page, R.D.M., Cruickshank, R.H., Dickens, M., Furness, R.W., Kennedy, M., Palma, R. y Smith, V. 2004. Phylogeny of “*Philoceanus* complex” seabird lice (Phthiraptera: Ischnocera) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**, 633-652.
- Palma, R.L. 1978. Slide mounting of lice: a detailed description of the Canada balsam technique. *The New Zealand Entomologist* **6**, 432-436.
- Paterson, A.M. y Banks, J. 2001. Analytical approaches to measuring cospeciation of host and parasites: through a glass, darkly. *International Journal of Parasitology* **31**, 1012-1022.
- Poulin, R. y Morand S. 2000. The diversity of parasites. *The Quarterly Review of Biology* **75**, 277-293
- Price, M.A. y Graham, O.H. 1997. Chewing and sucking lice as parasites of mammals and birds. *U.S. Department of Agriculture, Research Bulletin* 1849.
- Price, P.W. 1980. *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press, Princeton.
- Ramli, R., Cusack, M., Curry G.B., y Furness, R.W. 2000. Morphological variation of chewing lice (Insecta: Phthiraptera) from different skua taxa. *Biological Journal of the Linnean Society* **71**, 91-101.

- Reed, D.L., Hafner, M.S. y Allen, S.K. 2000. Mammalian hair diameter as a possible mechanism for host specialization in chewing lice. *Journal of Mammalogy* **81**, 999-1007.
- Reiczigel, J. 2003. Confidence intervals for the binomial parameter: some new considerations. *Statistics in Medicine* **22**, 611-621.
- Reiczigel, J. y Rózsa, L. 2005. Quantitative Parasitology 3.0. Budapest. In D.b.t. authors, editor.
- Reyes, L., Crespo, E. y Szapkievich, V. 1999. Distribution and population size of the southern sea lion (*Otaria flavescens*) in central and southern Chubut, Patagonia, Argentina. *Marine Mammal Science* **15**, 478-493.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* **43**, 223-225.
- Rivas, M. y Trimble, M. 2009. Aggregation behaviour in South American sea lion (*Otaria flavescens*) pups at Isla de Lobos, Uruguay. *Aquatic Mammals* **35**, 55-61.
- Rózsa, L. y Apari, P. 2012. Why infest the loved ones--inherent human behaviour indicates former mutualism with head lice. *Parasitology* **139**, 696-700.
- Rózsa, L., Reiczigel, J. y Majoros, G. 2000. Quantifying parasites in samples of hosts. *Journal of Parasitology* **86**, 228-232.
- Rukke, B.A., Birkemoe, T., Soleng, A., Lindstedt, H.H. y Ottesen, P. 2011. Head lice prevalence among households in Norway: importance of spatial variables and individual and household characteristics. *Parasitology* **138**, 1296-1304.
- Rust, R.W. 1974. The population dynamics and host utilization of *Geomydoecus oregonus*, a parasite of *Thomomys bottae*. *Oecologia* **15**, 287-304.
- Scherf, H. 1963. Ein Beitrag zur Kenntniszweier Pinnipedierläuse (*Antarctophthirus trichechi* Boheman und *Echinophthirus horridus* Olfers). *Parasitology Research* **23**, 16-44.
- Schucany, W.R. 2004. Kernel smoothers: An overview of curve estimators for the first graduate course in nonparametric statistics. *Statistical Science* **19**, 663-675.

- Scott, M.T. 1950. Observations on the bionomics of *Linognathus pedalis*. *Australian Journal of Agricultural Research* **1**, 465–470.
- Smith, V. 2007. Phthiraptera. In McGraw-Hill Encyclopedia of Science and Technology. McGraw-Hill Professional, New York, p 489-491.
- Smith, V., Ford, T., Johnson, K.P., Johnson, P.C.D, Kazunori, Y. y Light, J. 2011. Multiple lineages of lice pass through the K-Pg boundary. *Biology Letters* **7**, 782-785.
- Stearns, S.C. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Szczykutowicz, A., Adamski, Z., Hromada, M. y Tryjanowski, P. 2006. Patterns in the distribution of avian lice (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) living on the great grey shrike *Lanius excubitor*. *Parasitology Research* **98**, 507-510.
- Takano Lee, M., Edman, J.D., Mullens, B.A. y Clark, J.M. 2005. Transmission potential of the human head louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *International Journal of Dermatology* **44**, 811-816.
- Thompson, P.M., Corpe, H.M. y Reid, R.J. 1998. Prevalence and intensity of the ectoparasite *Echinophthirus horridus* on harbour seals (*Phoca vitulina*): effects of host age and inter-annual variability in host food availability. *Parasitology* **117**, 393-403.
- Timm, R.M. 1983. Fahrenheit's rule and resource tracking: a study of host-parasite coevolution. En: *Coevolution* (ed. Nitecki MH), pp. 225-266. University of Chicago Press, Chicago.
- Toloza, A., Vassena, C., Gallardo, A., González-Audino, P. y Picollo, M.I. 2009. Epidemiology of *Pediculosis capitis* in elementary schools of Buenos Aires, Argentina. *Parasitology Research* **104**, 1295-1298.
- Trouessart, E. y Neumann, G. 1888. Le Pou de L'Otarie. *Le Naturaliste* **10**, 80.
- Vas, Z., Csorba, G. y Rózsa, L. 2012. Evolutionary co-variation of host and parasite diversity-the first test of Eichler's rule using parasitic lice (Insecta: Phthiraptera). *Parasitology Research* **111**, 393-401.

- Vaz-Ferreira, R. 1981. South American Sea Lion *Otaria flavescens* (Shaw, 1800). En: Ridgway, S. y R.J. Harrison (Eds.). Handbook of Marine Mammals. Volume 1: The walrus, sea lions, fur seals and sea otter. Academic Press. London.
- Webb, J.E. 1946. Spiracle structure as a guide to the phylogenetic relationships of the Anoplura (biting and sucking lice), with notes on the affinities of the mammalian hosts. *Proceedings of the Zoological Society of London* **116**, 49-119.
- Werner, R. y Campagna, C. 1995. Diving behaviour of lactating southern sea lions (*Otaria flavescens*) in Patagonia. *Canadian Journal of Zoology* **73**, 1975-1982.
- Windsor, D.A. 1998. Most of the species on Earth are parasites. *International Journal of Parasitology* **28**, 1939-1941.
- Yochem, P.K. y Stewart, B.S. 2008. Hair and Fur. Pp 529-530. In: *Encyclopedia of Marine Mammals*. 2nd Edition (Perrin, Würsig y Thewissen).
- Yorio, P., Bertellotti, M. y Quintana, F. 1995. Preference for covered nest sites and breeding success in Kelp Gulls *Larus dominicanus*. *Marine Ornithology* **23**, 121-128.



ALLÁ VA.

HACIA EL
FUTURO.

EL LUGAR MÁS
MISTERIOSO
DE TODOS.