

# Desarrollo de *Leishmania mexicana* y *Leishmania amazonensis* en *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae, Phlebotomine)

Development of *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis* in *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae, Phlebotomine)

MARÍA ALEJANDRA VÍVENES<sup>1</sup>, MILAGROS OVIEDO<sup>2</sup>, JULIO CÉSAR MÁRQUEZ<sup>2</sup>

Revista Colombiana de Entomología 31 (1): 71-74 (2005)

**Resumen.** El objetivo de este trabajo consistió en estudiar los cambios morfológicos que ocurren durante el desarrollo de *Leishmania mexicana* (MHOM/VE/72/AZN) y *Le. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) en *Lutzomyia evansi*. Hembras de *Lu. evansi* se alimentaron a partir de una lesión tarsal de hámster y se examinaron en busca de infección cada 24 h hasta las 168 h pos-alimentación. El patrón de desarrollo de *Le. mexicana* y *Le. amazonensis* en *Lu. evansi* fue de tipo suprapilórico, de acuerdo con lo descrito para las especies del complejo *Le. mexicana*. La transformación de formas amastigotas a procíclicos ocurrió para ambas especies entre las 24 - 48 h post-infección. Los parásitos mostraron su adaptación al microambiente del tracto digestivo de *Lu. evansi* y desarrollo hacia formas maduras: nectomonas, haptomonas y paramastigotas. La forma paramastigota se observó, en bajo porcentaje, a las 120 h post-ingesta infectiva en ambas especies. La disminución temprana de nutrientes en *Lu. evansi*, debido al rápido proceso de digestión de sangre (3 a 4 días), pudiera explicar el bajo porcentaje de desarrollo alcanzado hacia las formas paramastigotas y la ausencia de formas metacíclicas en este modelo.

**Palabras clave:** *Leishmania* spp. Infección experimental. Competencia vectorial.

**Summary.** The aim of this paper was to study the morphological changes in the development of *Leishmania mexicana* (MHOM/VE/72/AZN) and *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) in *Lutzomyia evansi*. Females of *Lu. evansi* fed on a hamster tarsal lesion and were examined for infection at 24 h intervals from 24 h to 168 h post-feeding. The pattern of development of *Le. mexicana* and *Le. amazonensis* in *Lu. evansi* was suprapylarian consistent with what has been described for species of the *Le. mexicana* complex. Transformation from amastigote to procyclic forms occurred in both species at 24 - 48 h post-infection. The parasites showed their adaptation to the gut environment of *Lu. evansi* and development to mature forms: nectomonads, haptomonads and paramastigotes. The paramastigote form was observed in low percentage at 120 h post-infected ingestion in both species. The early depletion of nutrients in *Lu. evansi*, due to a faster rate of digestion (3 to 4 days), could explain the low percentage of development reaching the paramastigote forms and the absence of the metacyclic forms in this model.

**Key words:** *Leishmania* spp. Experimental infection. Vectorial capacity.

## Introducción

La competencia vectorial de especies flebotomínicas en la transmisión de *Leishmania* sp. depende de diversos factores que condicionan la susceptibilidad o refractariedad del insecto al protozoario (Nieves y Pimenta 2001).

Los estudios sobre competencia vectorial han sido realizados mediante la búsqueda de insectos naturalmente infectados y/o, alternativamente, mediante la infección y transmisión experimental, observándose que la fauna flebotomina neotropical muestra poca resistencia intrínseca al desarrollo de un gran número de especies de *Leishmania*, inclusive aquellas no transmitidas por estos insectos en la naturaleza (Killick-Kendrick 1979), a diferencia de la relación

*Phlebotomus-Leishmania* del Viejo Mundo donde pareciera existir una especificidad.

Rojas (1991) señala que en América diferentes especies de *Lutzomyia* o *Psychodopygus* mastozoófilos pueden actuar como vectores, siempre y cuando se hallen en el área de la biocenosis leishmánica. En este contexto, *Lutzomyia evansi* (Núñez-Tovar), considerado vector alternativo de leishmaniasis visceral en Colombia y Venezuela (Travi *et al.* 1990; Aguilar *et al.* 1998; Feliciangeli *et al.* 1999; Montoya *et al.* 2003), se ha encontrado en focos endémicos de Leishmaniasis donde las dos formas clínicas de la enfermedad coexisten. Montoya (1996), en San Andrés de Sotavento, Colombia, encuentra a *Lu. evansi* como la especie más abundante con una tasa de infección de 0,037% con parásitos

tipificados como *Le. chagasi* y tasa de 0,018% con *Leishmania* sp, que por su patrón de desarrollo sugiere sea *Le. panamensis*.

En Venezuela, la presencia de *Lu. evansi* en focos endémicos donde son simpátricas las dos formas clínicas de la enfermedad ha sido señalada en la región oriental y en los andes (González *et al.* 1995, 1999; González 1998). En la región de los andes, Vívenes (2000) encuentra una tasa de infección natural de 0,23% con parásitos de desarrollo suprapilórico que, al ser inoculados a un hámster sano, desarrolla un granuloma blando no ulcerado y sin evidencia de invasión a vísceras. Desafortunadamente este aislado no pudo ser tipificado ya que un segundo repique a hámster no reprodujo la infección.

1 Autor para correspondencia: Bioanalista, M. Sc. Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS), Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, Apartado Postal 4774, Puerto La Cruz 6023. Anzoátegui, Venezuela. Teléfono: (0281) 2770107, Fax: (0281) 2770107. E-mail: vivenes95@hotmail.com

2 Biólogos, M. Sc. Centro de Investigaciones "José Witremundo Torrealba". Universidad de Los Andes, NURR-Trujillo, Venezuela Apdo. 214. E-mail: longipalpis@cantv.net

Estas observaciones motivaron la realización de estudios de infección experimental de *Lu. evansi* con parásitos del complejo *Leishmania mexicana* hallándose una tasa de infección experimental del 21,7% para *Le. amazonensis* y 29,4% para *Le. mexicana* y un incremento de la invasión parasitaria hacia la válvula esofágica cuando se ofreció, a los insectos, una segunda ingesta sanguínea sobre hámster sano (Vivenes *et al.* 2001).

El presente estudio tuvo como objetivo, observar los cambios morfológicos y pleomórficos desplegados por *Le. mexicana* y *Le. amazonensis* en *Lu. evansi*.

## Materiales y Métodos

### Parásitos

***Le. mexicana*:** Cepa (MHOM/VE/72/AZV), mantenida por repiques sucesivos en hámster. Cepa cedida por el personal del Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Universidad de Los Andes, Mérida. ***Le. amazonensis*:** Cepa (IFLA/BR/67/PH8) mantenida por repique en *Mus musculus*. Cepa donada por el Dr. José A. O'Daly del Centro de Microbiología y Biología Molecular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas.

### Inoculación

Hámsteres machos de 30 días de nacidos se inocularon a partir del tejido de la lesión tarsal de un hámster donador de las cepas (PH8 o AZV). Este tejido se maceró en 1 ml de solución salina fisiológica y se ajustó a una concentración de  $2 \times 10^4$  parásitos/0,1 ml para ser inoculada por vía subcutánea en cada uno de los tarsos posteriores de los hámsteres experimentales.

### Infección experimental

Hembras silvestres de *Lu. evansi*, procedentes de un área donde no han sido señalados casos de leishmaniasis cutánea o visceral, y con 24 h de ayuno, se separaron en tres lotes de 70 ejemplares en jaulas con cubierta de organdi. Seguidamente se les ofreció una ingesta sanguínea sobre una lesión tarsal de hámster de 30-40 días de evolución. Las hembras alimentadas se mantuvieron con solución saturada de sacarosa a temperatura de 26°C, 78% de humedad relativa y en completa oscuridad.

Cada 24 h hasta las 168 h post-ingesta infectiva, lotes de 10 ejemplares hembra de *Lu. evansi* se diseccionaron en busca de formas flageladas dentro del tracto digestivo. Los ejemplares se sumergieron previamente en solución jabonosa (solución salina 0,65%/ Triton), para eliminar pelos y escamas. Luego se lavaron en solución salina 0,85% para eliminar el detergente y, una a una, se disecó bajo lupa estereoscópica y se observó bajo el microscopio óptico a 400X. La presencia de formas flageladas, en el tracto digestivo de cada ejemplar, y su ubicación en diferentes porciones del tubo digestivo se anotaron para cada periodo de observación. El tracto di-

gestivo de los insectos positivos, fue dilacerado en una lámina portaobjeto previamente cubierta con albúmina de huevo, sobre una gota de solución salina 0,85%. Una vez seca la preparación, se coloreó con Giemsa al 10% durante 30 min.

Las láminas se revisaron en microscopio óptico. Cada una de las formas parasitarias encontradas se dibujó con ayuda de una cámara clara sobre papel bond 22 X 22 cm. Se dibujaron 100 formas por período de observación y se clasificaron siguiendo la nomenclatura utilizada por Lawyers *et al.* (1990): amastigotas, procíclicos, nectomonas, haptomonas, paramastigotas y metacíclicos.

## Resultados

La susceptibilidad de *Lu. evansi* a la infección por parásitos del complejo *Le. mexicana* varió entre 29,4% para *Le. mexicana* y 21,7% para *Le. amazonensis*, mostrando un patrón de desarrollo de tipo suprapilórico. Los resultados mostrados en este artículo están enfocados en la descripción de los cambios morfológicos y el curso de la infección de *Le. mexicana* y *Le. amazonensis* en el tracto digestivo de *Lu. evansi* cada 24 h durante siete días de observación.

### Desarrollo de *Leishmania mexicana* en *Lutzomyia evansi*

A partir de las 24 h post-ingesta infectiva, el desarrollo de *Le. mexicana* en *Lu. evansi*

estuvo caracterizado por la presencia de amastigotas en división y las primeras formas flageladas, procíclicos. Morfológicamente, las formas amastigotas presentaron cuerpos ovales de  $5,9 \pm 1,2 \times 2,5 \pm 0,5 \mu$ , sin flagelo libre. A diferencia de éstas, los procíclicos mostraron cuerpos ligeramente alargados ( $6,8 \pm 1,2 \times 2,3 \pm 0,5 \mu$ ) y flagelo ( $5,12 \pm 4,0$ ). Éstas correspondieron al 71% de las formas presentes a las 48 h post-infección (Fig. 1).

Avanzado el proceso de digestión sanguínea a las 72 h, momento en el cual los parásitos migran hacia el intestino medio torácico y la válvula esofágica, se observaron formas de nectomonas. Éstas representaron el 93% de las formas presentes y se caracterizaron por poseer cuerpos alargados y flagelos libres, de igual o mayor longitud que los cuerpos. En promedio midieron  $9,35 \pm 2,2 \times 2,1 \pm 0,75 \mu$  y flagelo de  $13,5 \pm 2,2$ . Al mismo tiempo se evidenció la presencia de haptomonas (7% de las formas observadas) (Fig. 1), con cuerpos similares a los procíclicos de  $7,1 \pm 1,5 \times 2,4 \pm 0,7 \mu$  y flagelos de tamaño similar a los cuerpos  $6,35 \pm 2,4 \mu$ .

Entre las 96 y 120 h post-ingesta infectiva se inició la migración de los parásitos al esófago. En este periodo se observó un incremento de haptomonas (32,4% del total de formas observadas a las 120 h post-infección). El desarrollo hacia paramastigotas se observó entre las 120 y 144 h (3,4 y 1,9%, respectivamente) (Fig. 1),

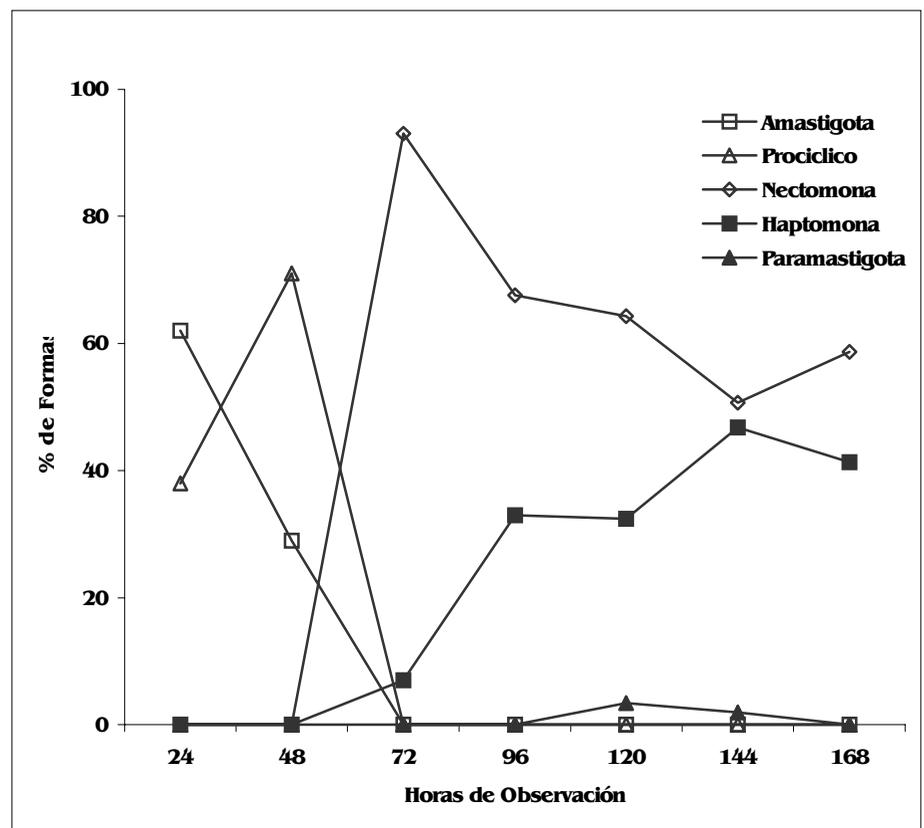


Figura 1. Desarrollo morfológico de *Leishmania mexicana* en *Lutzomyia evansi* durante 168 horas de observación, expresado en porcentaje de formas.

éstas se caracterizaron por poseer cinetoplasto yuxtapuesto al núcleo y sus cuerpos en promedio midieron  $5,6 \pm 1,1 \times 2,9 \pm 0,3 \mu$  y los flagelos  $11,3 \pm 2,9 \mu$ .

Al final del período (168 h post-ingesta) la población de promastigota de *Le. mexicana*, en el tracto digestivo del insecto, estuvo representada en su mayoría, por nectomonas (58,7%) y haptomonas (41,3%), sin la evidencia de paramastigotas.

#### Desarrollo de *Leishmania amazonensis* en *Lutzomyia evansi*

El desarrollo de *Le. amazonensis* en *Lu. evansi* mostró, en intestino medio abdominal, la presencia de amastigotas (con cuerpos de  $6,6 \pm 0,9 \times 3,1 \pm 0,6 \mu$ ) a las 24 h, y formas procíclicas (con cuerpos de  $7,8 \pm 1,5 \times 3,8 \pm 2,3 \mu$  y flagelo de  $5,33 \pm 4,0 \mu$ ) a las 48 h, representando el 54,2 y 45,8%, respectivamente (Fig. 2).

La aparición de nectomonas (20%) se evidenció a las 48 h (Fig. 2). Éstas se visualizaron 24 h antes que para *Le. mexicana* (Fig. 1), mostraron cuerpos de  $12,4 \pm 2,1 \times 1,9 \pm 0,4 \mu$  y flagelo de  $15,6 \pm 2,8$ . La nectomonas estuvieron presentes en el tracto digestivo de *Lu. evansi* durante los siete días de observación, en porcentajes mayores que los observados en infecciones con *Le. mexicana*.

El desarrollo de haptomonas de *Le. amazonensis* (con cuerpos de  $9,2 \pm 1,48 \times 2,1 \pm 0,5 \mu$  y flagelo de  $7,5 \pm 2,3 \mu$ ), fue

menor que el alcanzado por *Le. mexicana* para el mismo periodo de observación (144 h post-infección), siendo de 37,0 y 46,8%, respectivamente (Figs. 1 y 2).

La forma paramastigota con cuerpo de  $8,8 \times 3,5 \mu$  y flagelo de  $17,0 \mu$ , se observó después de 120 h (1% de las formas presentes) (Fig. 2). En ninguno de los aislados se evidenció la forma metacíclica.

#### Discusión

El patrón desarrollo de *Le. mexicana* y *Le. amazonensis* en *Lu. evansi* fue de tipo suprapilórico, tal como ha sido señalado para las especies del complejo *Le. mexicana* en sus vectores naturales (Lainson y Shaw 1987).

El predominio de amastigotas en división y las primeras formas flageladas o procíclicas, entre las 24 y 48 h post-ingesta infectiva, son indicativos de adaptación de los parásitos al microambiente intestinal. Según Pimenta *et al.* (1992), los procíclicos son una fase de promastigota, de baja infectividad al hospedador vertebrado, pero con capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino medio del flebótomo. La sobrevivencia y establecimiento de los flagelados en el tracto digestivo del insecto se garantiza por la acción de dos moléculas de superficie (glicoproteína Gp63 y los lipofosfoglicanos). La glicoproteína Gp63 interviene en la degradación de la membrana

peritrófica, la regulación de enzimas proteolíticas en el intestino medio y la degradación de nutrientes, mientras que las moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) sirven de anclaje al epitelio intestinal e impiden la eliminación de los parásitos durante el proceso de excreción (Pimenta *et al.* 1992, Ilgutz y McConville 2001).

Las experiencias realizadas demuestran que ambas especies del complejo *Le. mexicana* fueron capaces de adaptarse a las diferentes regiones del tracto digestivo del insecto. Aunque en este trabajo no se determinó la unión de los flagelados al epitelio intestinal, su permanencia en el tracto digestivo, luego del proceso de excreción, puede considerarse como indicativo de este proceso.

Las formas nectomonas observadas entre 48 y 72 h y descritas como promastigotas de cuerpos alargados adheridos a la pared del intestino medio, sin modificación de su flagelo, constituyen las formas de sobrevivencia del parásito ya que éstas resisten a los movimientos peristálticos del intestino para evitar su eliminación durante el proceso de excreción (Molyneux y Killick-Kendrick 1987; Walters *et al.* 1993).

La colonización del cardias y válvula esofágica con formas nectomonas, inicia el proceso de transformación a haptomonas. Nieves (2000), al estudiar el desarrollo de *Le. amazonensis* en *Lu. migonei* señaló la aparición de un 25% de haptomonas a partir de las 48 h, incrementando la cifra progresivamente a partir de las 72 h post-ingesta infectiva. En *Lu. evansi* se observaron formas haptomonas a partir de las 72 h post-ingesta infectiva, alcanzando su máximo porcentaje a las 144 h. La invasión de estas formas, al cardias y válvula esofágica, ha sido descrita por varios autores y su adhesión a estos sitios se ha relacionado con los daños ocasionados por los parásitos a la íntima cuticular generando dificultad en el flujo de la sangre, durante la alimentación, lo cual favorecería la transmisión por reflujo de los parásitos ubicados en el intestino medio (Schlein *et al.* 1992).

Durante el desarrollo, fue notable, a partir de las 120 h post-ingesta infectiva, la presencia de flagelados con escasos movimientos. En algunos casos presentaron formas vacuoladas o lisadas. Walters *et al.* (1992), al respecto, señalan que tales efectos son observados en combinaciones parásito-vector con hospederos naturales y no naturales. Estas alteraciones son consideradas como indicadores de muerte natural de los flagelados, que persisten largo tiempo, luego de culminado el proceso digestivo. En el caso de *Lu. evansi* pudiera ser explicado por una disminución de nutrientes, entre las 72 y 96 h, al culminar el proceso digestivo (Oviedo *et al.* 1995).

La forma metacíclica, señalada como el estadio infectivo para vertebrados susceptibles, no fue observada en los ensayos

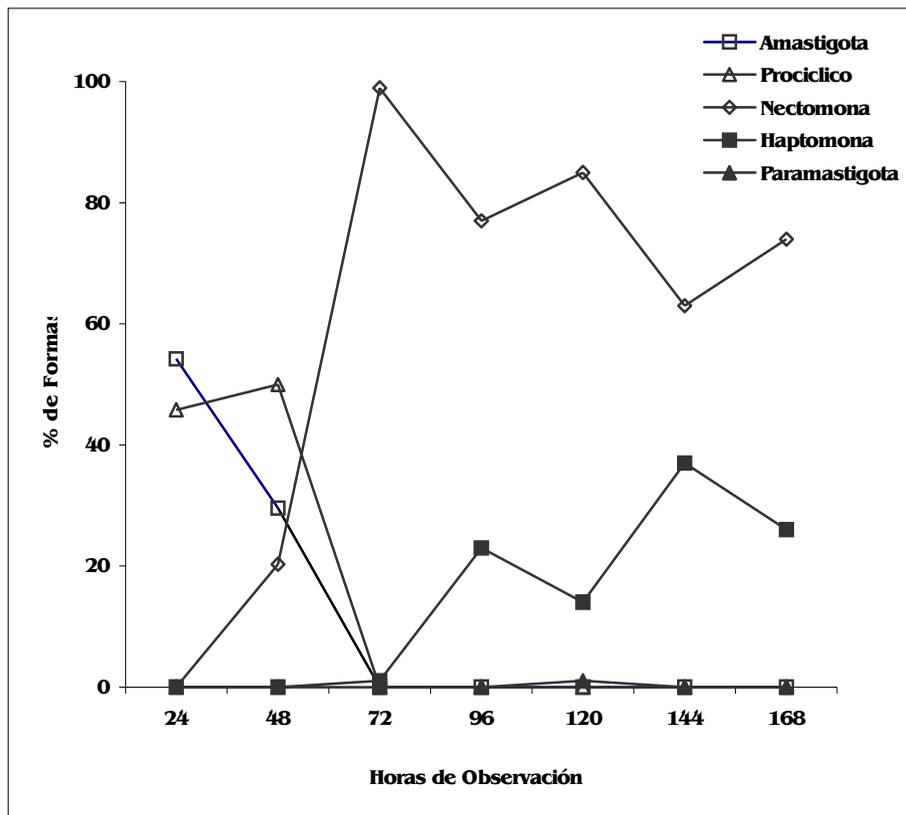


Figura 2. Desarrollo morfológico de *Leishmania amazonensis* en *Lutzomyia evansi* durante 168 horas de observación, expresado en porcentaje de formas.

realizados con las dos especies parasitarias. Hasta ahora los precursores de los metacíclicos infectivos se desconocen. Algunas observaciones han propuesto su origen a partir de paramastigota (Killick-Kendrick 1979), haptomonas (Lawyers *et al.* 1987) o nectomonas cortas presentes en el cardias (Walters *et al.* 1987). Observaciones realizadas por Nieves (2000), señalan que la aparición de metacíclicos coincide con la presencia de un número alto de nectomonas, y al mismo tiempo, con la aparición de paramastigotas.

Hart *et al.* (1981), en estudios *in vitro*, encontraron que la transformación de los diferentes morfotipos de *Leishmania* sp. se asocian con la presencia de ciertos nutrientes en el medio. En algunos casos, el proceso de transformación es considerado densodependiente del morfotipo precursor (Howard *et al.* 1987). En tal sentido, la disminución temprana de nutrientes y el escaso desarrollo de paramastigotas, por ambas especies de *Leishmania*, pudieren ser la explicación para la ausencia de metacíclicos en el modelo estudiado.

Los resultados revelaron que *Lu. evansi* puede soportar el desarrollo de especies pertenecientes al complejo *Le. mexicana*, hasta la formación de paramastigotas, considerado precursor de la forma infectiva metacíclica.

### Agradecimientos

A Gilberto Bastida por su colaboración durante las actividades de campo y a Alicia Jorquera, Leonardo De Sousa y Stefano Bonoli por la revisión y sugerencias hechas al manuscrito. Este trabajo fue soportado por FUNDACITE-Anzoátegui, Proyecto PI-008-02.

### Literatura citada

- AGUILAR, C.; FERNÁNDEZ, E.; FERNÁNDEZ, R.; CANNOVA, D.; FERRER, E.; CABRERA, Z., SOUZA, W.; COUTINHO, S. 1998. Urban visceral leishmaniasis in Venezuela. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 93: 15-16.
- FELICIANGELI, D.; RODRÍGUEZ, N.; DE GUILLIELMO, Z.; RODRÍGUEZ, A. 1999. The reemergence of American Visceral Leishmaniasis in an old focus in Venezuela. II Vectors and Parasites. *Parasite* 6: 113-120.
- GONZÁLEZ, A. 1998. Flebotomofauna asociada a focos de Leishmaniasis visceral en el Estado Trujillo. Trabajo de grado de Técnico Superior Pecuario. Universidad de Los Andes, Núcleo Universitario "Rafael Rangel", Trujillo. 47 p.
- GONZÁLEZ, R.; LEDEZMA, E.; JORQUERA, A.; DE SOUSA, L.; DEVERA, R. 1995. Flebotomofauna en áreas endémicas de leishmaniasis a distintos niveles altitudinales. Estado Anzoátegui, Venezuela. *Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental* 35: 147-154.
- GONZÁLEZ, R.; DE SOUSA, L.; DEVERA, R.; JORQUERA, A.; LEDEZMA, E. 1999. Seasonal and nocturnal domiciliary human landing/biting behavior of *Lutzomyia (Lutzomyia) evansi* y *Lutzomyia (Psychodopygus) panamensis* (Diptera; Psychodidae) in a periurban area of city on the Caribbean coast of eastern Venezuela (Barcelona; Anzoátegui State). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 93: 361-364.
- HART, D.; VICKERMAN, K.; COOMBS, G. 1981. Transformation in vitro of *Leishmania mexicana* amastigotes to promastigotes: nutritional requirements and the effect of drugs. *Parasitology* 83: 529-541.
- HOWARD, M.; SAYERS, G.; MILES, M. 1987. *Leishmania donovani* metacyclic promastigote: Transformation in vitro, lectin agglutination. Complement resistance, and infectivity. *Experimental Parasitology* 64: 147-156.
- ILGOUTZ, S.; Mc CONVILLE, M. 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *International Journal for Parasitology* 31: 899-908.
- KILLICK-KENDRICK, R. 1979. The biology of leishmania in phlebotomine sandflies. p. 395-460. En: Lumsden, W.H.R.; Evans, D.A. (eds.). *Biology of the kinetoplastida*. Vol. 2. Academic Press, London. 610 p.
- LAINSON, R.; SHAW, J. 1987. Evolution, classification and geographical distribution. p. 1-120. En: Peters, W; Killick-Kendrick, R (eds.). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol 1. Academic Press. Inc. London. 550 p.
- LAWYER, P.; YOUNG, D.; BUTLER, J.; AKIN, D. 1987. Development of *Leishmania mexicana* in *Lutzomyia diabolica* and *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 24: 347-355.
- LAWYER, P.; NGUMBI, P.; ANJILI, C.; ODONGO, S.; MEBRAHTU, Y.; GITHURE, J.; KOECH, D.; ROBERTS, C. 1990. Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus dubosqui* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43: 31-43.
- MOLYNEUX, P. H.; KILLICK-KENDRICK, R. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. p. 121-176. En: Peters, W; Killick-Kendrick, R (eds.). *The leishmaniasis in Biology and Medicine*. Vol 1. Academic Press. Inc. London. 550 p.
- MONTOYA L, J. 1996. The biology of visceral leishmaniasis vector in the San Andrés de Sotavento focus, Colombia. Tesis Ph. D. Department of Medical Parasitology London School of Hygiene and Tropical Medicine 182 p.
- MONTOYA - LERMA, J.; CADENA, H.; OVIEDO, M.; READY, P. D.; BARAZARTE, R.; TRAVI, B. 2003. Comparative vectorial efficiency of *Lutzomyia evansi* and *Lutzomyia longipalpis* for transmitting *Leishmania chagasi*. *Acta Tropica* 85: 19-29.
- NIEVES, E. 2000. A biología do desenvolvimento de *Leishmania (Viannia) braziliensis* e de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* no flebotomíneo *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). Tesis Doctoral. Instituto Oswaldo Cruz. Departamento de Encino. Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 148 p.
- NIEVES, E.; PIMENTA, P. 2001. Development of *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 37: 134-140.
- OVIEDO, M.; MORENO, G.; GRATEROL, D. 1995. Bionomy of vectors of american visceral leishmaniasis in Trujillo state, Venezuela. III.- Colonization of *Lutzomyia evansi*. Resúmenes: 2º Simposio Internacional sobre Flebotominos. p. 79. Mérida-Venezuela.
- PIMENTA, P.; TURCO, S.; Mc CONVILLE, M.; LAWYER, P.; SACKS, D. 1992. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. *Science* 256: 1812-1815.
- ROJAS, E. 1991. Desarrollo de *Leishmania mexicana* en *Lutzomyia youngi*. Fases de diferenciación hasta metacíclico. Tesis M. Sc. Universidad de Los Andes, Venezuela, NURR. Centro de Investigación " José Witremundo Torrealba". 99 p.
- SCHLEIN, Y.; JACOBSON, R. L.; MESSER, G. 1992. *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sandfly vector and implement parasite transmission by bite. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 89: 9944-9948.
- TRAVI, B.; VELEZ, I.; BRUTUS, L.; SEGURA, I.; JARAMILLO, C.; MONTOYA, J. 1990. *Lutzomyia evansi*, an alternate vector of *Leishmania chagasi* in a Colombian focus of visceral leishmaniasis. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84: 676-677.
- VIVENES, A. 2000. *Lutzomyia evansi* hospedero biológico de parásitos del complejo *Leishmania mexicana*. Tesis de Maestría. Universidad de Los Andes. Núcleo Universitario "Rafael Rangel". Trujillo, Venezuela. 108 p.
- VIVENES, A.; OVIEDO, M.; MARQUEZ, J. C.; MONTOYA-LERMA, J. 2001. Effect of a second bloodmeal on the oesophagus colonization by *Leishmania mexicana* complex in *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 281-283.
- WALTERS, L.; MODI, G.; TESH, R.; BURRAGE, T. 1987. Host- parasite relationship of *Leishmania mexicana* y *Lutzomyia abonnenci* (Diptera: Psychodidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36: 294-314.
- WALTERS, L.; IRONS, K.; MODI, G.; TESH, R. 1992. Refractory barriers in the sand fly *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) to infection with *Leishmania panamensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 46: 211-228.
- WALTERS, L.; IRONS, K.; CHAPLIN, G.; TESH, R. 1993. Life cycle of *Leishmania major* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in the Neotropical Sand fly *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Journal of Medical Entomology* 30: 699-718.