

## Estimación del tiempo de desarrollo de *Lutzomyia evansi* bajo condiciones experimentales

### Estimation of development time for *Lutzomyia evansi* under experimental conditions

Claudia Martínez Suárez<sup>1</sup>, Carlos Almanza Rodríguez<sup>1</sup>,  
Eduar Elías Bejarano Martínez<sup>1-2</sup>

#### Resumen

**Objetivo:** Estimar el tiempo promedio de desarrollo de *Lutzomyia evansi*.

**Materiales y métodos:** Se inició una colonia de *Lutzomyia evansi* con individuos recolectados en la zona urbana de la ciudad de Sincelejo (Colombia). La colonia fue mantenida en el laboratorio durante tres generaciones filiales bajo condiciones experimentales promedio de 26°C de temperatura y 94% de humedad relativa.

**Resultados:** La duración del desarrollo de *Lutzomyia evansi* fue de 36 a 45 días. El tiempo requerido para el desarrollo de los huevos fue en promedio de 6,75 días (rango de 6 a 8 días). La duración en promedio de los diferentes estadios larvales fue 5,75 días en larvas de primer estadio (rango de 5 a 8 días), 5,75 días en larvas de segundo estadio (rango de 4 a 7 días), 5 días en larvas de tercer estadio (rango de 4 a 7 días) y 7 días en larvas de cuarto estadio (rango de 6 a 8 días). En la fase de pupa, la duración en promedio fue de 9,75 días (rango de 7 a 17 días).

**Conclusiones:** El tiempo promedio requerido para el desarrollo de *Lutzomyia evansi*, comprendido desde la alimentación sanguínea de la hembra madre hasta la emergencia del adulto, es de 40 días.

**Palabras clave:** Flebotómíneo, *Lutzomyia evansi*, biología, leishmaniasis, Colombia.

Fecha de recepción: 15 de febrero de 2012  
Fecha de aceptación: 25 de abril de 2012

<sup>1</sup> Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre. A.A. 406, Sincelejo (Colombia).

<sup>2</sup> Programa de Doctorado en Medicina Tropical, SUE-Caribe (Colombia).

**Correspondencia:** Eduar E. Bejarano, Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre, Cra. 14 n° 16B-32, Sincelejo (Sucre), Colombia. eduarelias@yahoo.com

### Abstract

**Objective:** To estimate the mean development time for *Lutzomyia evansi*.

**Materials and methods:** A laboratory colony of *Lutzomyia evansi* was started from sand flies collected in the urban area of the City of Sincelejo, Colombia. The colony was maintained during three filial generations under experimental conditions of 26°C of mean temperature, and 94% of average relative humidity.

**Results:** The duration of the development of *Lutzomyia evansi* was from 36 to 45 days. The development time for eggs was, on average, 6,75 days (interval from 6 to 8 days). The mean duration of the different larval instars was 5,75 days in first instar (interval from 5 to 8 days), 5,75 days in second instar (interval from 4 to 7 days), 5 days in third instar (interval from 4 to 7 days) and 7 days in fourth instar (interval from 6 to 8 days). In the stage of pupa the development time was, on average, 9,75 days (interval from 7 to 17 days).

**Conclusions:** The mean development time for *Lutzomyia evansi*, from the female's blood meal to adult emergence, is 40 days.

**Keywords:** Sand fly, *Lutzomyia evansi*, biology, leishmaniasis, Colombia.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en la Costa Caribe colombiana, causada por al menos cuatro especies de *Leishmania*: *Le. infantum*, *Le. braziliensis*, *Le. panamensis* y *Le. guyanensis* (1). Estos parásitos son transmitidos al humano por la picadura de insectos flebotómíneos; en la Costa Caribe se destaca por su importancia *Lutzomyia evansi*, que actúa como vector del agente etiológico de la leishmaniasis visceral (2), que corresponde a la forma más agresiva de la enfermedad.

Los flebotómíneos son insectos holometábolos que desarrollan su ciclo de vida en ecosistemas terrestres, comúnmente referidos en la literatura como ambientes ricos en materia orgánica en descomposición (3,4). Sin embargo, en la práctica se desconocen las condiciones particulares de los microhábitats ocupados por este grupo de insectos, lo cual no solo dificulta su colonización en laboratorio, sino que también restringe el conocimiento a cerca de aspectos fundamentales de la bionomía y biología de es-

tos dípteros, información de interés para el control vectorial.

La colonización de flebotómíneos bajo condiciones experimentales es una actividad relativamente compleja por la extrema sensibilidad de estos insectos a las condiciones del entorno (5). No obstante, el establecimiento de colonias en laboratorio es motivado, entre otros, por la necesidad de efectuar ensayos de infección experimental con microorganismos patógenos, desarrollar estudios genéticos, establecer cultivos celulares, llevar a cabo pruebas de susceptibilidad a insecticidas, caracterizar los estados inmaduros o estimar la duración del ciclo de vida (6-15).

De las más de 150 especies de *Lutzomyia* encontradas a la fecha en el territorio colombiano (16,17), solo once han sido colonizadas en el laboratorio: *Lu. longipalpis*, *Lu. walkeri*, *Lu. evansi*, *Lu. shannoni*, *Lu. serrana*, *Lu. ovallesi*, *Lu. spinicrassa*, *Lu. longiflocosa*, *Lu. quasitownsendi*, *Lu. youngi* y *Lu. torvida* (5,7,8,10,12,14,18-21), generalmente a partir de ejemplares recolectados en áreas rurales donde la leishmaniasis es endémica.

El objetivo de esta investigación fue estimar el tiempo de desarrollo promedio de *Lu. evansi*, con base en una colonia de laboratorio integrada por flebotómicos provenientes de una zona urbana.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los especímenes de *Lu. evansi* fueron recolectados mediante aspirado manual en una trampa Shannon, en el sector Ciudadela Universitaria del área urbana de Sincelejo (1.520.019 N, 854.150 E), ciudad donde la especie constituye más del 70% de la abundancia de flebotómicos (22). Los ejemplares recolectados fueron depositados en una jaula de muselina de 25 cm x 25 cm, contenida, a su vez, en una caja de poliuretano expandido. Para mantener las condiciones de humedad relativa y temperatura del sitio de colecta durante el transporte de los flebotómicos al Laboratorio de Biomédicas de la Universidad de Sucre, se colocaron toallas de papel húmedas en la base de la caja.

Las hembras recolectadas fueron alimentadas con sangre de *Mus musculus*, el cual fue sedado con maleato de acepromazina a una dosis de 0.5 mg/kg; para la ingesta sanguínea se expuso el área dorsal o ventral del roedor. La metodología que se describe a continuación se deriva de trabajos previos de colonización de *Lutzomyia* spp. (5, 8, 14, 18). Por pareja, los flebotómicos fueron depositados en una cámara de cría compuesta por un recipiente de plástico de 5,5 cm de alto y 6,6 cm de diámetro, con una base humedecida de yeso dental, que se usó como sustrato para la oviposición de las hembras y la crianza de las larvas. Para disminuir el riesgo de contaminación con agentes externos, los recipientes fueron cubiertos con tapas de plástico.

Las cámaras de cría se mantuvieron en condiciones de oscuridad, a 26°C de temperatura y 94% de humedad relativa promedio, dentro de una caja de poliuretano expandido que contenía toallas de papel húmedas, y solo estuvieron expuestas a la luz durante la revisión diaria. Después de la oviposición se procedió al conteo del número de huevos y a la confirmación taxonómica de especie en los adultos, los cuales fueron identificados a partir de los caracteres morfológicos indicados en las claves de Young y Duncan (23) y Galati (24). En las hembras muertas se examinó, además, el número de huevos presentes en el abdomen, a fin de establecer el porcentaje de retención.

Después de la eclosión de los huevos se realizó el conteo de las larvas criadas en masa, a las cuales se les proporcionó una dieta compuesta por alimento para perros y alimento para conejos, en proporción 1:1 (8,25). Esta mezcla fue pulverizada, envuelta en papel Manila y esterilizada en autoclave a 20 libras de presión por 20 minutos. En cada cámara de cría se depositó diariamente una alícuota de alimento esterilizado; la ración diaria se incrementó de modo progresivo conforme a la maduración de las larvas. Para determinar la transición entre los estadios larvales se registró el cambio en la coloración corporal y en el número de setas caudales, así como la presencia de la exuvia producto de la muda en la cámara de cría, lo que en conjunto permitió estimar la duración de cada fase larval.

Durante el estado de pupa se suspendió el suministro de alimento; los adultos que emergieron fueron llevados a jaulas de muselina y mantenidos allí durante tres días, después de lo cual se les proporcionó una solución azucarada saturada y sangre de ra-

tón. Los flebotómíneos permanecieron enjaulados durante dos días más antes de ser dispuestos en parejas dentro de las cámaras de cría, con el propósito de dar inicio a una nueva generación.

Al final de cada generación se introdujeron machos silvestres de *Lu. evansi*, con el propósito de mantener la variabilidad genética y asegurar la continuidad de la colonización en el laboratorio hasta la tercera generación, tiempo dispuesto para estimar la duración del ciclo biológico. Para el análisis del ciclo de vida de cada una de las generaciones se utilizó el programa de cálculo numérico orientado a matrices MATrix LABoratory (MATLAB). Se determinó la duración de las fases inmaduras, el rendimiento de la colonia, el número de hembras y machos que emergieron y la razón entre los sexos.

## RESULTADOS

El tiempo promedio requerido para el desarrollo de *Lu. evansi*, comprendido desde la alimentación sanguínea de la hembra madre hasta la emergencia de los adultos de la siguiente generación, fue de 40 días, con un rango que varió entre 36 y 45 días. La duración en promedio de las fases de huevo, primer, segundo, tercer y cuarto estadio larval, y pupa se presentan en la tabla 1, con sus respectivos rangos. La mayor mortalidad de individuos de *Lu. evansi* se presentó entre el primer instar larval y la mitad del segundo instar, particularmente cuando las larvas alcanzaron los 10 a 12 días de vida, pero disminuyó en la segunda mitad de este último instar (tabla 1).

**Tabla 1.** Duración en días de los inmaduros de *Lutzomyia evansi*

Estado de desarrollo	Promedio	Mínimo	Máximo
Huevo	6,75	6	8
Larva I	5,75	5	8
Larva II	5,75	4	7
Larva III	5	4	7
Larva IV	7	6	8
Pupa	9,75	7	17
Total	40	36	45

**Fuente:** Datos tabulados por los autores.

El rendimiento de la colonia, calculado con base en el número de adultos obtenidos a partir del total de huevos por generación, se muestra en la tabla 2. A lo largo de las tres generaciones de *Lu. evansi* se registró un bajo porcentaje de eclosión. La colonia se inició con 13 hembras silvestres que se alimentaron en el laboratorio, de las cuales cuatro efectuaron oviposición, aunque en solo la mitad de estas la postura fue completa, es decir, sin retención de huevos. Las hembras silvestres pusieron en total 111 huevos, de los cuales se obtuvieron ocho adultos al final del ciclo.

Entre las hembras de la primera generación, tres de las alimentadas ovipositaron 53 huevos, sin evidencias de retención, de los cuales 15 individuos llegaron hasta el estado adulto. En la segunda generación ovipositaron seis hembras, si bien en una se observó retención de huevos. En total se obtuvieron 206 huevos y 17 ejemplares alcanzaron la fase adulta. Durante la tercera generación, seis de las hembras alimentadas ovipositaron, aunque algunas retuvieron huevos. El producto de la puesta fueron 94 huevos, a partir de los cuales se criaron siete adultos. En todas las generaciones, el balance en la razón entre los sexos se inclinó a favor de las hembras (tabla 2).

**Tabla 2.** Rendimiento de la colonia de *Lutzomyia evansi* por generación expresada en número absoluto (N) y porcentual (%). H = hembra, M = macho

	N (%) de H con postura	N (%) de H con postura completa	N (%) de H con retención de huevos	N de huevos puestos	N (%) de huevos retenidos	N (%) de M	N (%) de H	Razón M:H	Rendimiento%
GP	4 (30,76)	2 (50)	2 (50)	111	6 (5,40)	3 (35,5)	5 (62,5)	1:1.6	7,2
F1	3 (7,5)	3 (100)	0 (0)	53	0 (0)	6 (40)	9 (60)	1:1.5	28,3
F2	6 (83,71)	5 (80)	1 (20)	206	43 (20,8)	2 (28,57)	15 (71,42)	1:7.5	8,25
F3	6 (66,60)	6 (66,66)	3 (33,33)	94	39 (41,48)	3 (42,85)	4 (57,14)	1: 1.33	7,44

**Fuente:** Datos tabulados por los autores.

## DISCUSIÓN

La mayoría de las colonias de flebotómicos mantenidas en condiciones de laboratorio en el Nuevo Mundo corresponden a la especie *Lu. longipalpis*, que está incriminada en América como vector de *Le. infantum* (26). La fácil adaptación de *Lu. longipalpis* a las condiciones experimentales en laboratorio ha permitido la caracterización completa de su ciclo de vida, incluida la descripción detallada de los estados inmaduros de la especie (27-30). Contrariamente, son escasos los estudios de colonización de *Lu. evansi* (20, 31, 32), pese a que por su distribución geográfica constituye el segundo vector en importancia de *Le. infantum* en América.

El tiempo promedio de 40 días que conlleva el desarrollo de *Lu. evansi*, estimado durante esta investigación a partir de una población urbana, concuerda con lo observado en estudios previos, en los que se establecieron colonias de la especie con ejemplares recolectados en zonas rurales. Montoya-Lerma et al. (20) registraron para *Lu. evansi* de Co-

lombia una duración media del desarrollo de 41,8 días, con un rango de 35,1 a 49,6 días, calculado desde la ingesta sanguínea hasta la emergencia del primer adulto. Mirsa (31) observó que el tiempo de desarrollo de *Lu. evansi* de Venezuela comprende entre 31 y 51 días, con un ciclo gonadotrófico de 3,1 a 3,5 días, en tanto que Oviedo et al. (32) estimaron en 39,8 días la duración media de huevo a adulto, con un intervalo de 31,3 a 48,7 días, y un tiempo promedio del ciclo gonadotrófico de 3,53 días.

A pesar de tratarse de colonias establecidas con individuos procedentes de diferentes poblaciones naturales, la relativa homogeneidad que se observa en la duración del desarrollo de *Lu. evansi* indica la conservación evolutiva de factores intrínsecos a la especie que regulan la duración del ciclo biológico. Es importante notar que el ciclo de este vector es relativamente más corto que el de otras especies de flebotómicos colonizadas en Colombia, en especial de especies del grupo *Lutzomyia verrucarum* Theodor, 1965, en algunas de las cuales se

registran promedios de duración de 61,07 a 96,8 días (5,12), a temperaturas medias de entre 22 y 28°C.

Llama la atención el aumento en el porcentaje de retención de huevos por las hembras, el cual pasó del 0% en la primera generación filial al 41.48% en la tercera generación. Teniendo en cuenta que las condiciones de la colonia se mantuvieron relativamente estables durante las tres generaciones, es difícil identificar el factor que limitó la oviposición en las hembras de *Lu. evansi*, aunque se han propuesto como factores determinantes el espacio reducido de las cámaras de cría y la textura del sustrato usado para la postura de los huevos.

Con relación a las larvas, el decrecimiento en la sobrevivencia de los individuos del primer y segundo estadio confirma las observaciones de Montoya-Lerma et al. (20) al señalar que estos estadios son los más frágiles al ataque de agentes externos como hongos y ácaros, así como a las gotas de agua que se acumulan en las cámaras de cría como producto del alto porcentaje de humedad. La mortalidad en los estadios tercero y cuarto fue más baja, debido probablemente al tamaño y la robustez de estas larvas, que les permitió soportar las condiciones experimentales de laboratorio y resistir el ataque de agentes contaminantes.

Finalmente, es necesario enfatizar que el estudio del ciclo de vida de *Lu. evansi* es fundamental para comprender cómo responde este flebotomíneo a factores climáticos, tales como: la precipitación, temperatura, humedad relativa, entre otros, algunos de los cuales se correlacionan con la abundancia poblacional de la especie (33), lo que, a su

vez, es determinante en su rol como transmisor de *Leishmania* spp. en el litoral Caribe colombiano.

**Financiación:** Grupo de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Sucre.

**Conflicto de interés:** Ninguno.

## REFERENCIAS

- (1) Martínez LP, Rebollo JA, Luna AL, Cochero S, Bejarano EE. Molecular identification of the parasites causing cutaneous leishmaniasis on the Caribbean coast of Colombia. *Parasitol Res* 2010; 106: 647-52.
- (2) Travi BL, Vélez ID, Brutus L, Segura I, Jaramillo C, Montoya J. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84(5): 676-7.
- (3) Brazil RP, Brazil BG. Bionomia: Biología de flebotomíneos neotropicales. Rangel EF, Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Río de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003. pp. 257-74.
- (4) Maroli M, Feliciangeli MD, Arias J. Métodos de Captura, Conservación y Montaje de los Flebotomos (Diptera: Psychodidae), OPS/OMS/HCP/HCT/95/97. Washington, D.C., USA: Organización Panamericana de la Salud; 1997.
- (5) Cabrera OL, Ferro C. Ciclo de vida de *Lutzomyia spinicrassa*, *L. quasitownsendi* y *L. youngi*, especies del grupo *verrucarum* (Diptera: Psychodidae). *Actu Biol*, 2000; 22(73): 225-32. Disponible en: [http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/publicaciones\\_pdf/2000/RAB%2022\(73\)/mss%20pdf%202273/10%20O%20Cabrera.pdf](http://matematicas.udea.edu.co/~actubiol/publicaciones_pdf/2000/RAB%2022(73)/mss%20pdf%202273/10%20O%20Cabrera.pdf)
- (6) Bello FJ, Mejía AJ, Corena MP, Ayala M, Sarmiento L, Zúñiga C et al. Experimental infection of *Leishmania* (L.) *chagasi* in a cell line derived from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst*

- Oswaldo Cruz*, 2005; 100(6): 519-25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762005000600004>
- (7) Escovar J, Bello FJ, Morales A, Moncada L, Cárdenas E. Life tables and reproductive parameters of *Lutzomyia spinicrassa* (Diptera: Psychodidae) under laboratory conditions. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99(6): 603-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762004000600012>
- (8) Ferro C, Cárdenas E, Corredor D, Morales A, Munstermann LE. 1998. Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1998; 93(2): 195-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000200011>
- (9) Montoya-Lerma J, Cadena H, Oviedo M, Ready PD, Barazarte R, Travi BL et al. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lu. longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Trop* 2003; 85(1): 19-29.
- (10) Morales A, Olano VA, Ferro C. Laboratorio de Entomología, 1934-1997. En: Toro G, Hernández CA, Raad J, editores. *Instituto Nacional de Salud 1917-1997. Una historia, un compromiso*. Santafé de Bogotá: Instituto Nacional de Salud; 1998. pp. 77-94.
- (11) Mukhopadhyay J, Rangel EF, Kashinath, Munstermann LE. Patterns of genetic variability in colonized strains of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its consequences. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57(2): 216-21.
- (12) Neira M, Díaz-Martínez A, Bello F, Ferro C. Estudio en condiciones de laboratorio de los ciclos de vida de *Lutzomyia torvida* y *Lutzomyia longiflora* (Diptera: Psychodidae), posibles vectores de *Leishmania braziliensis* en La zona cafetera colombiana. *Biomédica* 1998; 18(4): 251-5.
- (13) Rey G, Ferro C, Bello F. Establishment and characterization of a new continuous cell line from *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) and its susceptibility to infections with arboviruses and *Leishmania chagasi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2000; 95(1): 103-10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000100017>
- (14) Santamaría E, Munsterman LE. Ferro, C. Estimating carrying capacity in a newly colonized sand fly *Lutzomyia serrana* (Diptera: Psychodidae). *J Econ Entomol* 2002; 95(1): 149-54.
- (15) Santamaría E, Ferro C, Munstermann LE. Aproximación al método CDC para determinar susceptibilidad a insecticidas en vectores de leishmaniasis. *Biomédica*, 2003; 23(1): 115-21. Disponible en: [redalyc.uaemex.mx/pdf/843/84323111.pdf](http://redalyc.uaemex.mx/pdf/843/84323111.pdf)
- (16) Bejarano EE. Lista actualizada de los psicóidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomol Mex* 2006; 45(1): 47-56. Disponible en: [redalyc.uaemex.mx/pdf/424/42445106.pdf](http://redalyc.uaemex.mx/pdf/424/42445106.pdf)
- (17) Bejarano EE, Vivero RJ, Uribe S. Description of *Lutzomyia velezi*, a new species of phlebotomine sand fly (Diptera: Psychodidae) from the Department of Antioquia, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105(3): 322-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000300014>
- (18) Cabrera OL, Neira M, Bello F, Ferro C. Ciclo de vida y colonización de *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) vector de *Leishmaniasis* en América Latina. *Biomédica* 1999; 19(3): 223-9.
- (19) Cárdenas E, Ferro C, Corredor D, Martínez O, Munstermann LE. Reproductive biology of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. *J Vector Ecol* 1999; 24(2): 158-70.
- (20) Montoya-Lerma J, Cadena-Peña H, Jaramillo-Salazar C. Rearing and colonization of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93(2): 263-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761998000200025>

- (21) Morales A, Ferro C, Isaza de Rodríguez C. Establecimiento de una colonia de *Lutzomyia walkeri* (Newstead, 1914) (Diptera: Phlebotominae). *Biomédica* 1984; 4(1): 37-41.
- (22) Bejarano EE, Rojas W, Uribe S, Vélez ID. Phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) associated with the appearance of urban leishmaniasis in the city of Sincelejo, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2002; 97(5): 645-7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000500010>
- (23) Young DG, Duncan MA. Guide to identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst* [en línea] 1994; 54: 1-881.
- (24) Galati EAB. Morfología, terminología de adultos e identificação dos táxons da América. En: Rangel EF, Lainson R, editores. *Flebotomíneos do Brasil*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2003: 53-175.
- (25) Young DG, Perkins PV, Endris RG. A larval diet or rearing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1981; 18: 446.
- (26) Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27(5): 305-18.
- (27) Leite ACR, Williams P, Santos MC. The pupa of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae - Phlebotominae). *Parassitologia* 1991; 33(Suppl.1): 477-84.
- (28) Leite ACR, Williams P. Description of the fourth instar larva of *Lutzomyia longipalpis*, under scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(5): 571-8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761996000500007>
- (29) Leite ACR, Williams P. The first instar larva of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1997; 92(2): 197-203. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761997000200011>
- (30) Ward RD, Ready PA. Chorionic sculpturing in some sandfly eggs (Diptera: Psychodidae). *J Entomol (A)* 1975; 50: 127-34.
- (31) Mirsa A. Sobre la biología de algunos flebotomos (Diptera: Psychodidae) y datos sobre otros hematófagos colectados en Atagracia de Orituco (Estado Guárico), Venezuela. *Revista de Sanidad y Asistencia Social* 1953; 18: 789-96.
- (32) Oviedo M, Moreno G, Graterol D. Bionomía de los vectores de leishmaniasis visceral en el Estado Trujillo, Venezuela. III. Colonización de *Lutzomyia evansi*. *Bol Dir Malarial Saneam Ambient* 1995; 35 (Supl.1): 269-76.
- (33) Lambraño-Cruz LF, Manjarrés-Pinzón G, Bejarano EE. Variación temporal de especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) en el área urbana de Sincelejo, Colombia. *Salud Uninorte* 2012; 28 (1) 191:200.