

**ESTUDIO DEL CICLO BIOLÓGICO DEL VECTOR DE LEISHMANIASIS
VISCERAL *Lutzomyia evansi* (NUÑEZ-TOVAR, 1924) (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.**

CARLOS JAVIER ALMANZA RODRIGUEZ

CLAUDIA MARCELA MARTINEZ SUAREZ

DIRIGIDO POR:

EDUAR ELIAS BEJARANO

Ms.C. Ciencias Básicas Biomédicas

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS

BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA

SINCELEJO

2008

**ESTUDIO DEL CICLO BIOLÓGICO DEL VECTOR DE LEISHMANIASIS
VISCERAL *Lutzomyia evansi* (NUÑEZ-TOVAR, 1924) (DIPTERA:
PSYCHODIDAE) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO.**

CARLOS JAVIER ALMANZA RODRIGUEZ

CLAUDIA MARCELA MARTINEZ SUAREZ

**Trabajo de grado para optar al título de Biólogo con Énfasis en
Biotecnología**

DIRIGIDO POR:

EDUAR ELIAS BEJARANO

Ms. C. Ciencias Básicas Biomédicas

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS

BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGÍA

SINCELEJO

2008

NOTA DE ACEPTACIÓN

Primer Jurado

Segundo Jurado

Tercer Jurado

Ciudad y fecha: _____

Dedicatoria.

Con todo el corazón a mis padres quienes mantuvieron firme el propósito de vivir para formarme como persona y profesional con su constante apoyo y amor.

A mis hermanas Katherine y Adriana quienes con su cariño incentivaron mis deseos de seguir adelante.

Carlos Javier Almanza Rodríguez.

Dedicatoria.

Dedico este trabajo a mi única familia.....

A mis padres Rosaura y Arturo por cada concejo, crítica y satisfacción, porque su perseverancia me inspira a seguir adelante, porque me enseñaron que la mente no es un límite de los sueños.

A mis hermanas Catalina por ser como es, eso ha ayudado a mi paciencia, a Carito porque es un angelito lindo porque es una personita que me ayudó personalmente en mi formación personal.

A los amigos de toda la vida por permitirme conocerlos, son una gran experiencia de enseñanza y apoyo, gracia por las risas y los buenos momentos.

Claudia Marcela Martínez Suárez.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a:

A Dios por permitirnos cumplir una meta más en nuestras vidas.

A nuestras familias por su respaldo, confianza y estimulación en nuestra formación como personas de bien.

A nuestro director Eduar Elías Bejarano por su constante respaldo, orientaciones y permitirnos trabajar en esta investigación.

Al Profesor Pedro Blanco Tuiran por su apoyo y cooperación, en el transcurso de nuestro trabajo.

A los profesores Eric Rauchwerger y Rita Luz Márquez Vizcaíno por sus consejos en el transcurso de nuestra formación académica y personal.

A la Dra. Elsa Nieves Blanco de la Universidad de Andes, Estado de Mérida Venezuela por su apoyo y contribución profesional desinteresada en nuestro trabajo.

A la Ing. Química Ana Carolina Martínez Suárez de la Universidad Industrial de Santander por el desarrollo del estudio estadístico.

A Alveiro Pérez Doria por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo.

A la Universidad de Sucre por su colaboración durante nuestra formación profesional.

A nuestros amigos de Unisucre: María Stella, Fernando Flores, Lufe, Lucho Bertel Jorge Osorio, Gustavo González, Alex y Ana, Oscar Mario, Ever García, Luís Paternina, Anita Paola, Jorge Bertel, Jesús Anaya, Yorlay, Giovanni Montes, Ruber Lázaro, Vivian Espinosa, Hernando Franco, Never Troncoso, Richard Hoyos, Diana Peralta, Roció Payares. Y a todos con los que chocamos en el camino.

A los compañeros del Grupo de Investigaciones Biomédicas, Yiris, Margaret, Katherine, Yaneth, Yina, Luís Roberto, hacer nuestra estadía en ese lugar más agradable.

**Únicamente los autores son los responsables de las ideas expuestas en
este trabajo (Artículo 12, Resolución 02 – 03).**

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE FOTOGRAFÍAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABLAS.....	XI
LISTA DE GRÁFICAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMEN.....	XIV
SUMARY.....	XV
INTRODUCCIÓN.....	16
ESTADO DEL ARTE.....	18
Taxonomía.....	18
Biología de <i>Lutzomyia sp.</i>	19
Estadios	19
• Huevo	20
• Larvas.....	20
• Pupa.....	21
• Adulto.....	22
Capacidad vectorial.....	23
ANTECEDENTES.....	24
OBJETIVOS.....	28
GENERALES.....	28
ESPECÍFICOS.....	28
METODOLGÍA.....	29
Área de estudio.....	29
Captura.....	30
Establecimiento de la colonia.....	31
Determinación del ciclo de vida.....	31
Longevidad del adulto.....	33
Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS	34
Descripción de estadios inmaduros.....	34
• Huevos.....	34
• Larvas.....	35
• Pupa.....	36

Estudio del ciclo de vida.....	37
Establecimiento de la colonia.....	42
Evaluación del azúcar en la longevidad de adultos de <i>Lutzomyia evansi</i> ...	43
DISCUSIONES.....	45
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES.....	51
ANEXOS.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	60

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1. Mapa de Sincelejo.

Fotografía 2. Trampa Shannon.

Fotografía 3.A. Aplicación de maleato de acepromacina.

Fotografía 3.B. Efecto del maleato de acepromacina en el ratón.

Fotografía 4. Oviposición de *Lutzomyia evansi*.

Fotografía 5. Huevos ovipositados en paredes del vaso.

Fotografía 6. Huevos ovipositados en yeso.

Fotografía 7. Exocorion de huevo de *Lu. evansi* con forma pentagonal.

Fotografía 8. Estadio I de *Lutzomyia evansi*.

Fotografía 9. Estadio II de *Lutzomyia evansi*.

Fotografía 10. Estadio III de *Lutzomyia evansi*.

Fotografía 11. Estadio IV de *Lutzomyia evansi*.

Fotografía 12. Pupa de *Lutzomyia evansi* de un día.

Fotografía 13. Pupa con ojos pardos.

Fotografía 14. Pupa en proceso de maduración.

Fotografía 15. Pupa lista para emergencia.

Fotografía 16. Exubia de pupa emergida.

Fotografía 17. Adulto *Lutzomyia evansi*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de *Lutzomyia sp.*

Figura 2, A. Terminalia genital de un espécimen macho.

Figura 2, B. Terminalia genital de un espécimen hembra.

Figura 3: Especies de *Lutzomyia* en las que se han realizado estudio de ciclo de vida en Colombia para los últimos 10 años.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies de *Lutzomyia* en las que se han realizado estudio de ciclo de vida en Colombia para los últimos 10 años.

Tabla 2. Ciclo de vida de *Lutzomyia evansi*.

Tabla 3. Productividad de *Lutzomyia evansi*.

Tabla 4. Numero de individuos Parentales (**P**), Filial I (**FI**), Filial II (**FII**) Y Filial III (**FIII**) obtenidos por días de *Lutzomyia evansi* bajo condiciones de laboratorio.

Tabla 5. Parentales individuos vivos.

Tabla 6. Análisis de los individuos vivos en la filial uno.

Tabla 7. Análisis de individuos vivos de la filial dos.

Tabla 8. Análisis de individuos vivos de la filial tres.

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Ciclo de vida ajustada de aparéntales de *Lutzomyia evansi*.

Grafica 2. Ciclo de vida ajustada de primera generación de *Lutzomyia evansi*.
Para individuos vivos.

Grafica 3. Ciclo de vida de segunda generación de *Lutzomyia evansi*.

Grafica 4. Ciclo de vida de tercera generación de *Lutzomyia evansi*.

Grafica 5. Longevidad de *Lutzomyia evansi* con glucosa.

Grafica 6. Longevidad de *Lutzomyia evansi* con fructosa.

LISTA DE ABREVIATURAS

L: *Leishmania*

Lu: *Lutzomyia*

F1: Filial 1

F2: Filial 2

F3: Filial 3

LI: Estadio larval I

L II: Estadio larval II

L III: Estadio larval III

L IV: Estadio larval IV

RESUMEN.

Lutzomyia evansi es el vector de *Leishmania infantum*, causante de Leishmaniasis visceral en todo el Departamento de Sucre, Costa Atlántica Colombiana. Se capturaron 13 individuos silvestres en el área periférica urbana de la Ciudad de Sincelejo; fueron colonizados exitosamente en el laboratorio de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Sucre, bajo condiciones experimentales logrando mantener tres generaciones. El promedio total de duración del ciclo de vida para *Lutzomyia evansi* fue de 40.99 días (38-45), a una temperatura de 25-27 °C y humedad relativa de 90-98 %. Los especímenes presentaron una retención de huevos de 5.40% en parentales, 0% en la Filial 1, 20.8% en la Filial 2 y 41.48% en la filial 3. La duración para huevos en promedio y rango fue de 7 días (6-8); para los estadios larvales observados para las tres generaciones en promedio y rango fue: Larva I 6 días (5-8), Larva II 5.25 días (4-7), Larva III 5.25 días (4-7), Larva IV 7 días (6-8) y Pupa en promedio y rango fue: 9.75 (7-17). La colonia mantuvo una productividad de 7.2% para parentales, 28.3% para la FI, 8.25% para la FII y 7.44% para la FIII. También se evaluaron dos fuentes de azúcar (glucosa y fructosa) en machos adultos con el fin de medir la longevidad de los individuos de la colonia. Se encontró que la fructosa permite alargar más el tiempo de vida de los machos adultos de la colonia hasta 12 días en comparación con la glucosa donde los individuos no sobrepasan los 8 días de vida.

SUMMARY

Lutzomyia evansi is the vector of *Leishmania infantum*; it is cause of the Leishmaniasis visceral in the entire Sincelejo municipality, Colombian Atlantica Cost. They were collect 13 wild individual on peripheral area, on Sincelejo city. They were colonizing successful in the research biomedical laboratory of the University of the Sucre, under experimental conditions for three generations. The total average of the cycle of life of the sand fly *Lutzomyia evansi* for was of 40.99 days (38-45), the temperature was of 25-27 °C, the humidity relative was 90-98%. The specimens were show eggs retention of 5.40% in parents; in the Filial I 0% eggs retention; in the Filial II 20.8% eggs retention and the Filial III 41.48% eggs retention. The duration of the instars larvae for chamber of rearing on each generation was: 7 days (6-8); 6 days (5-8) for first stage; 5.25 days (4-7) for second stage; 5.25 days (4-7) for third stage; 7 days (6-8) for fourth stage and 9.75 days (7-17) for the pupae. The colony to keep the productivity of 7.2% for individual parents; 28.3% for individual of the Filial I; 8.23% for individual of the Filial II and 7.44% for individual of the Filial III. In addition was evaluate two ways of sugar (glucose and fructose) for evaluate the life expectancy of males adults, do can find that fructose time long 12 days the life in males adults, to compare with glucose that only time long 8 days.

INTRODUCCIÓN

Los Flebotomíneos son dípteros hematófagos, holometábolos de la familia Psychodidae, (Young, 1979), presentan una amplia distribución geográfica en áreas tropicales y subtropicales del Viejo y Nuevo Mundo. En Colombia los insectos de este grupo taxonómico presentan una gran diversidad de especies incluyendo los diferentes géneros de la familia (*Brumptomyia*, *Warileya* y *Lutzomyia*). (Sandoval, et al. 1998 y Bejarano 2006).

Al interior del taxón se encuentran especies hematófagas de importancia médica y veterinaria debido al papel vectorial que desempeñan en la transmisión de arbovirus, bacterias y tripanosomatídeos, dentro de los últimos se agrupan las diferentes especies de *Leishmania* (Nieves y Pimienta. 2002; Rivero 2003), causantes de las formas clínicas de leishmaniasis. (Barreto et al 2006).

Cada especie de *Leishmania* tiene un perfil epidemiológico que involucra diferentes vectores, huéspedes, reservorios y condiciones geográficas, por lo tanto la epidemiología de estas enfermedades es compleja y puede ser alterada por factores ambientales (destrucción de bosques, nuevos asentamientos humanos, inundaciones y sequías), puesto que algunos parásitos y vectores son capaces de adaptarse al nuevo hábitat, originando cambios en la epidemiología que pueden llevar a la aparición de casos autóctonos urbanos. (Desjeux P.1992, Grimaldi GRJ, et al. 1993; Lainson R. 1988, Bejarano, E. E. 2006)

En Colombia, se han informado 141 especies del género *Lutzomyia* (Bejarano, E.E 2006), sin embargo sólo han sido colonizadas 9 de estas especies hasta la fecha, lo que genera un vacío en el conocimiento de la biología de estos artrópodos vectores; información que es fundamental para entender la epidemiología de las enfermedades que transmiten, ya que suministra datos sobre aspectos básicos del ciclo de vida como fertilidad y longevidad que en campo son imposibles de observar. Adicionalmente, permite disponer de material vivo para realizar ensayos de competencia vectorial y genera

conocimientos sobre los factores que influyen en las poblaciones de *Lutzomyia* como el microhábitat, la temperatura y la humedad del ambiente, entre otros.

Las nueve especies de insectos del género *Lutzomyia* que se han podido colonizar bajo condiciones de laboratorio en nuestro país son: *Lu. youngi*, *Lu. ovallesi*, *Lu. torvida*, *Lu. quasitownsendi*, *Lu. spinicrassa*, *Lu. longiflocosa*, *Lu. serrana*, *Lu. shannoni* y *Lu. evansi*. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de realizar investigaciones en este campo de la biología. (Montoya-Lerma et al 1998, Ferro C. et al 1998, Neira M. et al 1998, Cabrera O. et al 1993, Cabrera O y Ferro C.2000, Santamaría E. et al 2002, Morales et al 2005).

El establecimiento de las colonias también permite la formación de cultivos celulares de insectos importantes en estudios fisiológicos, bioquímicos, genéticos y moleculares, facilita el estudio de sistemas de clasificación alternos tales como estructura coriónica, sistema espiracular larval y morfología del atrio genital por quetotaxia del tagma cefálico larval.

Parte del inconveniente de obtener datos acerca de los aspectos básicos del ciclo biológico, radica en la dificultad de encontrar estadios inmaduros en la naturaleza y en que las especies de *Lutzomyia* presentan limitaciones para adaptarse a las condiciones de laboratorio, a causa del manejo inapropiado de la temperatura, humedad y contaminación por agentes biológicos externos que obstaculizan el normal desarrollo de los individuos de la colonia. (Cabrera y Ferro C. 2000).

Considerando lo anterior, en el presente trabajo se estudio el ciclo de vida y las utilidades potenciales que presentaría una colonia de *Lutzomyia evansi*, un vector comprobado de leishmaniasis visceral en la Costa Atlántica.

ESTADO DEL ARTE

Taxonomía.

La taxonomía clásica de los flebotomíneos se basa en la observación de caracteres morfológicos presentados por el imago, permitiéndoles agruparse en la familia *Psychodidae* integrada por seis subfamilias (Duckhouse, 1972,1973). De estas tan solo dos contienen especies hematófagas: *Sycoracinae* y *Phlebotominae* (Fairchild, 1955).

De la sub-familia *Phlebotominae* se desprenden seis géneros de los cuales tres están en el nuevo mundo: *Brumtomyia*, *Warileya* y *Lutzomyia*; este último incluye todas las especies vectoras de leishmaniasis en el nuevo mundo (Lewis et al., 1977).

El genero *Lutzomyia* esta dividido en numerosos subgéneros, grupos de especies y series basados en la morfología del adulto (Lewis et al., 1977). La diversidad de grupos dentro del genero es atribuida a “radiación explosiva” de algunas migraciones ancestrales que encontraron una abundancia de nichos para colonizar (Theodor, 1965). Esto hace suponer que estas migraciones ancestrales del viejo mundo originó la especiación en el nuevo mundo de algunos grupos (e.g. Subgénero *Trichiphoromyia*) a causa de los cambios climáticos en el pasado, especialmente durante el Pleistoceno, el cual sirvió para aislar poblaciones coespecificas en refugios húmedos durante los periodos de sequía (Hafer, 1974).

En Colombia se han reportado un total de 141 especies de *Lutzomyia* pero solo seis son vectoras para leishmaniasis. (Botero y Restrepo. 1998; Montoya-Lerma y Ferro. 1999; Cochero.2002; Montoya-Lerma 1996 y Ferro. 1999; Bejarano E.E 2006).

Biología de *Lutzomyia*.

Los flebotomíneos son dípteros pequeños hematófagos holometábolos reconocidos como insectos vectores de los agentes etiológicos de la Leishmaniasis, estomatitis vesicular, bartonelosis, de importancia en la salud Pública y Veterinaria. (Sandoval C. et al 1998; Barreto M. et al 2006).

Las especies de *Lutzomyia* tienen actividad crepuscular y nocturna (desde las 16:00 hasta las 07:00 horas del día siguiente), aunque también pueden activarse durante el día, cuando se ingresa a los lugares donde ellos reposan. Ambos sexos vuelan planeando en desplazamientos, generalmente cortos. (INS, 2002). Poseen un ciclo biológico terrestre no sometido a corrientes de aire; afectan su actividad factores relacionados con el calor o el frío y las temporadas de lluvia o sequía. Las hembras pican cuando la temperatura oscila entre 25 y 28 °C, y la humedad se encuentra entre 88 y 95% aunque esto puede variar, según la especie y la adaptación de éstas al medio. (Cabrera et al 2000, Santamaría et al. 2002, Justiniano, S.C.B et al 2004)

Las hembras buscan lugares ricos en nutrientes para realizar su oviposición, que comúnmente puede ser de 40 huevos por oviposición, esto para las colonias de laboratorio. Éstos se desarrollan a larvas entre los 4 y 20 días.

Estadios.

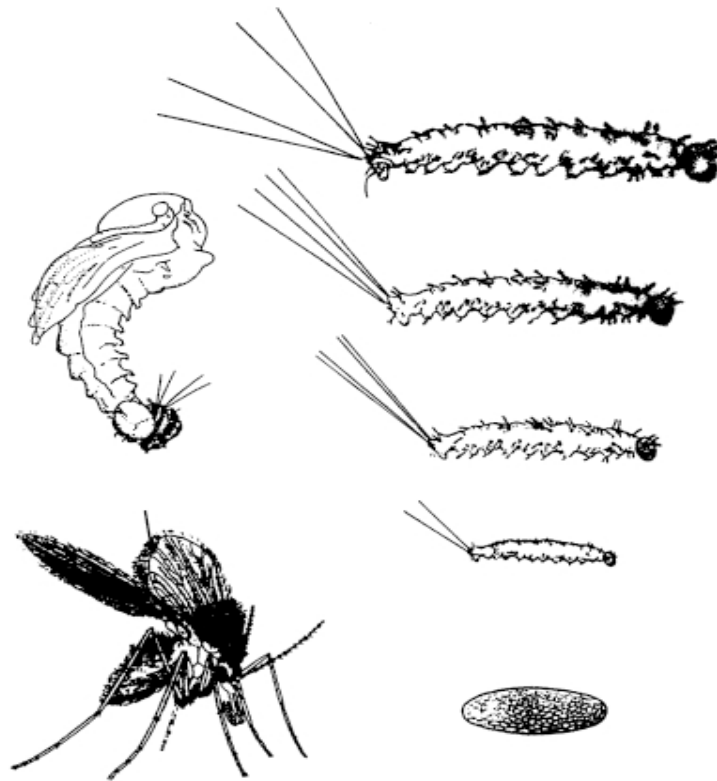
Los conocimientos sobre los estadios inmaduros de las especies de *Lutzomyia* se derivan de individuos adaptados y criados en el laboratorio. Las variables ambientales óptimas para el desarrollo de las *Lutzomyia* son: 80-85 % de humedad relativa, 21-27°C de temperatura. Las preparaciones de alimentos más exitosas son las estandarizadas por Hertig y Johnson (1961) y Christensen (1972), modificado por Modi y Tehs (1983).

Huevo: Son de forma elíptica y alargados, miden entre 0.3 - 0.5 mm de largo y 0.1 mm de ancho. Tardan entre 30 a 60 días antes de eclosionar. En el momento de la oviposición son de color blanco, transcurrido un tiempo adquieren una coloración oscura. Las formas externas conocidas como esculpido coriónico varían de una especie a otra. Son frágiles y los afectan factores ambientales extremos como lluvias, humedad y altas temperaturas que le pueden ocasionar una alta mortalidad.

Larvas: El cuerpo es de color blanco, mientras que la cabeza, el lóbulo caudal y la seta caudal son de color café claro y pueden llegar a medir entre 0.4 y 0.6 mm. El exoesqueleto craneal no muestra una sutura dorsal, los primeros segmentos antenales son largos; los segundos son casi de la misma medida pero muestran una forma enroscada simulando un cabello. (Figura 1).

Durante el segundo estadio el color es muy similar al primero y se pueden visualizar cuatro setas caudales con un tamaño que alcanza al doble de la longitud del cuerpo. Se muestra una forma de ye (Y) en la sutura dorsal ubicada en la cabeza. Para el estadio tres los cambios no son tan notorios, solo se puede observar un aumento en el tamaño del cuerpo.

En el estadio cuatro el tamaño del cuerpo alcanza entre 2.2 y 2.5 mm de longitud y las setas caudales alcanzan aproximadamente la misma longitud del cuerpo, dos setas con una base prominente y redonda que se ubican a cada lado de la cabeza; también presenta mandíbulas claramente distinguibles. Es importante señalar que las medidas y diferenciación de las estructuras cambian según la especie (Ferro et al 1998).



Referencia: Young D y Arias JR (1992).

Figura 1. Ciclo biológico de *Lutzomyia* sp. (INS, 2002).

En el tórax se ubican los órganos locomotores, algunos poseen pseudópodos, de igual manera tiene unas largas sedas en la parte caudal y se encuentra en un sólo número par en el primer estadio y en dos pares en los siguientes tres estadios. Estas larvas tienen un óptimo desarrollo cuando la alimentación y la humedad son aptas. En contraste, las larvas en el cuarto estadio que son sometidas a temperatura extrema (10 °C) sufren un periodo de diapausa hasta que la temperatura sea la adecuada para continuar con su desarrollo, en el cual influyen el fotoperiodo y la humedad relativa del medio.

Pupa: puede llegar a medir 3 mm de largo, son de color blanco al principio de la metamorfosis y luego se tornan oscuras al momento de eclosionar. El periodo pupal puede durar entre 7 y 8 días.

Adulto: Los machos suelen emerger antes que las hembras. En el transcurso de las primeras 24 horas, los genitales externos masculinos giran 180°, por lo que adquieren una posición invertida permanente.

Un adulto puede llegar a medir entre 1 y 4 mm. de longitud, éste presenta patas largas y finas, siendo el tercer par mas largos que los otros dos, en el tórax se insertan las alas lanceoladas que se mantienen levantadas en reposo formando un ángulo de 90 grados entre si. Todo el cuerpo está cubierto de pelos. Los machos se diferencian de las hembras por las estructuras anatómicas presentes en los últimos segmentos abdominales que constituyen la genitalia. (Figura 2), (INS, 2002).

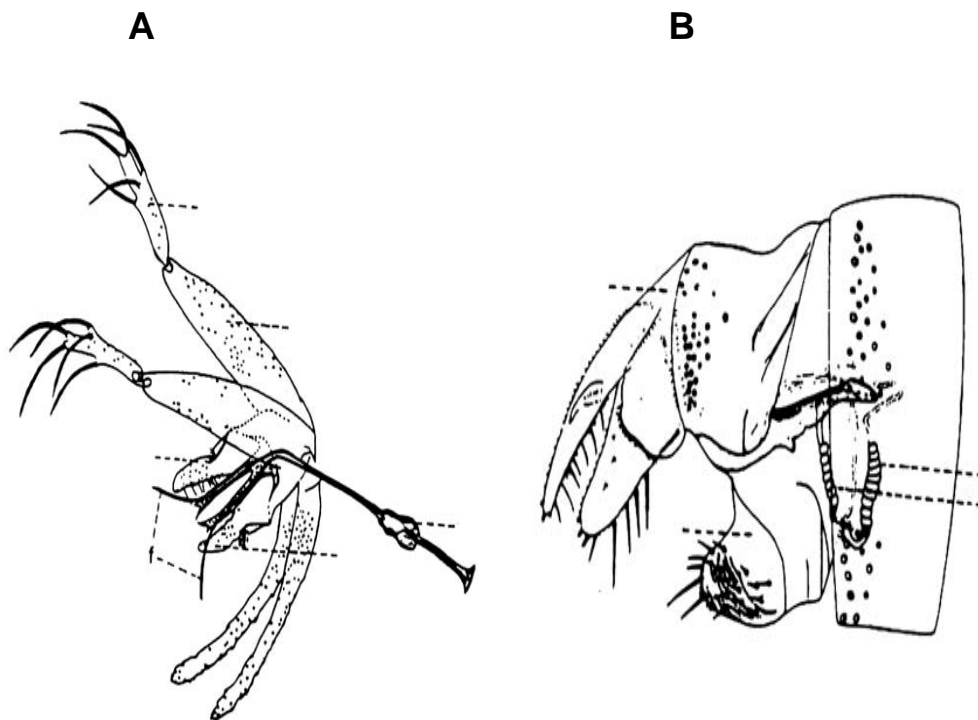


Figura 2. Características morfológicas de *Lutzomyia sp*: **A. Genitales** de un espécimen macho; **B.** Genitales de un espécimen hembra. (Alvar E, 2001).

Capacidad vectorial.

La adaptación de los flebotomíneos al medio ecológico en el que viven los vertebrados de los que se van a alimentar, es fundamental para que exista la transmisión, determinada por los siguientes aspectos:

- El carácter obligatorio de la transmisión por la picadura de los vectores.
 - La especificidad relativa en la alimentación de cada especie de flebótomo hacia un vertebrado determinado.
 - La tendencia antropozoofílica de la especie de *Lutzomyia*, significando un riesgo epidemiológico.
 - Los hábitats particulares que condicionan la distribución de cada especie de *Lutzomyia*.
 - La densidad de la población, lo que implica una frecuencia media de picadura alta por el mayor número de individuos de *Lutzomyia* (en zonas endémicas un animal puede recibir hasta varias docenas de picaduras por noche).
 - Duración del ciclo gonotrófico. Una vez infectado el insecto es capaz de transmitir la leishmaniasis durante toda su vida, en cada una de las ingestas sanguíneas que realice. Hay especies de *Lutzomyia* que sólo hacen una ingesta para cada oviposición, son los concordantes gonotróficos; éstos tienen menos riesgo epidemiológico que los discordantes, los cuales pueden volver a realizar una segunda ingesta después de haber hecho una oviposición previa.
- (Alvar Ezquerro J. 2001).

ANTECEDENTES.

En Colombia los estudios que conllevan a la determinación de los ciclos de vida y el establecimiento de colonias de insectos del género *Lutzomyia* aportan conocimientos de tipo ecológico y epidemiológico de las enfermedades transmitidas por ellos.

Sin embargo en nuestro territorio se han logrado establecer solo nueve colonias de insectos del género *Lutzomyia*, debido a diversos factores que afectan las colonias en el laboratorio, como el manejo de la humedad, la temperatura, el fotoperiodo, la preparación del medio de cría y la mezcla alimenticia que se les administra a los especímenes. Por otra parte, la contaminación por hongos, bacterias o ácaros que pueden llevar a extinguir colonias enteras, hasta el agotamiento en la producción de huevos por parte de las hembras en las colonias ya establecidas y la pérdida de la variabilidad genética en estudios de colonias de largo tiempo que trae como consecuencia una disminución de los individuos de la colonia y eventualmente la extinción total de esta, lo que ocurre frecuentemente en colonias cerradas. Aun así se han podido establecer colonias de especies importantes en la transmisión de enfermedades vectoriales. (Morales, A et al 2005).

Dentro de las colonias exitosas reportadas, se encuentran. *Lutzomyia shannoni* derivada de individuos recolectados en el departamento de Antioquia y que permitió la descripción del ciclo de vida de esta especie. En los Estados Unidos la describen como un importante vector del virus de la estomatitis vesicular, enfermedad del ganado y las ovejas (Ferro et. al 1998), y aunque en Colombia no existen evidencias de que *Lu. shannoni* transmita este virus, es de interés que la especie se encuentre dentro de los domicilios y en peridomicilios.

En la zona Andina, se estudiaron los ciclos de vida de *Lu. torvida* y *Lu. longiflocosa* en el cual la postura promedio de las hembras fue 25.8 para *Lu. torvida* y 27.6 para *Lu. longiflocosa*. El tiempo promedio de duración de huevo a adulto fue de 96.8 días para *Lu. torvida* y 93.8 días para *Lu. longiflocosa* (Neira et al. 1998).

Los mayores porcentajes de mortalidad para las dos especies se presentaron en la fase de huevo y en el cuarto estadio larval. El 54.8 % de los individuos de *Lu. torvida* y el 72% de *Lu. longiflocosa* llegaron a etapa adulta. Sin embargo, las hembras que emergieron se resistieron a picar en hámster anestesiado, por lo tanto no ingirieron sangre y no se obtuvo una segunda generación.

Para la zona central de Colombia específicamente el Departamento de Cundinamarca, Cabrera et al en 1999 crió y mantuvo 14 generaciones de *Lu. ovallesi* bajo condiciones de laboratorio con una temperatura diaria de 22 a 28 °C y una humedad relativa de 90 a 98 %. Luego de la emergencia de machos y hembras la duración de cada uno de los estadios del ciclo de vida observado fue para huevo de 9 a 12 días, para larva I de 7 a 11 días, larva II de 7 a 13 días, larva III de 4 a 12 días y larva IV de 9 a 19 días. Para pupa de 8 a 16 días, para un total del ciclo biológico de 63.36 días con un rango de longevidad en hembras de 5 a 10 días y para machos de 4 a 13 días. Se presentó una tasa de mortalidad baja, tan solo 7.7% para huevo y 10.4 % para pupa. *Lu. ovallesi* es una de las especies de este género que no presenta mayores problemas en el proceso de establecimiento de una colonia ya que su productividad aumentó 17 veces en número de la colonia inicial. (Cabrera, L et al 1999).

Posteriores estudios de colonización realizados por Cabrera et al en el 2000, en especies de *Lu. spinicrassa*, *Lu. quasitownsendi* y *Lu. youngi*; involucradas en la transmisión de Leishmaniosis cutánea y mucocutánea especialmente en focos de Leishmaniasis (*Viannia*) *braziliensis* donde, en *Lu. spinicrassa* se encontraron algunos flagelados de *Leishmania (Viannia) braziliensis* lo que posiblemente evidenciaba la presencia de *Lu. spinicrassa* como vector de la enfermedad en Colombia y Venezuela; para nuestro país su distribución es en los departamentos de Norte de Santander y Boyacá, para *Lu. quasitownsendi* su distribución se da en los Departamentos de Santander, Boyacá y Norte de Santander; por último *Lu. youngi*, aunque se ha encontrado en países como Venezuela y Costa Rica donde se le incrimina en la infección de *L. panamensis*, en Colombia se la puede encontrar en el Valle del Cauca.(Cabrera, L et. al.2000)

El promedio de duración de estadio para estas tres especies fluctúa entre 46 y 95 días, señalándose a *Lu. youngi* como la especie que menos tiempo necesita para culminar su ciclo biológico. El promedio de oviposición fue de 23.29 huevos para las tres especies, la longevidad de los machos se estableció con una proporción de 28.82 y la de las hembras de 25.16 y durante el estadio de huevo se encontró la más alta tasa de mortalidad de *Lu. spinicrassa*, *Lu. quasitownsendi* y *Lu. youngi* con 38.9, 19.8 y 52.8 % respectivamente. Esto se dio a causa de un manejo inadecuado en la humedad lo que conlleva a una prolongación significativa en el tiempo de desarrollo del ciclo biológico y en consecuencia las convierte en las especies que requieren más tiempo en condiciones de laboratorio. (Tabla 1).

Santamaría et al. 2002. Colonizó *Lu. serrana* bajo condiciones de laboratorio para estimar una producción eficiente de individuos por colonia experimentando la capacidad estándar de cría, midiendo las densidades poblacionales de individuos por espacio. Se criaron de 1 a 50 individuos de *Lu. serrana* hembras alimentadas e igual número de machos. Las condiciones en laboratorio fueron de 23-26 °C y 85-95% de humedad relativa. (Santamaría, E. et al 2002).

Para la costa Caribe se toma como referencia el estudio realizado por Montoya-Lerma (1998), llevado a cabo en San Andrés de Sotavento, donde se estableció una colonia de cinco generaciones de *Lu. evansi* incriminada en la transmisión de leishmaniosis visceral con un tiempo promedio de 41.8 días de desarrollo para la especie, una tasa de mortalidad importante luego de las primeras horas de la captura. Sin embargo al realizar pruebas que conllevaron al cambio en las fuentes de azúcar de maltosa y glucosa a fructosa, encontraron que se puede alargar el tiempo de las especies silvestres. Igualmente, el mantenimiento de una humedad del 90% y temperatura de 26 °C proporciona una mortalidad media en los huevos. (Montoya-Lerma, J et al 1998).

Especies	Año	Número de huevos	huevo	I	II	III	IV	Pupa	Adulto	Total duración	Generaciones	Autor
<i>Lu. quasitownsendi</i>	1992		11,38-11,78	35,28				36,78	66,8-68,74		22	Ferro et al
<i>Lu. spinicrassa*</i>	1997										21	Escobar et al
<i>Lu. longiflocosa*</i>	1997										17	Neira
<i>Lu. quasitownsendi*</i>	1997										27	Ferro et al
<i>Lu. torvida*</i>	1997										4	Ferro et al
<i>Lu. shannoni</i>	1997	22,7	36						74			Ferro et al
<i>Lu. evansi</i>	1998		6,5		9,8			10	9	41,8	5	Montoya-Lerma
<i>Lu. torvida*</i>	1998					96,8				96,8	1	Ferro et al
<i>Lu. longiflocosa*</i>	1998					93,8				93,8	1	Neira
<i>Lu. ovallesi</i>	1999		9-12	7-11	7-13	4-12	9-19	8-16		63,36	14	Cabrera et al
<i>Lu. torvida*</i>	1999									95,85	1	Ferro et al
<i>Lu. longiflocosa*</i>	1999									93,7	1	Neira
<i>Lu. spinicrassa*</i>	2000	21,78			49				80	75,27	1	Cabrera et al
<i>Lu. quasitownsendi*</i>	2000	27,55								69,85	1	Cabrera et al
<i>Lu. youngi</i>	2000									61,07	1	Cabrera et al
<i>Lu. serrana</i>	2002											Santamaria et al
<i>Lu. spinicrassa*</i>	2005										8	Morales et al

Tabla 1: Especies de *Lutzomyia* en las que se han realizado estudio de ciclo de vida en Colombia en los últimos 10 años.

OBJETIVOS

GENERAL

- Determinar el ciclo de vida de *Lutzomyia evansi* bajo condiciones de laboratorio.

ESPECÌFICOS

- Establecer un protocolo para establecimiento de una colonia de *Lutzomyia evansi* bajo condiciones de laboratorio.
- Determinar la duración de los estados de huevo, larva, pupa y adulto de *Lutzomyia evansi*.
- Determinar el porcentaje de supervivencia por cada estadio, las tasas de fertilidad de los huevos y el número de adultos que emergen.
- Evaluar la longevidad de individuos adultos utilizando dos vías de azúcar.

METODOLOGÍA

Área de estudio.

Comprende el Municipio de Sincelejo ubicado geográficamente 1.520.019 N (Longitud) 854.150 E (Latitud), y 202 msnm.



Fotografía 1. Ubicación del sitio de captura. (www.googleearth.com)

El criterio para escoger la zona de estudio fue dado con base en trabajos realizados por Lambraño en el 2007, donde las densidades de individuos fueron más altas después de algunas lluvias; por esta razón la recolección de los especímenes silvestres se realizó en barrios de la periferia de la Ciudad de Sincelejo, la Ciudadela Universitaria. Donde se determinó una densidad aproximada de 200 individuos totales luego de 7 meses de colecta.

Captura.

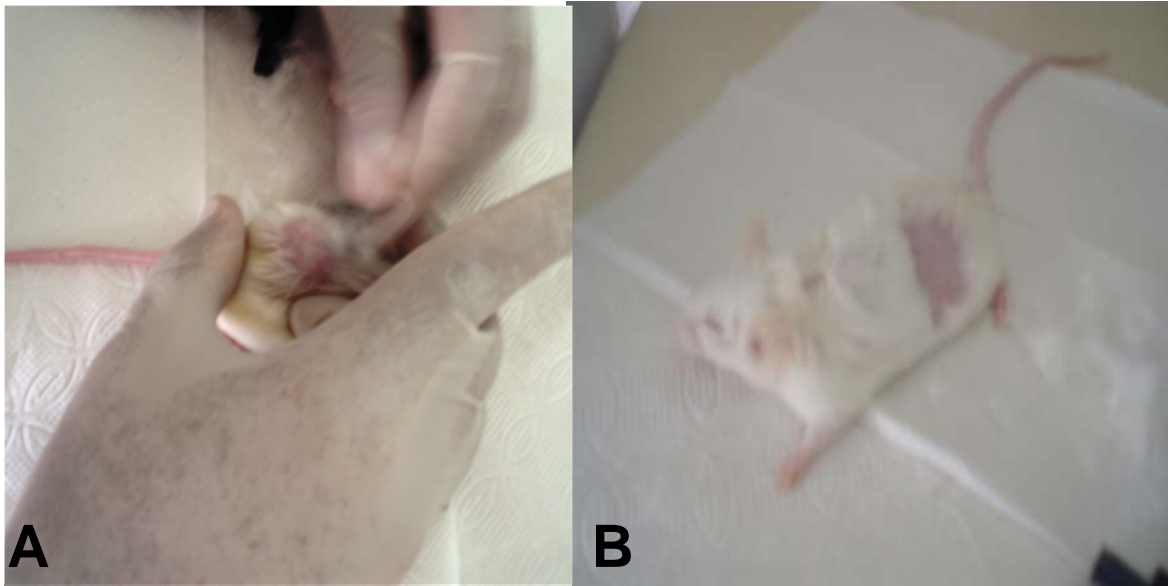
Se realizaron cinco colectas durante los meses de agosto y septiembre, que permitieron acopiar una cantidad aproximada de cien individuos. Los flebotomíneos fueron recolectados empleando trampa de luz tipo Shannon, operada por dos personas entre las 18:00 y 21:00 horas. (Fotografía 2).



Fotografía 2. Trampa Shannon puesta a las 6:00 pm.

Los especímenes fueron almacenados dentro de una cava de icopor, que en el interior contenía una jaula de muselina de 25 x 25 x 25 cm, esta conservó un rango de temperatura entre 22- 28°C y una humedad relativa entre 80-98%, para luego ser llevados al Laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Sucre.

Las hembras se alimentaron con sangre de ratón sano, sedado con Maleato de acepromazina 0.5 mg/kg; luego se le realizaron dos depilaciones en las áreas dorsal y ventral, humedeciendo el pelo y raspando cuidadosamente con una cuchilla de afeitar para evitar lesiones (Fotografía 3)



Fotografía 3. A. Efecto de maleato de azepromazina al ratón, B. Efecto del maleato de azepromazina en el ratón.

Establecimiento de la colonia.

Se estableció una colonia abierta introduciendo individuos machos silvestres al final de cada generación, permitiendo así el mantenimiento de la variabilidad genética y asegurando la continuidad de los especímenes *Lutzomyia evansi* criados en laboratorio hasta la tercera generación, tiempo suficiente para observar ciclo biológico y fertilidad.

Determinación del ciclo de vida.

Como cámaras de oviposición se emplearon vasos de plástico de 5.5 cm. de alto x 6.6 cm. de diámetro, a estos se le adicionó yeso dental hasta llegar a una altura de 1.5 cm quedando una cámara de aire de 4.0 cm de alto x 6.6 cm de diámetro. Este fue humedecido y empleado como sustrato para la oviposición de los adultos y crianza de las larvas. Para minimizar los riesgos de contaminación por agentes externos se cubrieron los vasos con sus respectivas tapas y sólo se abrieron para realizar las observaciones diarias. (Cabrera O. Et al. 1999, Morales A. et al, 2005).

Con ayuda del capturador y verificando en el estereoscopio, se introdujo un macho y una hembra por cada vaso de oviposición, el tiempo de permanencia fue en promedio de siete días. Luego de la puesta y muerte de los individuos adultos retiraron y se realizó la determinación taxonómica donde se prestó atención a las espermatecas en las hembras y terminalia genital en los machos; que son las principales estructuras diagnósticas, siguiendo la clave de Young y Duncan (1994) y Galati (2003).

Cada vaso de oviposición se revisó en el estereoscopio, donde se realizó el conteo de los huevos, para la retención de huevos las hembras se trataron con lactofenol proporción 1:1 y se observaron los huevos que aun están en el abdomen de los individuos hembras. Posteriormente los vasos fueron guardados en una cava de icopor cuya base fue cubierta con toallas absorbentes previamente humedecidas con el fin de conservar las condiciones artificiales establecidas en un rango entre 22 y 28 °C para la temperatura y una humedad relativa entre 80 y 98%; (Cabrera et al 2000, Santamaría et al. 2002, Justiniano et al 2004.)ajustándola posteriormente entre 95-98%, llevando a cabo observaciones diarias para establecer el tiempo de eclosión y constatar la higiene de cada vaso.

Luego de la eclosión de los huevos, se realizó el conteo de las larvas en cría masal, dejando como vaso de cría al vaso de oviposición y se les proporcionó una dieta especial preparada de la siguiente manera: Se maceró en partes iguales, alimento para perros, alimento de conejo (conejina) y heces de conejo, en proporción 1:1:1; Esta dieta corresponde a la descrita por Young et al 1981, y modificada por Ferro C. et al. 1998. Haciendo modificaciones a esta metodología se suprimió las heces de conejo, la mezcla se envolvió en papel Manila y se depositó dentro de una bolsa de plástico de polietileno de alta densidad para evitar que se mojará durante el proceso de esterilización en autoclave a 20 libras de presión por espacio de 20 minutos. Luego se le administró a cada vaso de cría una alícuota diaria, cambiando el alimento de los vasos y aumentando gradualmente la cantidad de alimento suministrada, a medida que las larvas fueron madurando.

Para determinar la transición de estadio, se observaron cambios en el color y exuvia de cada muda, así mismo la aparición de un par más de setas caudales en el primer estadio larval. De esta manera se estimaba la duración y la muda de un estadio inmaduro a otro.

Durante el estado de pupa no se realizó el sexaje de estas, se suspendió la alimentación, sin embargo se continuaron realizando observaciones diarias a los vasos de cría, y se mantuvieron las condiciones de temperatura antes descrita para establecer el tiempo de emergencia de adultos.

Los especímenes que emergieron fueron llevados a jaulas de muselina de 25 x 25 x 25 cm y se mantuvieron allí por espacio de tres días, luego se les proporcionó alimento; a los machos una solución azucarada saturada y a las hembras sangre de ratón sano. Los individuos permanecen en la jaula por dos días más antes de agruparlos por parejas e introducirlos en los vasos de cría para comenzar el proceso de cría de una nueva generación.

Longevidad de Adultos Machos.

Luego de lograr la primera generación (F1 y F2); se tomaron 2 cantidades establecidas de machos, separados en dos grupos; cambiando y controlando las fuentes de azúcar, para la F1 se trató con glucosa y para la F2 con fructosa, realizando observaciones diarias y llevando un registro de los individuos que mueren y en el tiempo que lo hacen.

Análisis estadístico.

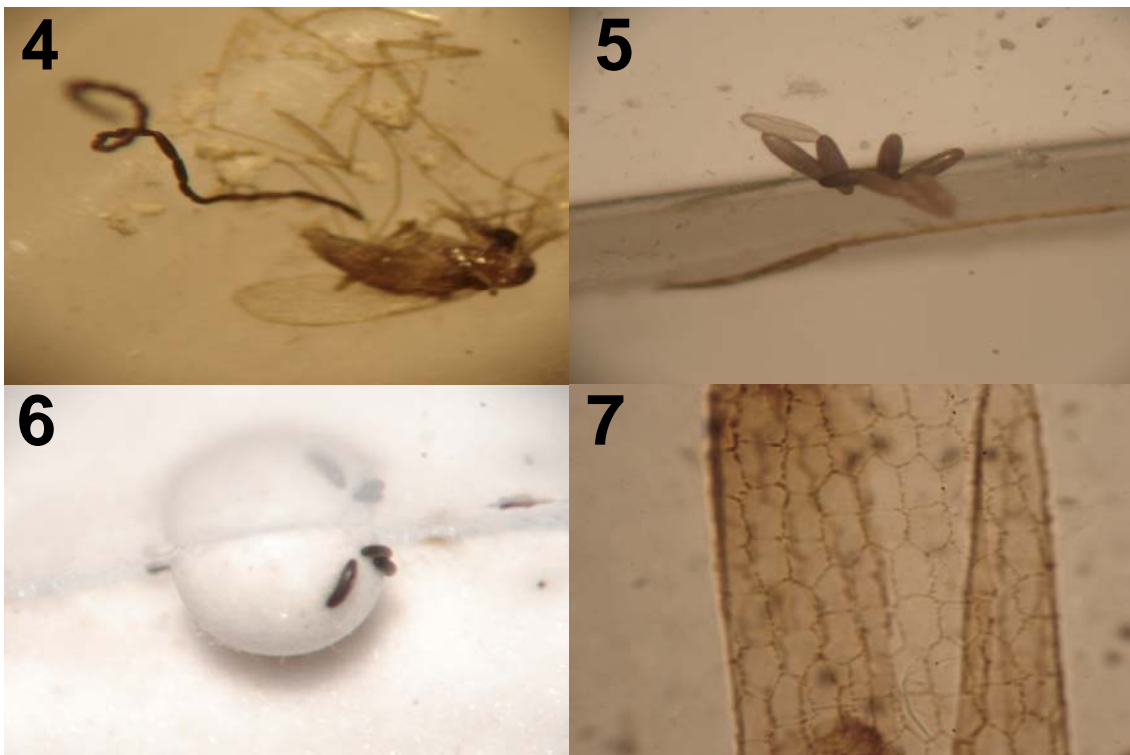
Para el análisis de cada una de las generaciones del ciclo de vida se utilizó el programa estadístico MATLAB. Se determinó el rendimiento de la colonia, el número de hembras y machos que emergen y la proporción en que lo hacen.

RESULTADOS

Descripción de los estadios inmaduros.

Huevos.

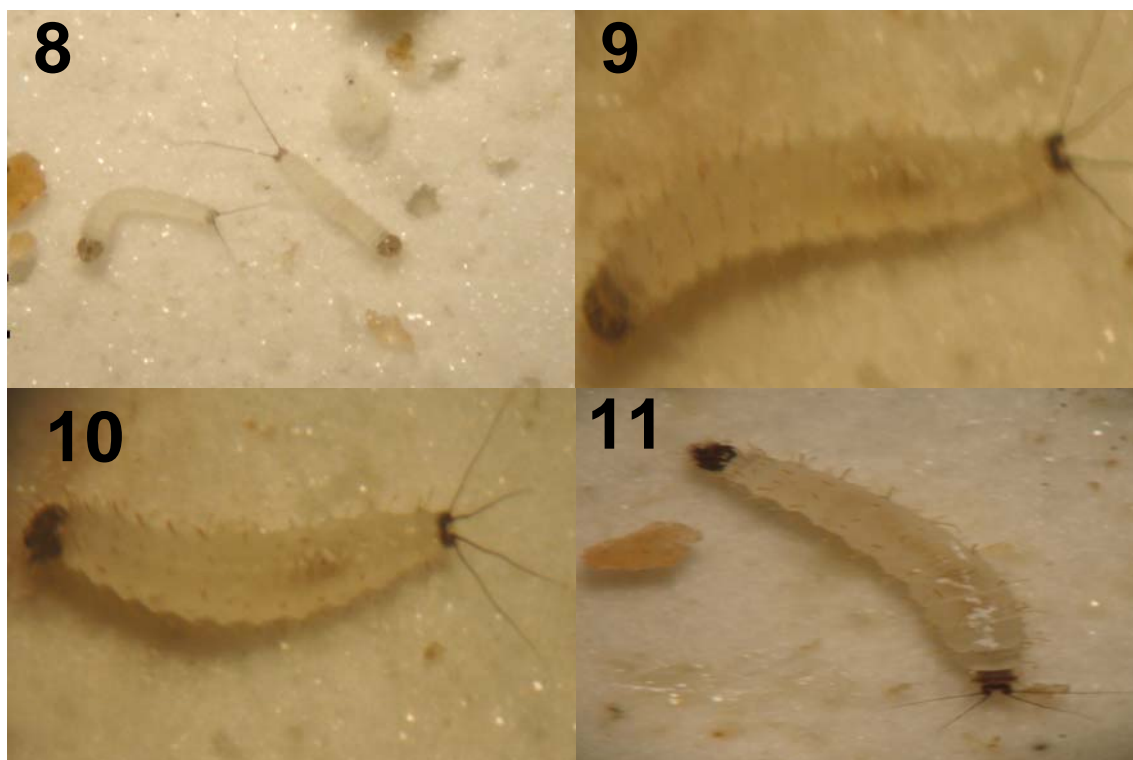
Los huevos ovipositados de *Lu. evansi*, se hallaron esparcidos de manera aleatoria sobre el sustrato en los cámara de cría, en algunas ocasiones se pudieron observar en las paredes de los recipientes (Fotografía 4, 5). En las primeras horas de haber sido ovipositados presentaron una coloración blanca y con el transcurrir del tiempo tornaron a una tonalidad negra. (Fotografía 5, 6). Son de forma elipsoidal elongada siguiendo los patrones estructurales del resto de los flebotómíneos. (Fotografía 6). En el examen al microscopio luego de la aclaración con ácido láctico y fenol en proporción 1:1 durante un día, se pudo observar la superficie de las celdas del exocorion dispuestas de manera poligonal, y algunas formas rectangulares; Ambos lados de la estructura, longitudinal y transversa forman columnas muy regulares a lo largo de toda la superficie. (Fotografía 7).



Fotografías: Huevos de *Lutzomyia evansi*; **4.** La hembra muere después de oviposición completa **5.** Huevos ovipositados en paredes del vaso, **6.** Huevos ovipositados en yeso, **7.** Exocorion con forma pentagonal.

Larvas.

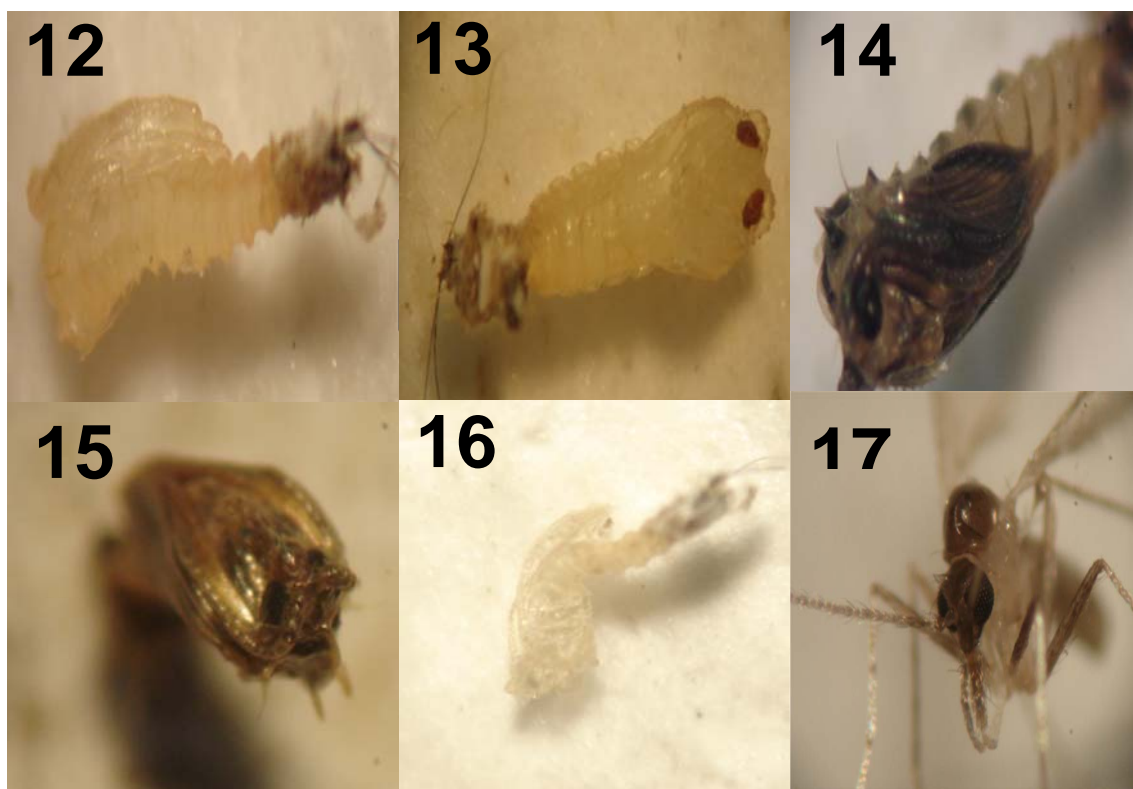
La principal característica del primer estadio larval (LI) fue la aparición de un par de setas caudales en su parte dorsal. (Fotografía 8), los individuos presentaron un cuerpo segmentado y mostraron una coloración blanca que fue invariable durante todo su desarrollo. Para el segundo estadio (LII) se observó un aumentando el número de setas caudales, de dos a cuatro, dispuestas en forma de abanico, de igual manera un incremento en el tamaño del cuerpo. (Fotografía 9). En el tercer estadio (LIII) se observó la presencia de setas caudales y un incremento mayor en la talla de los especímenes; casi el doble con respecto al estadio larval anterior. (Fotografía10). En el cuarto estadio larval (LIV), se distingue una mancha de color negro en el último segmento de la parte dorsal, contiguo a las cuatro setas caudales, lo que le permite diferenciarse con respecto al estadio anterior; durante esta fase los individuos son más robustos y pueden observarse a simple vista. (Fotografía 11).



Fotografías: Estadios larvales de *Lutzomyia evansi*; **8.** Estadio I, **9.** Estadio II, **10.** Estadio III, **11.** Estadio IV.

Pupa.

La pupa de *Lu. evansi* es de color blanco ambarino en los primeros instantes en los que se inicia esta fase del desarrollo; la exuvia, del estadio cuatro le permite fijarse al sustrato y permanecer en un ángulo aproximado de 45 grados, erguidos sobre el sustrato o suspendidos sobre las paredes del vaso. Morfológicamente, presenta una región caudal estrecha y una región distal ancha con forma de cono. (Fotografía 12). Los cambios más relevantes se dan en la coloración, ya que con el transcurrir de los días se pudieron observar tres tonalidades diferentes que señalaban el grado de maduración del individuo antes de emerger como adulto (Fotografía 13, 14, 15, 16).



Fotografías: Pupa de *Lutzomyia evansi*; **12.** Pupa de un día, **13.** Pupa con ojos pardos, **14.** Pupa en proceso de maduración (comienza a tornarse de color oscuro), **15.** Pupa lista para emergencia, **16.** Exuvia de pupa emergida, **17.** Adulto

Ciclo de vida de *Lutzomyia evansi* en las generaciones estudiadas.

Un total de tres generaciones de *Lu. evansi* fueron obtenidas bajo condiciones de laboratorio a 25°C y una humedad entre el 95- 98%.

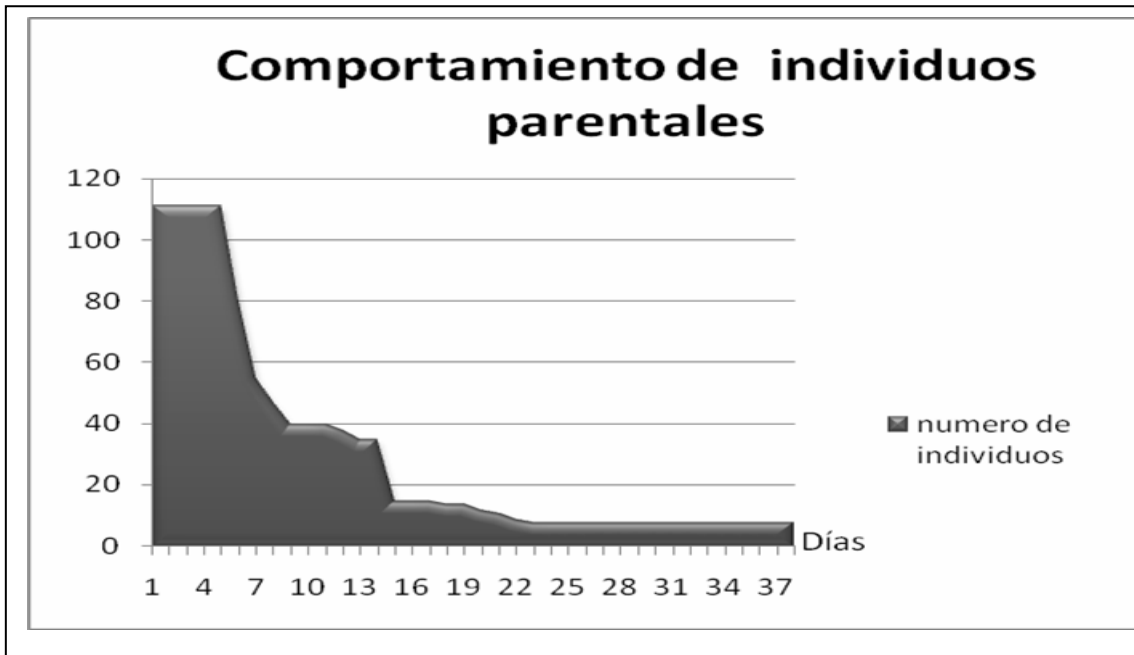
El promedio del tiempo total de desarrollo (entre la alimentación con sangre hasta la primera emergencia de adultos.) es de 40,00 días (rango = 38-45).

Los promedios para el periodo de incubación de huevo se requieren 6.75 días (6-8). Para el primer estadio larval (L1), se requirió 5.75 días (rango= 5-8); para el segundo estadio larval (L2) 5.75 días (rango= 4-7); para el tercer estadio larval (L3) 5.00 días (rango= 4-7); para el cuarto estadio larval (L4) 7 días (rango= 6- 8); estadio de pupa 9.75 días (7-17). Tabla 2.

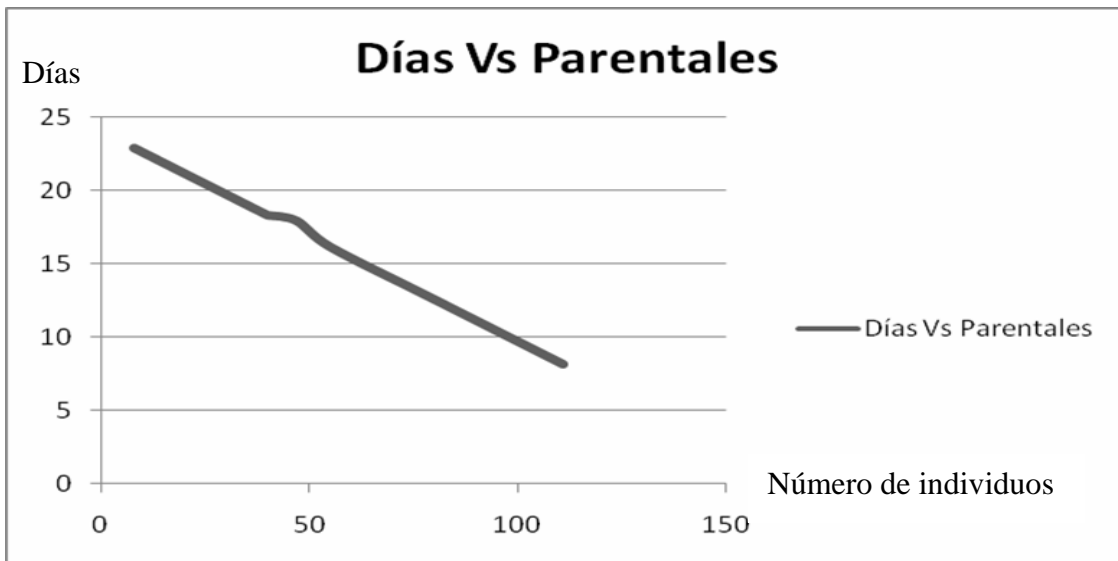
GENERACIÓN	HUEVO	L I	L II	L III	L IV	PUPA	TOTAL
PARENTAL	6	5	7	4	7	8	37
F1	8	8	5	7	7	7	42
F2	7	5	4	4	7	17	44
F3	6	5	7	5	7	7	37
Σ	27	23	23	20	28	39	
X	6.75	5.75	5.75	5	7	9.75	
RANGO	(6-8)	(5-8)	(4-7)	(4-7)	7	(7-17)	

Tabla 2. Ciclo de vida de *Lutzomyia evansi*.

La duración promedio de los estadios inmaduros de los paréntales fue la siguiente: Huevo 6 días, Larva I 5 días, larva II 7 días, larva III 4 días, larva IV 7 días, pupa 8 días. (Grafica 1 y 2).

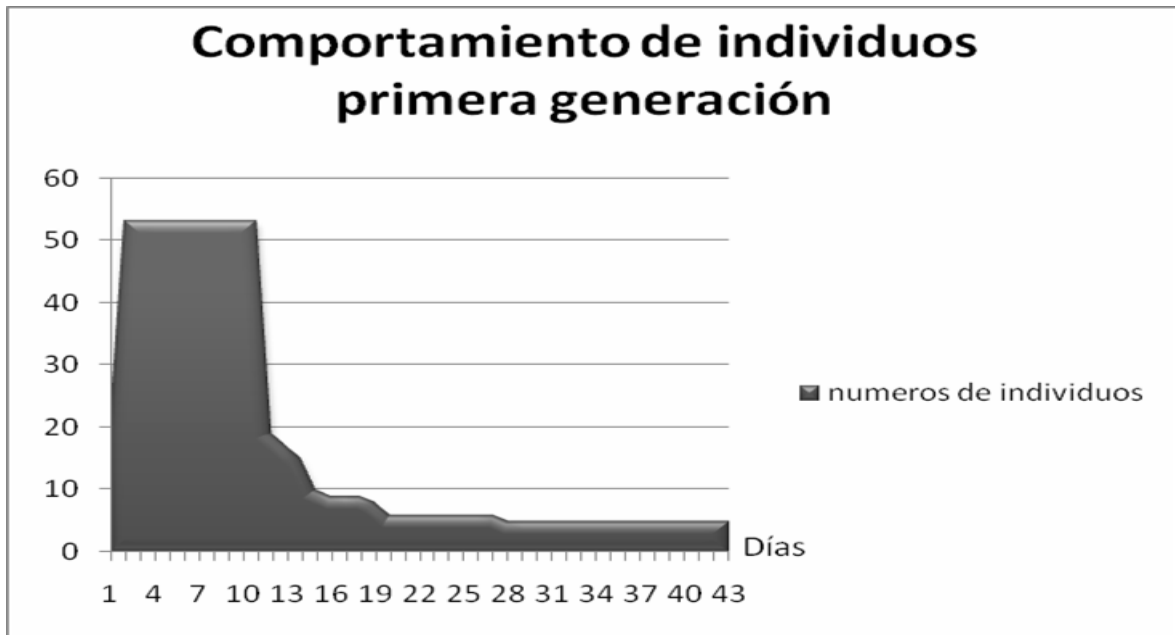


Grafica 1. Comportamiento del ciclo vida de parentales de *Lutzomyia evansi*.

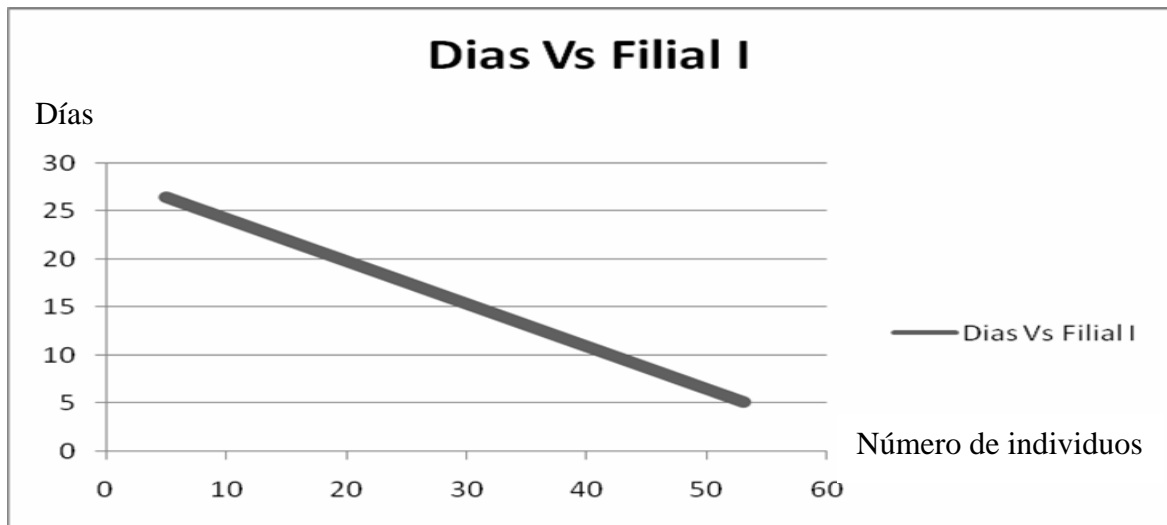


Grafica 2. Ciclo de vida ajustada de parentales de *Lutzomyia evansi*. En el eje **X** se describen el número de individuos y en el eje de la **Y** los días ajustado de duración total del ciclo biológico.

La duración promedio de los estadios inmaduros de la primera generación fue la siguiente: Huevo 8 días, Larva I 8 días, larva II 5 días, larva III 7 días, larva IV 7 días, pupa 7 días. (Grafica 3 y 4).

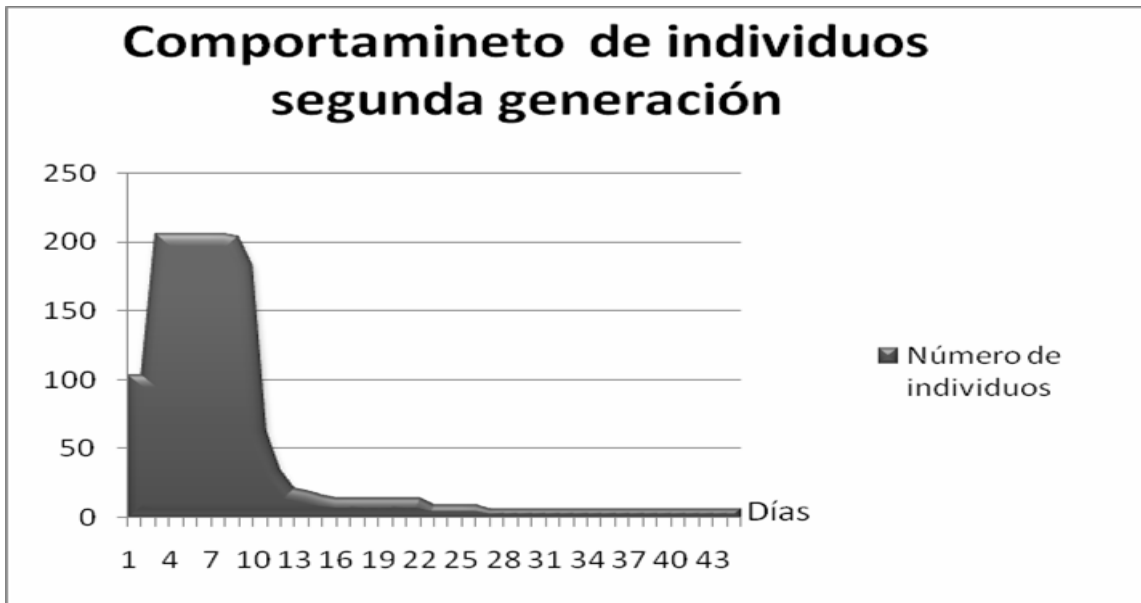


Grafica 3. Comportamiento del ciclo vida de la primera generación de *Lutzomyia evansi*.

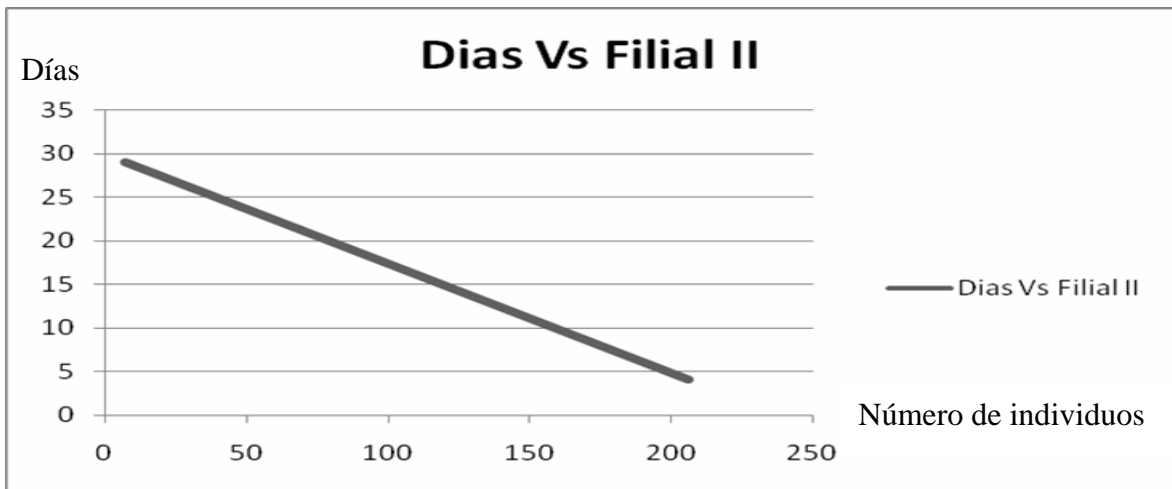


Grafica 4. Ciclo de vida ajustado de primera generación de *Lutzomyia evansi*. En el eje X se describen el número de individuos pertenecientes a la Filial I y en el eje de la Y los días ajustado de duración total del ciclo biológico.

La duración promedio de los estadios inmaduros de la segunda generación fue la siguiente: Huevo 7 días, Larva I 5 días, larva II 4 días, larva III 4 días, larva IV 7 días, pupa 17 días. (Grafica 5 y 6).

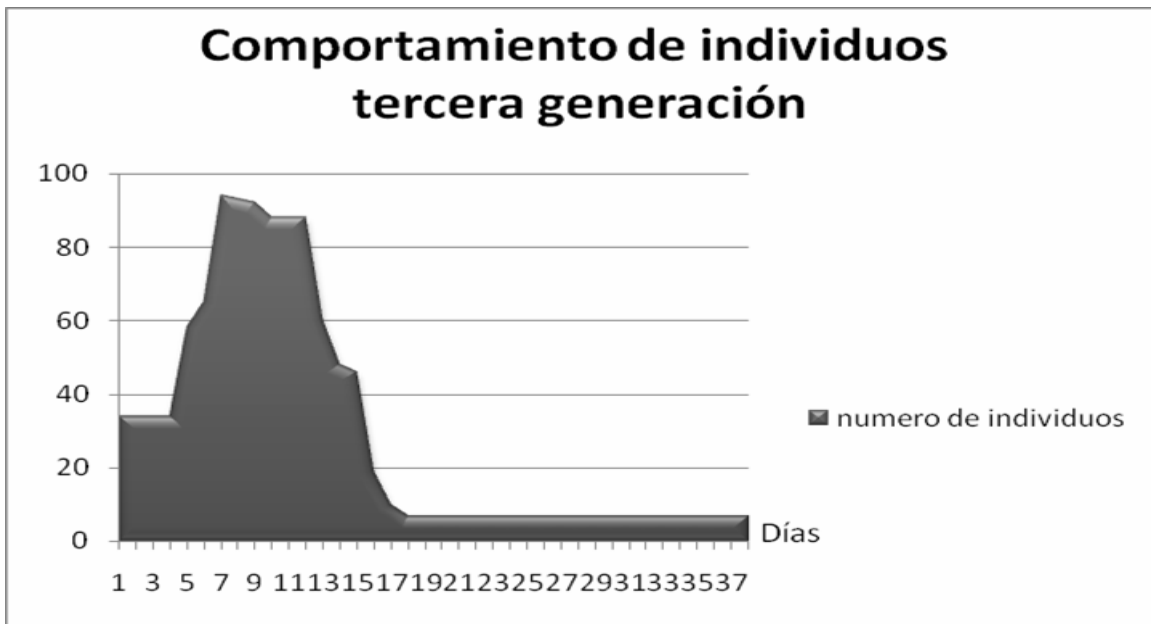


Grafica 5. Comportamiento del ciclo vida de la segunda generación de *Lutzomyia evansi*.

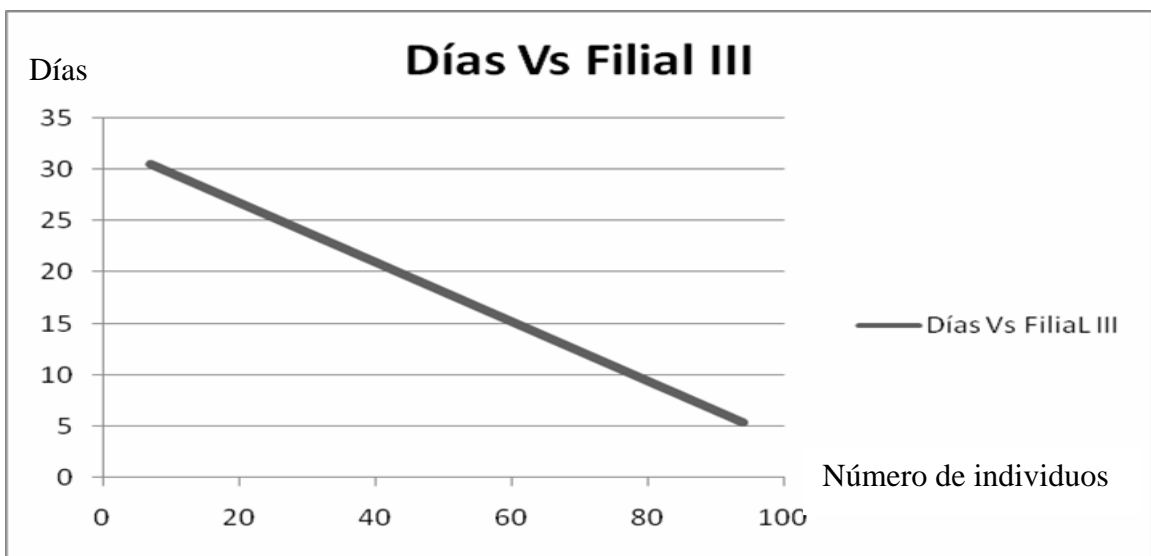


Grafica 6. Ciclo de vida de segunda generación de *Lutzomyia evansi* En el eje **X** se describen el número de individuos pertenecientes a la Filial II y en el eje de la **Y** los días ajustado de duración total del ciclo biológico.

La duración promedio de los estadios inmaduros de la tercera generación fue la siguiente: Huevo 6 días, Larva I 5 días, larva II 7 días, larva III 5 días, larva IV 7 días, pupa 7 días. (Grafica 7 y 8).



Grafica 5. Comportamiento del ciclo vida de la tercera generación de *Lutzomyia evansi*.



Grafica 8. Ciclo de vida de tercera generación de *Lutzomyia evansi*. En el eje X se describen el número de individuos pertenecientes a la Filial III y en el eje Y los días ajustado de duración total del ciclo biológico.

En las tres generaciones se observó un bajo porcentaje de huevos eclosionados, el mayor porcentaje de mortalidad se observó entre el primer estadio larval (L1) y la mitad del segundo estadio larval (L2). La mortalidad sólo disminuyó hasta la segunda mitad del segundo estadio larval.

Establecimiento de la colonia *Lutzomyia evansi*

El establecimiento de la colonia de *Lutzomyia evansi* fue iniciada con 13 hembras silvestres alimentadas, de éstas, un total de 4 (30,76%) ovipositaron, de las cuales 2 (50%) realizaron oviposición completa sin retención de huevos. De los individuos silvestres se obtuvo 111 huevos, originándose 8 adultos, en una relación macho-hembra de 1:1,66; con un rendimiento de 7.2% con respecto al total de huevos hasta adulto.

De las hembras de la primera generación, 4 fueron alimentadas, de ellas, 3 ovipositaron de forma completa (100%) y no presentaron retención de huevos. Durante la primera generación se obtuvo un total de 53 huevos, de los cuales, emergieron 15 adultos en una proporción macho-hembra 1:1,5 y un rendimiento de 28,3%.

Para la segunda generación se alimentaron 7 hembras, 5 realizaron oviposición completa y una hembra incompleta. Se obtuvieron 206 huevos, originándose 15 adultos en una relación macho-hembra 1:7,5 con un rendimiento de 8,25%.

Para la tercera generación se alimentaron 9 hembras de las cuales 6 ovipositaron y tres retuvieron huevos, se obtuvo 94 huevos, originándose 7 adultos, con la relación macho-hembra 1: 1, 33 y un rendimiento de 7,44%. En cuanto a las proporciones entre sexos en las tres generaciones, las hembras siempre presentaron una mayor cantidad de individuos a diferencia de los machos. (Tabla 3).

PRODUCTIVIDAD DE *Lutzomyia evansi*.

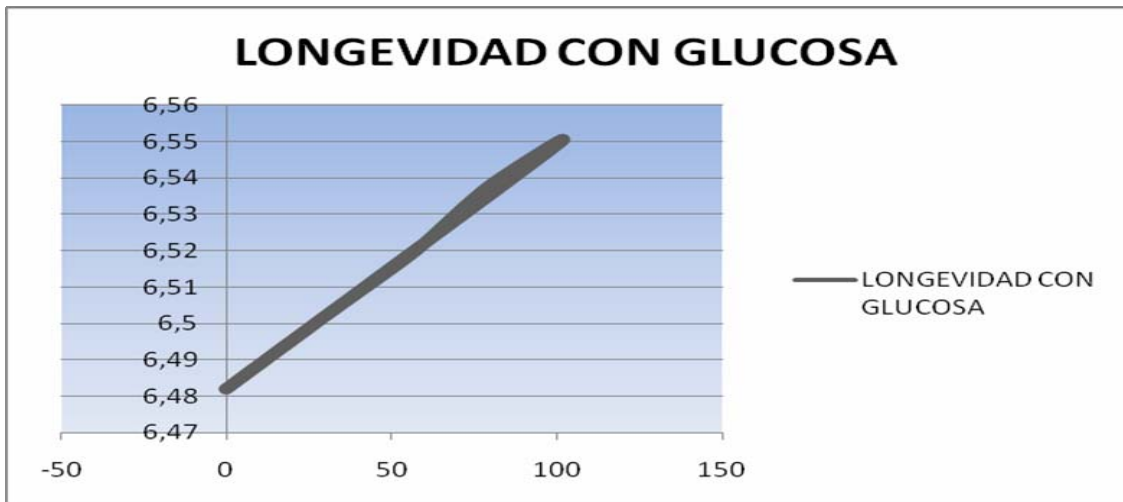
Grupo	Hembras alimentada	N(%) oviposición	N(%) Oviposición completa	N(%) Hembra Reten. Huevos	N(%) Huevo retenido	N(%) Total huevo	N Total de adultos	N(%) Macho	N(%) Hembra	Relación Macho-Hembra.	% Rendimiento	% Mortalidad
Silvestre	13	4 (30.76)	2 (50)	2 (50)	6 (5.40)	111	8	3 (35.5)	5 (62.5)	1:1.6	7.2	92.80
F1	4	3 (7.5)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	53	15	6 (40)	9 (60)	1:1.5	28.3	71.70
F2	7	6 (83.71)	5 (80)	1 (20)	43 (20.8)	206	17	2 (28.57)	15 (71.42)	1:7.5	8.25	91.75
F3	9	6 (66.60)	3 (33.33)	3 (33.33)	39 (41.48)	94	7	3 (42.85)	4 (57.14)	1:1.33	7.44	92.56

Tabla 3. Productividad de *Lutzomyia evansi*.

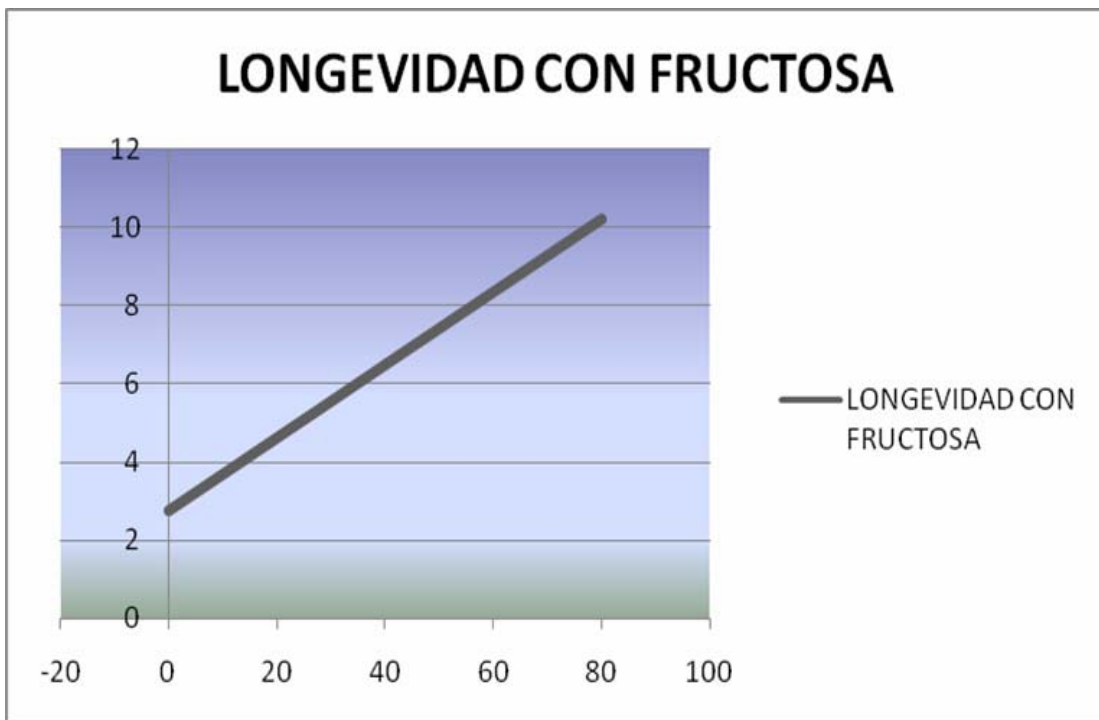
Evaluación del azúcar en la longevidad de adultos de *Lutzomyia evansi*.

A los adultos de cada generación se les suministró una dieta de azúcar glucosa (azúcar de cocina), alcanzando un máximo de sobrevivencia de 8 días (Grafica 9); mientras que al administrarle una dieta de fructosa sobrevivían un máximo de 12 días. (Grafica 10).

ECUACION AJUSTADA(glucosa)	$Y=6,482 + 0,000672X$
ECUACION AJUSTADA(fructosa)	$2,764 + 0,0934X$
Glucosa	Fructosa
8	12



Grafica 9. Longevidad de *Lutzomyia evansi* con glucosa. En el eje Y muestran los valores ajustados correspondiente a los días de supervivencia de los especímenes criados en laboratorio y en el eje de la X el porcentaje de mortalidad de individuos.



Grafica 10. Longevidad de *Lutzomyia evansi* con fructosa. En el eje Y muestran los valores ajustados correspondientes a los días de supervivencia de los especímenes criados en laboratorio y en el eje de la X el porcentaje de mortalidad de individuos.

DISCUSION.

Aunque han transcurrido cerca de noventa años desde el inicio del estudio y la colonización de flebotomíneos transmisores de *Leishmania* bajo condiciones de laboratorio, sólo en la última década se ha logrado estandarizar y aplicar metodologías exitosas en Colombia, lo que ha permitido ampliar el conocimiento del ciclo de vida, hábitos de alimentación y apareamiento, sitios de posturas, temperaturas y humedad relativa óptimas, para el desarrollo de los estadios de algunas de las especies de *Lutzomyia* presentes en el territorio nacional. Las investigaciones realizadas enriquecen el conocimiento de la biología de estos vectores.

Para la especie colonizada en el presente estudio, *Lutzomyia evansi*, uno de los factores que contribuyó a la escasa cantidad de individuos producidos en cada generación fue la retención de huevos. Es posible que, en condiciones de laboratorio los rango de temperatura y humedad relativa establecidos hayan sido un factor de estrés que afecta el comportamiento de la oviposición, considerando los trabajos de Nieves (1999) que revelaron que el proceso de oviposición para algunas especies de *Lutzomyia*, tiene una rutina muy dispendiosa donde intervienen interacciones ambientales y bioquímicas que son muy difíciles de reproducir en laboratorio. Por otra parte, las hembras gastan mucho tiempo en encontrar su microhabitat, para luego ovipositar sus huevos uno a uno de manera aleatoria, lo que las dejaría exhaustas y apenas ovipositando un número limitado de huevos, en ocasiones sin que puedan terminar la postura y en otras escasamente terminándola pero sin sobrevivir para una segunda ingesta de sangre. En la presente investigación, el inconveniente no puede necesariamente retribuirse al espacio, teniendo en cuenta que estos son insectos de vuelo corto y no suelen dejar sus huevos muy separados uno del otro; lo que conllevaría a asumir que el factor determinante que puede influir directamente en la retención de huevos es la textura del sustrato de oviposición, el cual no favorece el tigmotropismo para estimular una oviposición adecuada y completa de los huevos. Los valores máximos y mínimos para el número de huevos retenidos por las hembras en las tres

generaciones estuvo representado entre 0% en la primera generación y 41.48% en la tercera generación.

El valor promedio del ciclo biológico para *Lu. evansi* fue de 40.00 hasta la emergencia de los adultos, el cual se encuentra cercano al rango determinado para esta especie. Montoya y colaboradores (1998), registraron una duración promedio del ciclo de vida para *Lu. evansi* de 41,8 días desde la ingesta sanguínea hasta emergencia del primer adulto; mientras que Mirsa (1953) encontró para *Lu. evansi* un tiempo de desarrollo entre 31 y 51 días; por lo que el presente resultado confirma la fortaleza de la especie para sobrevivir en condiciones artificiales.

Todos los individuos vivos, desde parentales hasta la F3 de la colonia de *Lutzomyia evansi* iniciaron con cantidades grandes de huevos y posterior a los días de postura (5-8), comenzó a presentarse entre el día 9 y 16 un decrecimiento importante en la sobrevivencia de los individuos, correspondiente a los estadios LI y LII, a pesar de que la temperatura y la humedad relativa mantenida durante el estudio fueron adecuadas (98% Hr y 25-27 °C de Temperatura) para las larvas de esta especie. Montoya-Lerma (1998) confirma que en esta especie los estadios LI y LII son los más frágiles al ataque de agentes externos como hongos y ácaros, así mismo sudoraciones producto de la humedad dentro de las paredes de los vasos que tienden a ahogar las larvas en las gotas de agua, de igual manera aquellos individuos que no eclosionan porque no han alcanzado una maduración completa dentro del huevo y permanecen en estado de hibernación. La mortalidad en los estadios LIII y LIV fue más baja, debido a que los individuos sobrevivientes se lograron adaptar a las condiciones de laboratorio y lograron resistir el ataque de los agentes contaminantes. Estas muertes pueden deberse a factores de accidentales, sin embargo, son evidentemente más bajas en comparación con los primeros estadios.

Para la segunda generación del estudio se muestra una extensión del ciclo por causa en un descenso menor de 95% en la humedad relativa, lo que ocasionó que las larvas en estadio L IV disminuirán su metabolismo, retardando el paso

a pupa, lo que pone de manifiesto que un cambio mínimo en las condiciones ambientales retardan el ciclo, mas no lo interrumpen ya que en el momento que estas condiciones ideales se restablecen, los especímenes continúan su desarrollo.

Durante todo el proceso de establecimiento y mantenimiento de la colonia de *Lu. evansi* cada generación se comportó de manera uniforme, exponiendo cantidades de huevos e individuos finales por cada filial. Todas las generaciones se vieron afectadas por los mismos factores negativos (humedad, temperatura, contaminación etc.). En consecuencia se evidenció un decrecimiento de individuos en todas las generaciones a medida que transcurrió el tiempo.

El proceso de colonizar *Lutzomyia evansi* llevado a cabo en el laboratorio inicio con 13 hembras silvestres y que llegó hasta la tercera generación fue exitoso independientemente de la disminuida cantidad de individuos obtenidos por cada generación, esto se puede sustentar en el hecho de que trabajos realizados de Herting y Jonson (1961) establecieron una colonia de *Lu. trinidadensis* a partir de 12 hembras, luego Beach y colaboradores (1983) colonizaron *P. martini* a partir de 12 hembras y con un porcentaje de sobrevivencia de oviposición de 26% y Nieves (1995) coloniza exitosamente de *Lu. migonei* con 11 hembras silvestres.

La alta mortalidad a nivel de productividad de la colonia ocurrió en los primeros estadios larvales, probablemente no solo por contaminación externa sino a deficiencias en la alimentación, la dieta descrita por Young y colaboradores y modificada por Ferro pudo influir causando insuficiencias en el requerimiento proteico de las larvas. Por otra parte durante el ciclo de vida, la colonia no se vio afectada de manera severa por el ataque de ácaros ya que los vasos permanecían cerrados herméticamente sin utilizar mayas de tela o banda elásticas, lo que condujo a un aumento en la humedad interna de cada vaso de cría, cuando la humedad es de 98% el hongo puede ser controlado y las larvas pueden soportar esta humedad, como lo demuestran Christopher y colaboradores (1926) en una colonia con similares condiciones de la especie *P.*

argentipes, una humedad menor ocasiona que el hongo proliferare de manera excesiva y cause una gran mortalidad a nivel de los estadios larvales LI y LII, sin embargo el hongo fue un factor relevante dentro de cada generación lo que hizo necesario el cambio diario del alimento.

Para medir la longevidad de los especímenes criados en laboratorio se tomó una pareja de machos pertenecientes a la F1 y se introdujeron en la jaula de mantenimiento administrando primero una vía de azúcar de cocina como fuente de glucosa, con esta se logro que los individuos sobrevivieran un total de 8 días; por otra parte finalizada la F2 se tomo la misma cantidad de machos y se les administro una vía de azúcar fructosa (jugo de manzana) alcanzando una sobrevivencia de 12 días como lo muestran las graficas de longevidad, lo que confirma los trabajos de Montoya-Lerma donde para *Lutzomyia evansi* específicamente logra una sobrevivencia de 8 días administrando esta misma vía de azúcar. Dado que esta es la fuente más factible para administrar a flebótomos en laboratorio ya que la fructosa tarda más en activarse, lo que hace que se prolongue el tiempo de los especímenes, caso contrario ocurre con la glucosa que al activarse más rápido su acción es más corta y puede llegar al punto de un estancamiento como se puede observar en las graficas de longevidad donde los valores de glucosa no exceden los 6.56, mientras que para fructosa alcanza valores de 12 todo esto en función de días; igualmente las concentraciones en las que se les administre no afectan la longevidad de los adultos.

La productividad de las tres generaciones mostró un decrecimiento a medida que se pasaba a otra generación, esta disminución en la productividad de individuos puede ser debida a la reducción de la vitalidad, como consecuencia a una disminución en la producción de individuos; no significando que la colonia no fuese exitosa ya que se produjeron individuos para la siguiente generación.

CONCLUSIONES

- El mantener tres generaciones de *Lutzomyia evansi*, bajo condiciones controladas en laboratorio, demuestran es una especie colonizable, ya que logra adaptarse al ambiente artificial, resistir a los factores contaminantes, reproducirse y producir nuevos individuos.
- La textura de yeso utilizado como sustrato en la oviposición puede llegar a ser un factor determinante en el momento de la puesta por que puede influir en la retención de huevos en hembras *Lutzomyia evansi*, afectando de manera parcial la productividad de la colonia bajo condiciones de laboratorio.
- Los datos obtenidos, confirman que las etapas más frágiles del ciclo biológico de *Lutzomyia evansi*, está comprendida entre LI y LII, en los cuales la mortalidad de individuos es la más alta de todo su ciclo biológico, por otra parte los estadios mas resistentes a factores contaminantes de tipo fúngico son los estadios LIII y L IV.
- La capacidad que posee la pupa de *Lutzomyia evansi* de reducir su requerimiento metabólico en laboratorio le permite a esta especie mantenerse hasta encontrar las condiciones ambientales adecuadas para la salida del adulto; en campo esta adaptación le permitiría a los especímenes una mayor sobrevivencia durante periodos cortos de sequía.
- Se logro establecer que la mejor vía para proporcionar una mayor sobrevivencia de los adultos macho del *Lutzomyia evansi* es la fructosa; no solo porque esta es la forma en que estos especímenes la consumen en campo, también se hace un aprovechamiento del recurso energético de la glucosa que en su vía de síntesis va proporcionando a los individuos de la colonia el requerimiento alimenticio más estable en longevidad.

- Puede establecerse colonia de individuos del genero *Lutzomyia* a partir de pocos individuos silvestres, manteniendo las condiciones adecuadas en su microhabitat para su desarrollo.
- El tratamiento con lactofenol se convierte en una alternativa para analizar las celdas de exocorion de la superficie de los huevos de los individuos de *Lutzomyia evansi*.

RECOMENDACIONES

- Establecer colonias de especies de *Lutzomyia* con el fin realizar estudios de susceptibilidad, infección controlada y competencia vectorial; donde se pueda experimentar con los estadios inmaduros.
- Optimizar las condiciones de laboratorio proponemos trabajar experimentando con cambios en la textura del sustrato para las cámaras de cría, tratar con diferentes dietas. Estandarización de las condiciones de temperatura, humedad y fotoperiodos que permitan una mayor productividad de la colonia.
- Realizar estudios donde se busque encontrar cuales son los factores que afectan los estadios inmaduros mas susceptibles LI y LII que proporcionen un mejor rendimiento en las colonias de laboratorio.
- Realizar la clave de los estadios inmaduros de las especies de *Lutzomyia* de la Costa Atlántica.

ANEXOS

TABLA 3: ANALISIS PARENTALES

Y días	X (iv)	(X (iv)-Xm)	((X (iv)-Xm) ²)	Y-Ym	(Y-Ym) ²	(X (iv)) ²	X (iv)*Y
1	111	79,47	6316,07	-18,5	342,25	12321	111
2	111	79,47	6316,07	-17,5	306,25	12321	222
3	111	79,47	6316,07	-16,5	272,25	12321	333
4	111	79,47	6316,07	-15,5	240,25	12321	444
5	111	79,47	6316,07	-14,5	210,25	12321	555
6	80	48,47	2349,70	-13,5	182,25	6400	480
7	55	23,47	551,01	-12,5	156,25	3025	385
8	47	15,47	239,43	-11,5	132,25	2209	376
9	40	8,47	71,80	-10,5	110,25	1600	360
10	40	8,47	71,80	-9,5	90,25	1600	400
11	40	8,47	71,80	-8,5	72,25	1600	440
12	38	6,47	41,91	-7,5	56,25	1444	456
13	35	3,47	12,07	-6,5	42,25	1225	455
14	35	3,47	12,07	-5,5	30,25	1225	490
15	15	-16,53	273,12	-4,5	20,25	225	225
16	15	-16,53	273,12	-3,5	12,25	225	240
17	15	-16,53	273,12	-2,5	6,25	225	255
18	14	-17,53	307,17	-1,5	2,25	196	252
19	14	-17,53	307,17	-0,5	0,25	196	266
20	12	-19,53	381,28	0,5	0,25	144	240
21	11	-20,53	421,33	1,5	2,25	121	231
22	9	-22,53	507,43	2,5	6,25	81	198
23	8	-23,53	553,49	3,5	12,25	64	184
24	8	-23,53	553,49	4,5	20,25	64	192
25	8	-23,53	553,49	5,5	30,25	64	200
26	8	-23,53	553,49	6,5	42,25	64	208
27	8	-23,53	553,49	7,5	56,25	64	216
28	8	-23,53	553,49	8,5	72,25	64	224
29	8	-23,53	553,49	9,5	90,25	64	232
30	8	-23,53	553,49	10,5	110,25	64	240
31	8	-23,53	553,49	11,5	132,25	64	248
32	8	-23,53	553,49	12,5	156,25	64	256
33	8	-23,53	553,49	13,5	182,25	64	264
34	8	-23,53	553,49	14,5	210,25	64	272
35	8	-23,53	553,49	15,5	240,25	64	280
36	8	-23,53	553,49	16,5	272,25	64	288
37	8	-23,53	553,49	17,5	306,25	64	296
38	8	-23,53	553,49	18,5	342,25	64	304
19,5	31,53						
741	1198	0,00	46601,47	0	4569,5	84370	11318

Y=27,647-0,258X

TABLA 4: ANALISIS DE INDIVIDUOS DE LA FILIAL UNO

Y días	X(im)	(X(im)) ²	X(im)-Xm	(X(im)-Xm) ²	X(im)*Y	Y-Ym	(Y-Ym) ²
1	0	0	-1,26	1,60	0	-18,5	342,25
2	0	0	-1,26	1,60	0	-17,5	306,25
3	0	0	-1,26	1,60	0	-16,5	272,25
4	0	0	-1,26	1,60	0	-15,5	240,25
5	0	0	-1,26	1,60	0	-14,5	210,25
6	0	0	-1,26	1,60	0	-13,5	182,25
7	0	0	-1,26	1,60	0	-12,5	156,25
8	0	0	-1,26	1,60	0	-11,5	132,25
9	0	0	-1,26	1,60	0	-10,5	110,25
10	0	0	-1,26	1,60	0	-9,5	90,25
11	0	0	-1,26	1,60	0	-8,5	72,25
12	34	1156	32,74	1071,70	408	-7,5	56,25
13	2	4	0,74	0,54	26	-6,5	42,25
14	2	4	0,74	0,54	28	-5,5	30,25
15	5	25	3,74	13,96	75	-4,5	20,25
16	1	1	-0,26	0,07	16	-3,5	12,25
17	0	0	-1,26	1,60	0	-2,5	6,25
18	0	0	-1,26	1,60	0	-1,5	2,25
19	1	1	-0,26	0,07	19	-0,5	0,25
20	2	4	0,74	0,54	40	0,5	0,25
21	0	0	-1,26	1,60	0	1,5	2,25
22	0	0	-1,26	1,60	0	2,5	6,25
23	0	0	-1,26	1,60	0	3,5	12,25
24	0	0	-1,26	1,60	0	4,5	20,25
25	0	0	-1,26	1,60	0	5,5	30,25
26	0	0	-1,26	1,60	0	6,5	42,25
27	0	0	-1,26	1,60	0	7,5	56,25
28	0	0	-1,26	1,60	0	8,5	72,25
29	1	1	-0,26	0,07	29	9,5	90,25
30	0	0	-1,26	1,60	0	10,5	110,25
31	0	0	-1,26	1,60	0	11,5	132,25
32	0	0	-1,26	1,60	0	12,5	156,25
33	0	0	-1,26	1,60	0	13,5	182,25
34	0	0	-1,26	1,60	0	14,5	210,25
35	0	0	-1,26	1,60	0	15,5	240,25
36	0	0	-1,26	1,60	0	16,5	272,25
37	0	0	-1,26	1,60	0	17,5	306,25
38	0	0	-1,26	1,60	0	18,5	342,25
741	48	1196	0,00	1135,37	641	0	4569,5
19,5	1,26						

Y=19,827-0,259X

TABLA 5: ANALISIS DE INDIVIDUOS DE LA FILIAL DOS

Y días	X(im)	X(im)-Xm	(X(im)) ²	(X(im)-Xm) ²	X(im)*Y	Y-Ym	(Y-Ym) ²
1	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-22	484
2	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-21	441
3	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-20	400
4	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-19	361
5	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-18	324
6	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-17	289
7	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-16	256
8	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-15	225
9	2	-0,58	4,00	0,33	18,00	-14	196
10	21	18,42	441,00	339,38	210,00	-13	169
11	40	37,42	1600,00	1400,42	440,00	-12	144
12	25	22,42	625,00	502,76	300,00	-11	121
13	13	10,42	169,00	108,62	169,00	-10	100
14	2	-0,58	4,00	0,33	28,00	-9	81
15	3	0,42	9,00	0,18	45,00	-8	64
16	2	-0,58	4,00	0,33	32,00	-7	49
17	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-6	36
18	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-5	25
19	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-4	16
20	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-3	9
21	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-2	4
22	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	-1	1
23	5	2,42	25,00	5,87	115,00	0	0
24	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	1	1
25	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	2	4
26	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	3	9
27	3	0,42	9,00	0,18	81,00	4	16
28	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	5	25
29	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	6	36
30	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	7	49
31	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	8	64
32	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	9	81
33	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	10	100
34	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	11	121
35	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	12	144
36	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	13	169
37	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	14	196
38	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	15	225
39	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	16	256
40	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	17	289
41	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	18	324
42	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	19	361
43	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	20	400
44	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	21	441
45	0	-2,58	0,00	6,64	0,00	22	484
23	2,58						
1035	116	0,00	2890,00	2590,97778	1438	0	7590

Y = 24.22 - 0.474X

TABLA 6: ANALISIS DE INDIVIDUOS DE LA FILIAL TRES

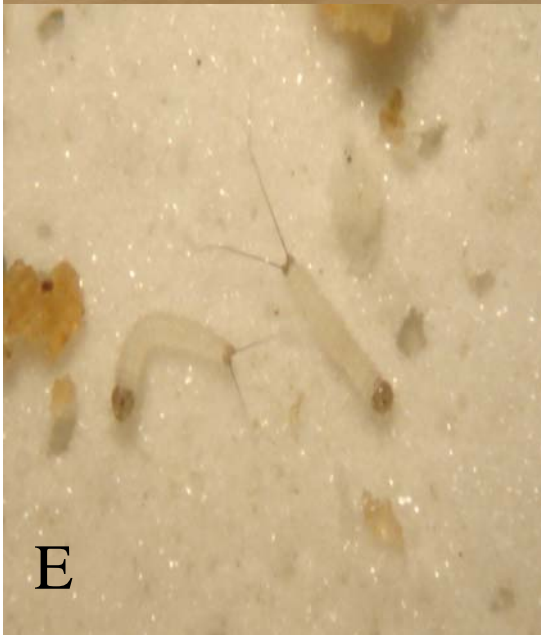
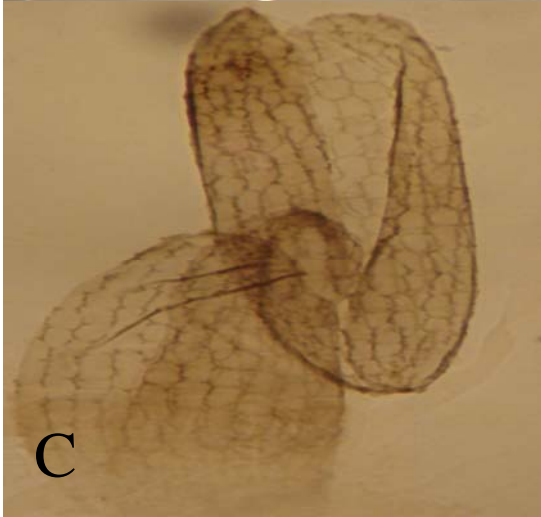
Y días	X (iv)	(X (iv)-Xm)	((X (iv)-Xm) ²)	Y-Ym	(Y-Ym) ²	(X (iv)) ²	X (iv)*Y
1	94	61,04	3726,42	61,044	3726,4242	8836	94
2	94	61,04	3726,42	61,044	3726,4242	8836	188
3	94	61,04	3726,42	61,044	3726,4242	8836	282
4	94	61,04	3726,42	61,044	3726,4242	8836	376
5	94	61,04	3726,42	61,044	3726,4242	8836	470
6	94	61,04	3726,42	61,044	3726,4242	8836	564
7	94	61,04	3726,42	61,044	3726,4242	8836	658
8	93	60,04	3605,34	60,044	3605,33531	8649	744
9	92	59,04	3486,25	59,044	3486,24642	8464	828
10	88	55,04	3029,89	55,044	3029,89086	7744	880
11	88	55,04	3029,89	55,044	3029,89086	7744	968
12	88	55,04	3029,89	55,044	3029,89086	7744	1056
13	60	27,04	731,40	27,044	731,401975	3600	780
14	48	15,04	226,34	15,044	226,335309	2304	672
15	46	13,04	170,16	13,044	170,157531	2116	690
16	16	-16,96	287,49	-16,956	287,490864	256	256
17	10	-22,96	526,96	-22,956	526,957531	100	170
18	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	126
19	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	133
20	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	140
21	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	147
22	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	154
23	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	161
24	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	168
25	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	175
26	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	182
27	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	189
28	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	196
29	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	203
30	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	210
31	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	217
32	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	224
33	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	231
34	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	238
35	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	245
36	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	252
37	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	259
38	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	266
39	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	273
40	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	280
41	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	287
42	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	294
43	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	301
44	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	308
45	7	-25,96	673,69	-25,956	673,690864	49	315
23	32,96						
				3,7659E-			
1035	1483	0,00	63071,91	13	63071,9111	111945	15850

y= 32,537- 0,2894x

**TABLA No 7 ANALISIS AJUSTADO DE LAS VIAS DE AZUCAR
SUMINISTRADAS A INDIVIDUOS DE *Lutzomyia evansi* PERTENECIENTES
A LA COLONIA DE LABORATORIO.**

Y (Dias)	X1(Glucosa)	Y (Dias)	X2(Fructosa)
6,482	0	2,764	0
6,482	0	2,764	0
6,482	0	2,764	0
6,502	30	2,764	0
6,515	50	4,632	20
6,522	60	6,5	40
6,538	80	6,5	40
6,549	100	6,5	40
6,482	0	10,23	80
6,482	0	10,23	80
6,482	0	10,23	80
6,482	0	12,104	100

FOTOGRAFÍAS ANEXAS.



A. Retención de huevos, B. Acaro, C. Estructura corionica, D. Adulto, E. Estadio larval I, F. Estadio larval IV.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- **Alvar J.** Las Leishmaniasis: De la biología al control, Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis, Servicio de Parasitología Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III Madrid 2ª edición. 2001.
- **Barreto M, Burbano M, Barreto P,** Hallazgos nuevos en la distribución geográfica de *warileyay brumptomyia*(diptera: psychodidae) en el suroeste de colombia, Acta biol. Colomb. Vol 12 No. 2 Bogotá Jul/Dic. 2006.
- **Beach. R., Young. D., Hill. G.** New phlebotomine sandfly colonies: Rearing *Phlebotomus martíni*, *Sergentomyia senwetter* and *Sergentomyia africana* (Diptera: Psychodidae). Journal Medical Entomology; 20: 579-584.1983.
- **Bejarano, E. E.** Lista actualizada de los psicódidos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. *Folia Entomol. Mex.*, 45(1): 47- 56. 2006.
- **Botero D, Restrepo M.** Parasitosis Humanas. 3ª edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 1998.
- **Cabrera, O; Ferro, C.** Ciclo de vida de *Lutzomyia spinicrassa*, *L. quasitowsendi* y *L. youngi*, especies del grupo *verrucarum* (Díptera: Psychodidae). Actual. Biol.22 (73): 225-232, 2000.
- **Cabrera, O; Neira, M; Bello, F; Ferro, C.** Ciclo de vida y colonización de *Lutzomyia ovallesi* (Díptera: Psychodidae), vector de Leishmania sp. en América Latina. Biomédica; 19 (3):223-229. 1999.

- **Christensen B. H.** Colonization of *Lutzomyia trinidadensis* and *L. vespertilionis* (Díptera: Psychodidae). Annals of the Entomological Society of America; 65(3): 683-686.1972.
- **Christophers. S.R., Shortt. H.E. & Barraud. P.j.** Technique employed in breeding *Phlebotomus argentipes* in Assam. Indian Medical Research Memories; (4) 173- 175. 1926.
- **Cochero B, S.** Papel de *Lutzomyia evansi* (Diptera: Phlebotominae) como vector de Leishmaniasis visceral en un foco de los Montes de María. Trabajo de Grado (Biólogo). Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en Biotecnología 2002.
- **Desjeux P.** Human Leishmaniasis: Epidemiology and public health aspect. World Health Health statist Quart; 45: 267-75.1992.
- **Duckhouse, D.A** Psychodidae (diptera, Nematocera) of south Chile, subfamilies Sycoracinae and trychomyiinae .Trans Roy. Ent .Soc.Lond.124:231-268. 1972.
- **Duckhouse, D.A** A catalogue of the Diptera of the Americas south of the Unites States. 6A. Family Psychodidea, subfamilies Bruchomyiinae, Trychomyiinae, Sycoracinae, and Psychodine.Mus.Zool.Univ S.Paulo 29p.1973
- **Fairchild, G. B.** The relationships and classification of the *Phlebotominae* (Díptera: Psychodidae). Ann. Ent. Ent. Soc. Amer. 48:182-196. 1995.

- **Ferro, C; Cárdenas, E; Corredor, D; Morales, A; Munsterman, L.** Life Cycle and Fecundity Analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Díptera: Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 93 (2): 195-199, Mar/Apr.1998.
- **Filho, J; Galati, E; Falcao, A.** Biology of the First Generation of a Laboratory Colony of *Nyssomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) and *Nyssomyia neivai* (Pinto,1926) (Díptera :Psychodidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 99(6): 597-601, October 2004.
- **Galati, EAB.** Classificação de Phlebotominae. pp. 23-51. *In:* E. F. Rangel y R. Lainson (Eds). *Flebotomíneos do Brasil*. Editora Fiocruz, Rio do Janeiro. 2003.
- **Grimaldi JGR, Tesh RB.** Leishmaniasis of the new world: current concept and implications for future research. Clin Microbiol. Rev; 6:230-50. 1993.
- **Hertig M., Johnson P.** The rearing of phlebotomus sandflies (Díptera: Psychodidae) I. Technique. Annals of the of the Entomological Society of America; 54 (6): 753-764.1961.
- **Haffer, J.** **Avian** speciation in tropical South America. Nuttal Ornithological Club, Pub.14, Harvard Univ., Cabridge. 390p. 1974
- **Instituto Nacional de Salud (INS).** Manual de Procedimientos de Identificación de Vectores de Leishmaniosis y Enfermedad de Carrión. Serie de Normas Técnicas N° 36 Lima- Perú. 2002.

- **Justiniano, S.C.B.; Chagas, A.C.; Pessoa, F.A.C.; Queiroz, R: G.** Comparative Biology of Two Populations of *Lutzomyia umbratilis* (Díptera: Psychodidae) of Central Amazonia, Brazil, Under Laboratory Conditions. *Braz.J. Biol.* 64 (2):227-235.2004.
- **Lainson R.** Ecological interations in the transmission of the Leishmaniasis. *Phil Trans R Soc Long*; 389-404.1988.
- **Lambraño L.** Determinación de las especies del género *Lutzomyia* presentes en la ciudad de Sincelejo, asociadas a la aparición de casos urbanos de leishmaniasis. Universidad de Sucre. 2007.
- **Lewis, DJ. D.G. Young, G.B., Fairchild, and D.M. Minter** Proposals for stable classification of the phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae). *Syst. Ent.* 2:319-332. 1977.
- **Mirsa A.** Sobre la biología de algunos flebótomos (Díptera: Psychodidae) y datos sobre otros hematófagos colectados en Altagracia de Orituco (Estado Guárico), Venezuela. *Rev San Asist Social* 18: 789-796. 1953.
- **Modi G., Tesh R.** A simple technique for mass rearing *Lutzomyia longipalpis* and *phlebotomus papatasi* (Díptera: Psychodidae) in the laboratory journal *Medical Entomology*; 20 (5): 568-569. 1983.
- **Montoya-Lerma J.** The biology of visceral Leishmaniasis Vectors in The San Andrés de Sotavento Focus, Colombia. University of London 1996.
- **Montoya-Lerma, J; Cadena-Peña, H; Jaramillo-Salazar, C.** Rearing and colonization of *Lutzomyia evansi* (Díptera: Psychodidae), a vector of visceral Leishmaniasis in Colombia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 93(2): 263-268 Mar/Apr. 1998.

- **Morales, A; Bello, F; Cárdenas, E.** Establecimiento, mantenimiento y productividad de una colonia de laboratorio de *Lutzomyia spinicrassa* Morales, Osorno-Mesa, Osorno y Hoyos, 1969 (Díptera: Psychodidae) en Colombia. Rev. Cienc. Salud. Bogota (Colombia) 3(2):129-135, julio-diciembre 2005.
- **Neira, M; Diaz-Martínez, A; Bello, F; Ferro, C.** Estudio en condiciones de laboratorio de los ciclos de vida de *Lutzomyia torvida*, y *Lutzomyia longiflocosa* (Díptera: Psychodidae) posibles vectores de *Leishmania braziliensis* en la zona cafetera colombiana. Biomédica; 18(4):251-255. 1998.
- **Nieves, E; Ribeiro, A; Brazil, R.** Physical Factors Influencing the Ovipositor of *Lutzomyia migonei* (Díptera: Psychodidae) in Laboratory Conditions. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 92 (6):733-737, Nov/Dec.1995.
- **Nieves E; Pimienta P.** Influence of vertebrate blood meals on the development of *Leishmania (viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Am. J Trop. Med Hyg. Vol. 67 (69): 640-647.2002.
- **Rivero M.** Identificación de *Leishmania chagasi* en *canis familiaris* en un foco de los Montes de Maria. Tesis Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en Biotecnología. 2003.
- **Sandoval, MC; Angulo, VM; Gutiérrez, R; Muñoz, G; Ferro, C.** Especies de *Lutzomyia* (Díptera: Psychodidae) posibles vectores de Leishmaniasis en la ciudad de Bucaramanga, Santander, Colombia. Biomédica; 18 (2): 161-168.1998.

- **Santamaría, E; Castillo, M; Cárdenas, R; Bello, F; Ayala, M; Ferro, C.** Competencia vectorial de la especie de *Lutzomyia* del grupo *verrucarum* (Díptera, Psychodidae) en un foco endémico de *Leishmania braziliensis* en Reventones, Cundinamarca. *Biomédica*; 19(2):115-126.1999.
- **Santamaría, E; Munsterman, L; Ferro, C.** Estimating Carrying Capacity in a Newly Colonized Sand Fly *Lutzomyia serrana* (Díptera: Psychodidae). *J. Econ. Entomol.*95 (1):149-154 .2002.
- **Sierra, Diana A, Velez Ivan Dario, Uribe Sandra.** Identificación de *Lutzomyia* (Díptera: Psychodidae) grupo *verrucarum* por medio de microscopía electrónica de sus huevos. *Rev. Biol. Trop* v 48 No 2-3 San José, Jun 2000.
- **Theodor, O.** Classification of the American Phlebotomine. *J. Med. Ent.*2:117-197. 1965.
- **Young, D. G.** A review of the bloodsucking psychodid flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). Technical Bulletin 806, Institute of Food and Agricultural Sciences, Agricultural Experiment Stations, Gainesville, Florida, 266 pp. 1979.
- **Young, David, G; Duncan, Margo, A.** Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera :Psychodidae). *Memoirs of the American Entomology Institute* Number 54. Associated Publishers American Entomological Institute 1994.

- **Young DG, Duncan MA.** Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera, Psychodidae). *Mem Am Entomol Inst* 54: 1-881.1994.