

CRITERIOS DE NULIPARIDAD Y DE PARIDAD  
EN *LUTZOMYIA TOWNSENDI* (Ortiz, 1959)  
DEL OCCIDENTE DE VENEZUELA

MARGARITA MÁRQUEZ\*  
JOSÉ V. SCORZA\*\*

*Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959) es un flebótomo antropofílico con concordancia gonadotrófica, en las zonas endémicas de *Leishmania brasiliensis* y *L. garnhami* en el occidente de Venezuela.

Mediante el estudio de hembras colonizadas en el laboratorio, nulíparas o paridas, de hembras silvestres alimentadas sobre voluntarios y de hembras silvestres mantenidas con sacarosa, se establecen criterios de nuliparidad con un 56,6% de confianza. En cambio, signos de paridad aparecen en un 82% de las hembras consideradas como tales.

La digestión de un ingesta sanguínea inicia un ciclo gonadotrófico con oogénesis abortiva y acumulación de fosfolípidos en las células epiteliales del estómago y en las glándulas accesorias. La ovoposición completa produce un calix ovárico grueso e irregular con restos de oocitos abortivos y acumulación de pigmentos. Estos caracteres son suficientes para precisar un criterio de paridad.

La presencia de fosfolípidos en el estómago y en las glándulas accesorias de hembras nulíparas es una indicación de ingesta incompleta de sangre.

La leishmaniasis cutánea es una endemia que particularmente en la ciudad de Trujillo (Venezuela), tiene características urbanas, en tanto que es una enfermedad con prevalencia en las áreas rurales. En el Núcleo Universitario "Rafael Rangel" y con la colaboración fundamental del Servicio de Dermatología con sede en dicha ciudad, se han diagnosticado varios casos urbanos que proceden de las urbanizaciones más importantes como Carmona, Alameda y Timiris.

---

Este trabajo fue realizado con financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de los Andes, Venezuela y por el componente Leishmaniasis del Programa para el Desarrollo de las Naciones Unidas/Banco Mundial/OMS, Programa Especial para Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales.

\* Laboratório de Investigações – Núcleo Universitario "Rafael Rangel" – Trujillo – Venezuela.

\*\* Facultad de Ciencias – Universidad de Los Andes – Mérida, Venezuela.

Recebido para publicação em 8 de dezembro de 1981 e aceito em 29 de março de 1982.

Siendo la infección urbana un fenómeno corriente, se desconoce cuales flebótomos puedan ser los transmisores y cuales mamíferos los reservorios del parásito. Un estudio local (Mogollon, Manzanilla & Scorza, 1977) revela la existencia de por lo menos nueve especies de *Lutzomyia* que pican al hombre en las áreas central, norcentral y surcentral del estado Trujillo. Entre estas especies aparecen la *Lu. panamensis* (Shannon, 1926) con distribución muy restringida y en localidades de tierra caliente, y la *Lu. townsendi* (Ortiz, 1959), hallada en las urbanizaciones de la ciudad de Trujillo, también con predominio por encima de los 800 m.s.n.m.

La primera especie ha sido incriminada como transmisora en el centro de Venezuela (Pifano et al, 1959), la segunda es la especie principal y dominante en una localidad del vecino estado Mérida, donde la infección es activa (Calderon, 1973). Scorza (1981) ha encontrado promastigotos en *Lu. townsendi* de una zona endémica próxima a la localidad de Estanquez, en el mismo Edo. Mérida, que al inocularlos en dos hamsters, produjeron lesiones con amastigotos de *Leishmania garnhami*, parásito que en la localidad produce lesiones cutáneas en el campesinado.

Un estudio inédito de Scorza et al (1981) revela que en las urbanizaciones de la ciudad de Trujillo, de donde proceden los casos de leishmaniasis urbana, el flebótomo antropófilo más común es *Lu. townsendi*. En ese estudio se reporta que, por lo menos, cuatro cepas de *Leishmania* aisladas de casos clínicos del Distrito Trujillo, en el estado Trujillo, siguen un modelo de desarrollo en la *Lu. townsendi* que se identifica con el de la *Leishmania braziliensis*, especie cuya transmisión experimental no ha sido posible.

*Lu. townsendi* ha sido criada en condiciones de laboratorio (Scorza, Gomez & Ramirez, 1968; Castro & Scorza, 1977); la mortalidad de las hembras ovígeras, después de la postura en el laboratorio, es casi total y parece ser una constante de casi todas las especies estudiadas hasta ahora (Killick-Kendrick, 1979).

Conocemos poco la supervivencia natural de flebótomos hembras después de la postura. Killick-Kendrick et al (1978) han recapturado *Phlebotomus ariasi* y *P. mascittii* en el sur de Francia después de haberlos ingurgitado sobre perros y marcado con polvo fluorescentes, observando que la retención de huevos fue un fenómeno raro en hembras que venían a picar por segunda vez y que no se hallaron espermatozoides en las espermatecas de hembras paridas que venían a picar.

El reconocimiento de hembras paridas en insectos hematófagos parece ser asunto bien demostrado (Detinova, 1962); sin embargo, este conocimiento en flebótomos es sumamente escaso y de poca confirmación. Lewis (1965) describe e ilustra aspectos morfológicos del sistema reproductor y excretor de flebótomos de Belize que atribuye a diferencias entre hembras paridas y nulíparas. No existen evidencias de que las hembras consideradas como paridas, lo fueran realmente. Ward (1974) confirma la creencia de que la condición de las glándulas accesorias pueda tener alguna utilidad para la diferenciación de hembras nulíparas y paridas.

Es obvia la importancia del reconocimiento de las hembras paridas en flebótomos que pican al hombre en una localidad donde la transmisión de leishmaniasis tiene lugar. La proporción de "paridad" y el estimado de la población de estos insectos, arrojarían valiosa información epidemiológica para la escogencia y diseño de medidas de control de la infección.

El objetivo básico de este trabajo es estudiar el ciclo gonadotrófico de *Lu. townsendi* para deducir criterios de paridad.

## MATERIALES Y METODOS

### *Especímenes de Lutzomyia townsendi (Ortiz, 1959)*

Para la estimación de criterios de paridad utilizamos hembras vírgenes criadas en condiciones de laboratorio en condición nulípara y parida; hembras silvestres fototácticamente activas sin alimentar y hembras silvestres ingurgitadas sobre un voluntario.

#### 1. — *Hembras vírgenes de laboratorio; nulíparas y paridas*

Por gentileza de la Profesora Maritza Carnevali pudimos disponer de una veintena de hembras de *L. townsendi* de su colonia cerrada en tercera generación. Los insectos han sido criados en envases con yeso húmedo a 22°C y las larvas han sido alimentadas con la flora microbiana y el micelio que se desarrolla en heces de conejos tostadas y pulverizadas. Los insectos, separados a la mañana siguiente de su emergencia, han sido mantenidos con solución de glucosa al 50% hasta el momento de disecarlos.

De estas, diez ejemplares fueron disecados entre el segundo y tercer días de la emergencia y se tomaron como insectos controles para criterios de nuliparidad. Otras seis hembras nacidas en la colonia cerrada que después de haberlas ingurgitado sobre un voluntario, sobrevivieron a la postura, se disecaron entre las 12 y 21 horas y fueron consideradas como insectos controles de paridad reciente.

#### 2. — *Hembras silvestres fototácticamente activas*

Provinieron de un cafetal en la localidad de Calderas, a 12 km de la ciudad de Trujillo y 1.350 m.s.n.m. Fueron capturadas en las primeras horas de la noche atrayéndolas con una trampa de Shannon cebada con un tubo de luz blanca fluorescente de 20 vatios. Los insectos fueron recogidos con un tubo de vidrio por aspiración y confinados en envases de vidrio de 50 mm de diámetro por 100 mm de longitud, revestido interiormente por una delgada lámina de corcho, cerrado en el extremo con el mismo diámetro por tela de nylon y por el otro, con diámetro reducido, por un tapón de corcho (Fig. 1). Lotes de 25 hasta 50 hembras fueron traídas hasta el laboratorio y conservadas con solución de sacarosa al 50% dentro de cavas de plástico esponjoso opaco, no traslúcido conteniendo una esponja plástica humedecida.

Ciento cuarenta hembras silvestres de *Lu. townsendi* fueron capturadas durante la primera hora de la noche en la localidad de "Calderas" (a 12 km de la ciudad de Trujillo, capital) mediante atracción con una trampa de Shannon cebada con luz fluorescente. Los insectos se confinaron en envases de vidrio, recubierto internamente con una delgada lámina de corcho (Fig. 1), a la mañana siguiente fueron ingurgitados sobre la piel abdominal de un voluntario; a partir de entonces y hasta la disección del último sobreviviente, se alimentaron con solución de sacarosa comercial al 50%, en un trocito de esponja plástica impregnada y colocada sobre el tul. A partir del día siguiente de la ingurgitación sanguínea, cada mañana y durante cinco días seguidos, se disecó una alícuota de veinte insectos para separarles los ovarios y las glándulas accesorias. Estos órganos se examinaron en solución salina de 0,7% bajo una laminilla de 11 x 11 mm y se observaron microscópicamente a 450X. Se precisó el estadio de desarrollo de los ovarios, el número de los mismos en cada ovario y, además, el aspecto de las glándulas accesorias.

#### 3. — *Disección de los insectos*

Las hembras a disecar fueron anestesiadas con vapores de cloroformo e inmediatamente fueron sumergidas durante 5 minutos en solución salina isotónica con Tritón al 1:1.000 para despojarlas de los pelos escamosos y se transfirieron seguidamente a solución salina simple.

Con ayuda de agujas de disección hechas con aplicadores de madera y agujas entomológicas Nº 000 los insectos fueron disecados atendiendo las sugerencias de Chaniotis & Anderson (1967).

#### 4. — Preparación de secciones de hembras con criostato

Hembras silvestres alimentadas cuatro o cinco días antes sobre un voluntario fueron anestesiadas y desprovistas de patas y alas, se colocaron en grupos de tres, con los cuerpos paralelos, sobre la superficie de un trocito de hígado de ratón de 4 x 4 mm y se cubrieron por otro trocito similar; el "sandwich" fue colocado sobre un fragmento de corcho en un cilindro de bronce para ser congelado a  $-170^{\circ}\text{C}$  por inmersión en nitrógeno líquido. Los bloques se cortaron longitudinalmente hasta llegar a los insectos de los cuales se hicieron secciones de  $5\mu$  de espesor con un criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Se usaron secciones frescas o fijadas según el propósito para investigaciones citológicas en el estómago y las glándulas accesorias y precisar la naturaleza del contenido residual de las células gástricas o del "cemento" de las glándulas accesorias.

Se investigó la presencia de hematoïdina, pigmentos biliares, bilirrubina, hemoïderina y lipofuscinas en las células gástricas, así como grasas neutras o ácidas y fosfolípidos en éstas y en las glándulas accesorias; se siguieron las técnicas según Martoja & Martoja-Pierson (1967), Bancroft (1967) y Pearse (1972).

## RESULTADOS

*Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959) es un flebótomo con armonía gonadotrófica; las hembras hacen su oviposición generalmente, al amanecer del quinto día después de la ingestión de sangre (Scorza, Ortiz & Gomez, 1968; Castro & Scorza, 1977). Tomando en cuenta esta propiedad fisiológica, hemos investigado el aspecto del estómago, de los ovarios y de las glándulas accesorias en hembras nacidas en el laboratorio, así como la condición de los mismos órganos en hembras también nacidas en el laboratorio que habiéndose ingurgitado con sangre, sobrevivieron a la postura. Comparamos estos resultados con el estado de los mismos órganos en hembras silvestres que habían ingerido únicamente azúcar.

### *Hembras nulíparas nacidas en el laboratorio*

Hemos disecado diez (10) vírgenes nacidas en el laboratorio, en ayuna de sangre con los siguientes caracteres:

1º) El estómago vacío en siete especímenes exhibió una distinción precisa, en fresco, de los límites o contornos de las células gástricas (Fig. 2); en tres hembras observamos pequeños residuos amorfos o granulares de color pardo. En ningún ejemplar observamos inclusión de algún tipo en la pared del estómago.

2º) En todas las diez hembras, sin excepción, las glándulas accesorias presentaron aspecto corniforme pequeño, con las células refringentes y sin contenido alguno en la luz de los túbulos.

3º) Los ovarios transparentes, presentaron ovariolos con un germinario tan grande como al oocito que acompaña (Fig. 3), diferenciándose este último por el nítido epitelio folicular que forma una gruesa envoltura y dentro del cual es posible diferenciar claramente a la célula germinal de los trofocitos o células nutricias. Estos ovariolos, sin excepción, aparecen en la fase I de Christophers (Christophers, 1911).

4º) El número de ovariolos por ovario, en diez hembras vírgenes nacidas en el laboratorio, fue de  $\bar{x} 38,7 \pm 5,2$  para los valores que aparece en el Cuadro N° 1.

## CUADRO 1

Números de ovariolos en los ovarios de diez hembras vírgenes de *Lutzomyia townsendi* nacidas en el laboratorio

Hembras Nº	Nº. de ovariolos por ovario		Hembras Nº	Nº. de ovariolos por ovario	
1	35	38	2	28	32
3	35	30	4	40	37
5	40	35	6	46	45
7	36	47	8	39	41
9	43	44	10	41	42

*Secuencia gonadotrófica en hembras silvestres alimentadas en el laboratorio*

24 horas. — Se ha iniciado la vitelogénesis y la acumulación de vitelo en el oocito, el cual ocupa hasta un medio del volumen del folículo, con las células nutricias ocupando la mitad distal del ovariolo; el crecimiento del folículo es tal que el germinario aparece ahora con 1/4 hasta 1/8 del volumen del folículo en maduración; este desarrollo folicular correspondería a la fase II de Christophers. Las glándulas accesorias comienzan a acumular una secreción parduzca y granular que se hace más densa en el fondo del saco glandular.

El número promedio de los folículos en franca maduración, en diez hembras disecadas es de  $\bar{x}$  43,2  $\pm$  5,1, un número superior al de los ovariolos contados en las hembras vírgenes nacidas en el laboratorio ( $\bar{x}$ : 43,2  $\pm$  5,3).

48 horas. — El desarrollo ovárico a las 48 horas después de la ingestión de sangre por *Lu. townsendi* comienza a hacerse irregular o asincrónico. Al lado de folículos con franco crecimiento y acumulación de vitelo, aparecen ovariolos con menor e irregular acumulación de vitelo (Fig. 4). Se trata de folículos abortivos retrasados con respecto al desarrollo de otros, en los cuales la relación huevo/germinario es mucho menor 1: 1/8 y 1: 1/32 respectivamente.

En los folículos bien desarrollados el oocito ocupa más de 4/5 del volumen del huevo y las células nutricias alcanzan el aspecto de un apretado casquete apical. El desarrollo ovárico corresponde al estadio III de Christophers donde el núcleo del oocito no es visible a través de la masa de vitelo y el folículo comienza a alargarse. El número de folículos bien desarrollados, contados en 16 hembras, es de  $\bar{x}$  24,80  $\pm$  4,02.

72 horas. — El desarrollo ovárico se hace a expensas de un número menor de folículos, si se lo compara con el de las 24 horas; la atrofia, reabsorción o abortamiento folicular es sobresaliente en la base del ovario (Fig. 5). Acá, envueltos por la íntima del ovario, a nivel del oviducto, se acumulan ovariolos abortivos en los cuales se reabsorbe el vitelo quedando reducidos a una masa irregular de material granular o amorfo, en la cual se destaca el germinario; la atrofia ovariolar se observa también a nivel de la porción apical o distal del ovario. Las glándulas accesorias se llenan de secreción y aún conservan una forma regular, isodiamétrica en toda su extensión. Los ovariolos se conservan en la fase III de Christophers aún cuando la masa de células nutricias se hace mucho menos evidente. El número de huevos por ovario es menor; para veinte hembras examinadas,  $\bar{x}$ : 19,1  $\pm$  5,01.

96 horas. — El huevo, en cada folículo, comienza a alargarse y al lado del vitelo que se acumula en mayor cantidad, comienzan a diferenciarse globúlos refringentes y claros que exhiben aspecto de rosetas; el germinario muestra a un nuevo oocito. Es impor-

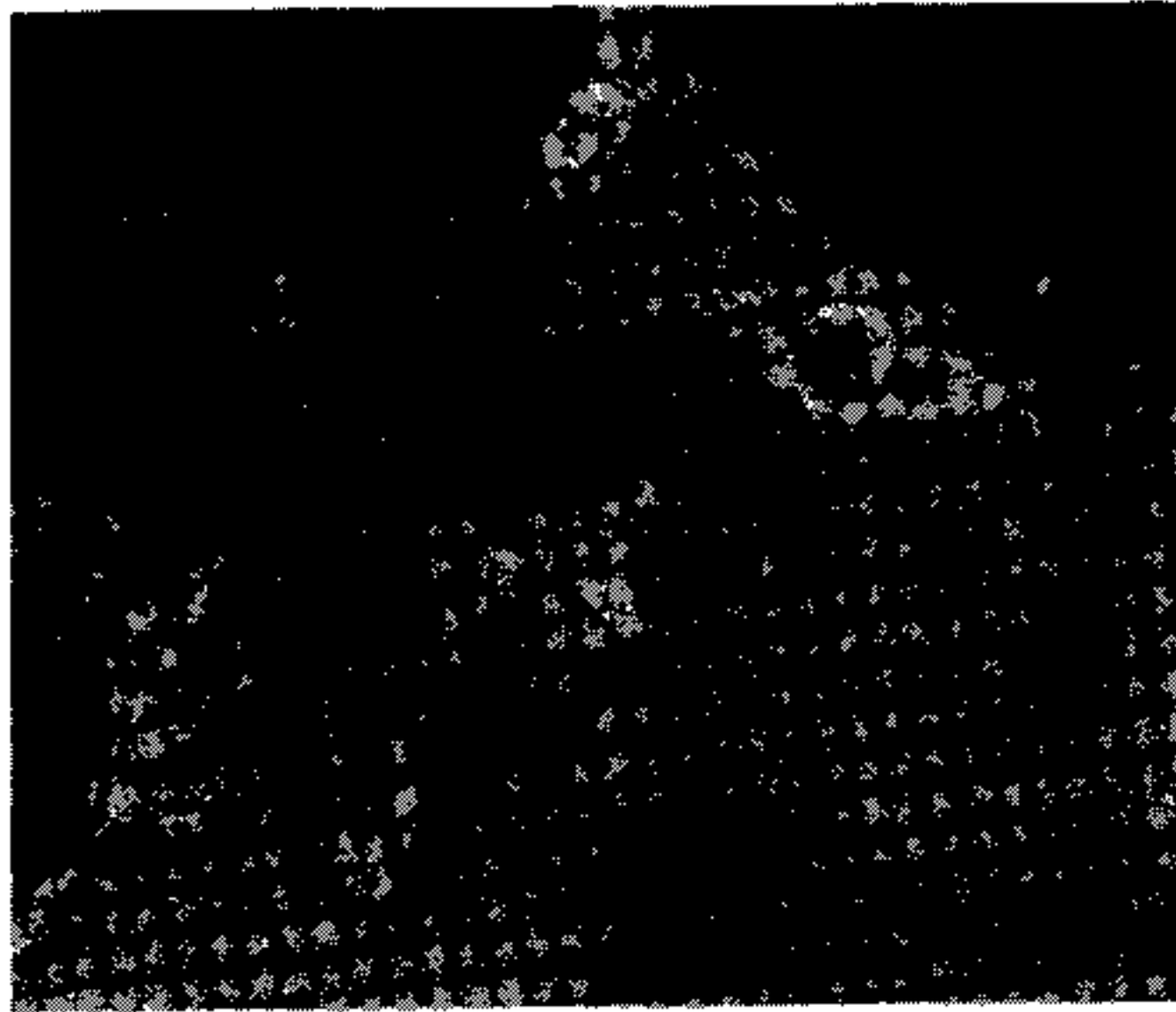
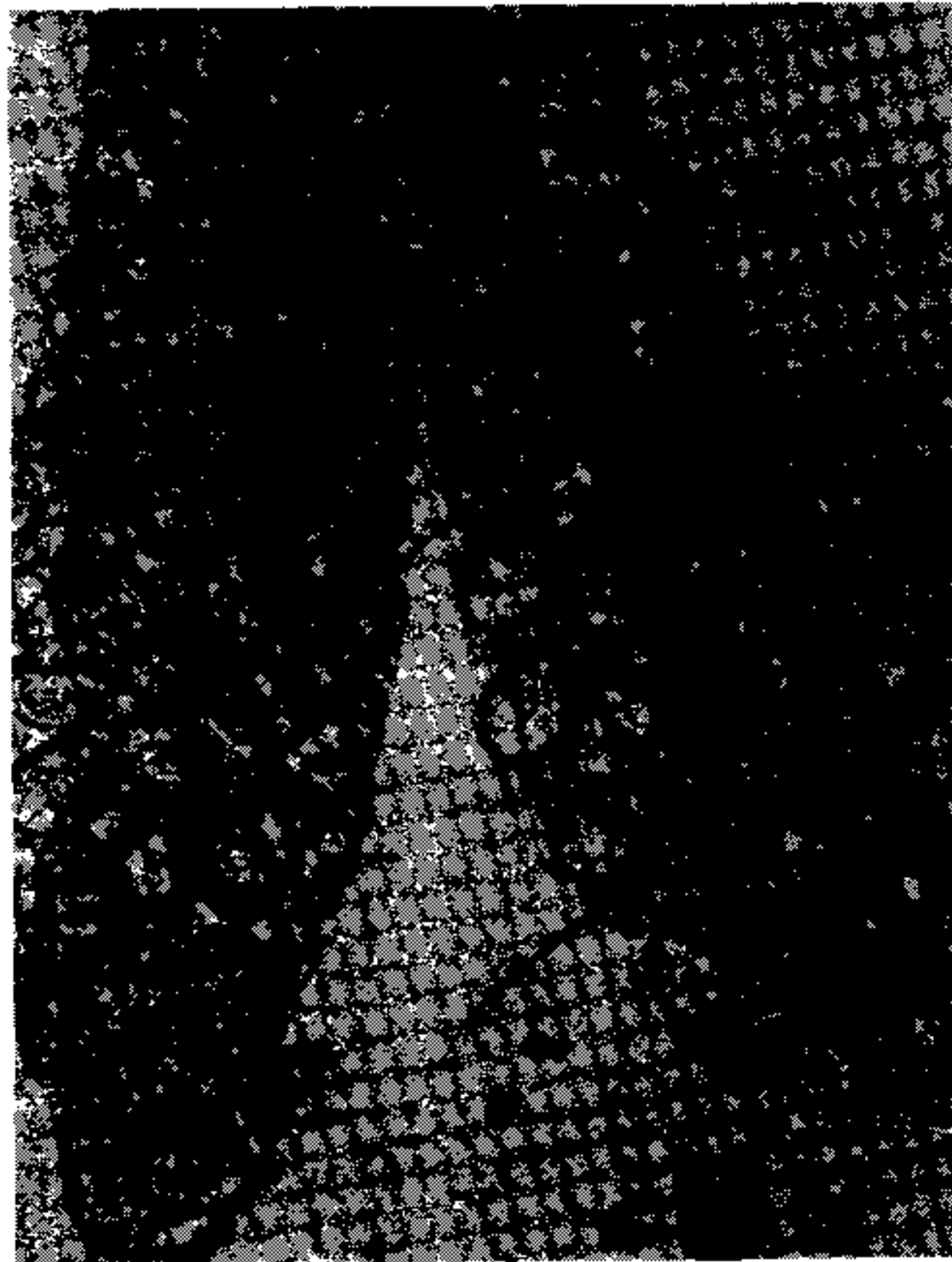
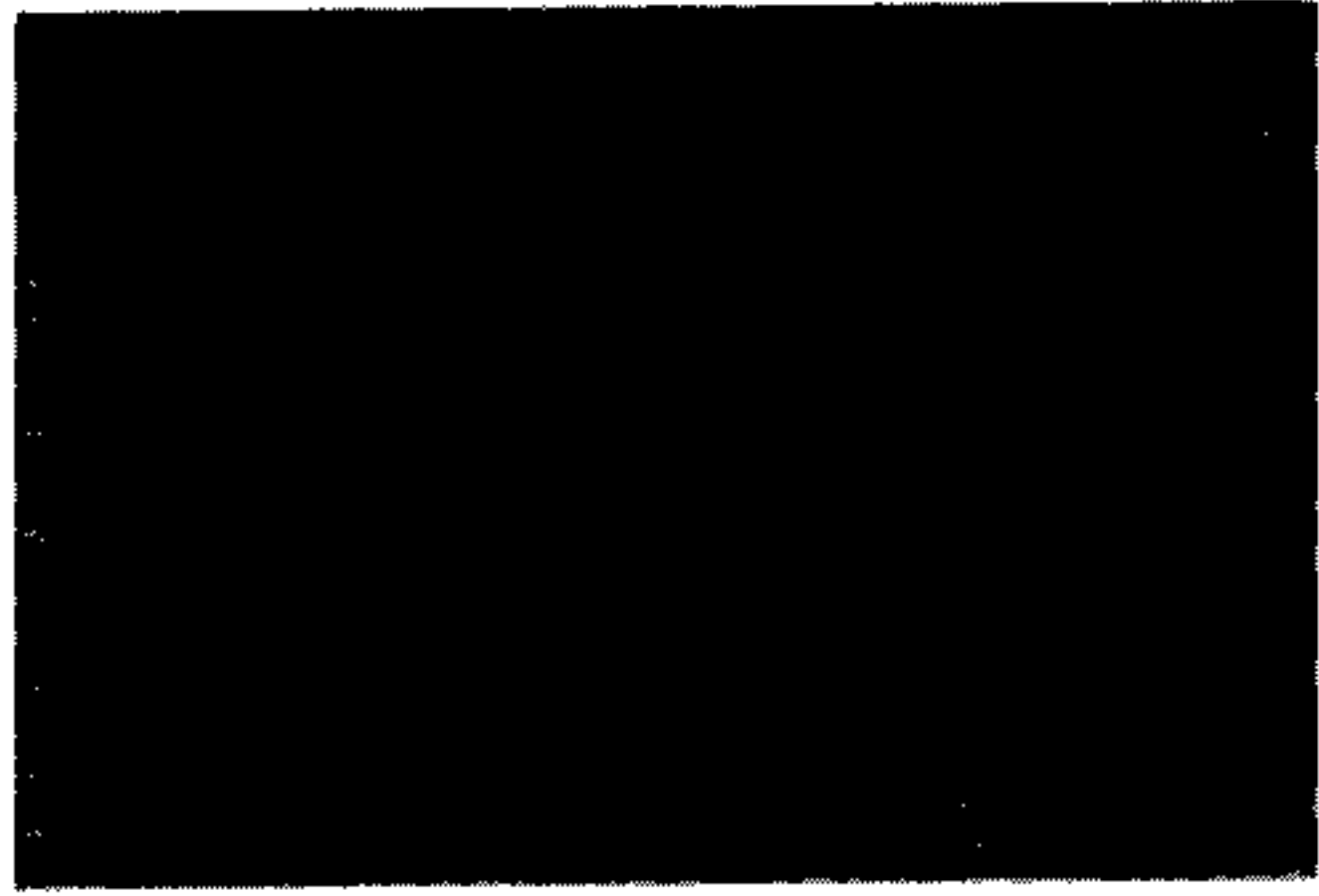


Fig. 1 – Envase para la alimentación y mantenimiento de los flebotomos.

Fig. 2 – Epitelio gástrico de hembra nulípara de *Lu. townsendi* mostrando las células epiteliales vacías.

Fig. 3 – Ovarios de nulíparas con calix poco perceptible.

Fig. 4 – Desarrollo irregular de los oocitos de *Lu. townsendi*, 48 horas después de la ingesta mostrando oocitos abortivos.

Fig. 5 – Residuos amorfos de oocitos abortivos en hembras de *Lu. townsendi* a las 72 horas de la ingesta sanguínea.

tante observar la considerable atrofia alcanzada por los folículos abortivos (Fig. 6) que tienen aspecto de membranas irregulares, al lado de otros (flechas) donde aún persiste cierta cantidad de vitelo y comienza a acumularse un material de color negro similar a la melanina. El número de los folículos bien desarrollados, contados en 16 hembras disecadas, es de  $\bar{x}$ :  $17,3 \pm 4,9$ . Los folículos exhiben un desarrollo intermedio entre las fases III y IV de Christophers.

120 horas. — El desarrollo ovárico toca a su fin; los huevos alcanzan la fase V de Christophers con desarrollo del corion, desaparición del área de las células nutricias, prominente aspecto de los glóbulos refringentes y claros entre las gotas de vitelo con menor tamaño y el aplastamiento distal del germinario contra la túnica ovárica. El número de huevos, para veinte hembras disecadas es de  $\bar{x}$ :  $14,1 \pm 3,1$  por ovariolo. Entre los huevos se observan acúmulos de membranas y de material melánico. Las glándulas accesorias, en la mayoría de las hembras se hallan dilatadas y repletas de secreción (Fig. 7). Al final de este desarrollo, todas las hembras han concluido la digestión sanguínea y el estómago aparece vacío con las células epiteliales conteniendo una variable cantidad de pequeños glóbulos amarillentos o de vacuolas de mayor tamaño y con el mismo aspecto.

#### *Hembras paridas en el laboratorio*

Hemos obtenido hembras nacidas en el laboratorio que, habiéndose ingurgitado con sangre de un voluntario, han logrado sobrevivir a la oviposición. Hemos disecado así, seis hembras con 12 hasta 21 horas de paridas. En todas ellas hemos hallado el siguiente número de ovariolos: 38-36, 35-34; 38-42; 45-40; 42-38; 30-27; para  $\bar{x}$   $37,1 \pm 5,2$  folículos por ovario. En todas ellas, además de folículos con oocitos y células nutricias con apariencia normal hallamos un complejo sistema de membranas interfoliculares con acúmulos de gránulos de materiales parecidos a la melanina (Fig. 8). La glándula accesoria tiene forma de saco vacío o de cuerno con células apretadas, pero conteniendo siempre residuos de la secreción acumulada durante el ciclo gonadotrófico. El estómago vacío y con sus células epiteliales conteniendo variable cantidad de apretados glóbulos de color pardo (Fig. 9).

El estudio de la secuencia de las alteraciones ováricas, de las glándulas accesorias en hembras que hacen la digestión de una ingesta sanguínea y además, de la condición del epitelio estomacal en las hembras que han concluido una digestión sanguínea, revela los siguientes hallazgos:

1º) El número de ovariolos en desarrollo decrece desde el impulso vitelo acumulativo que se observa en las primeras 24 horas, hacia las 120 horas en postingestión de sangre. El Cuadro 2 presentamos los resultados del recuento de ovariolos bien conformados en 46 hembras disecadas entre las 24 y 120 horas del ciclo gonadotrófico. El número medio de ovariolos túrgidos con cantidad progresivamente aumentada de vitelo, decrece progresivamente así, 43,2 para 24 horas, 24,8 para las 48 horas, 19,1 para las 72 horas, 17,3 para las 46 horas y 14,1 para las 120 horas.

En otras palabras, en *Lu. townsendi* ingurgitados con sangre humana se dá un proceso progresivo de oogenesis abortiva que parece ser función o está correlacionada con el número de días del desarrollo gonadotrófico. Para explorar esta posible relación hicimos un análisis de regresión entre el número de horas del desarrollo como variable independiente (x) y el número medio de folículos normales en cada ovario (y), la fórmula de la regresión lineal corresponde a:

$$Y = 43,4 - 0,27 x \text{ con } r = 0,90$$

lo que dá 1/5 de ovocito en abortamiento por hora.

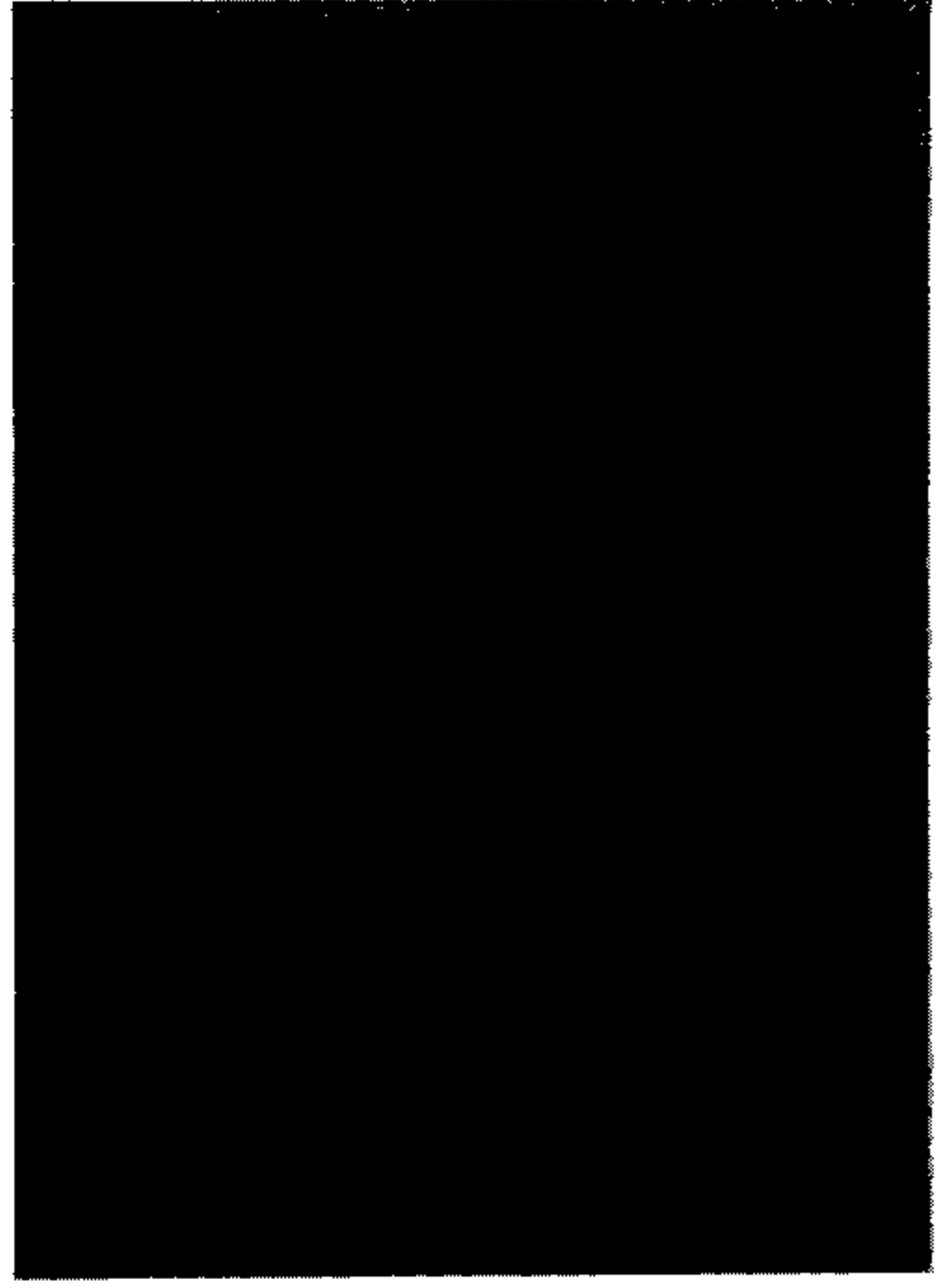
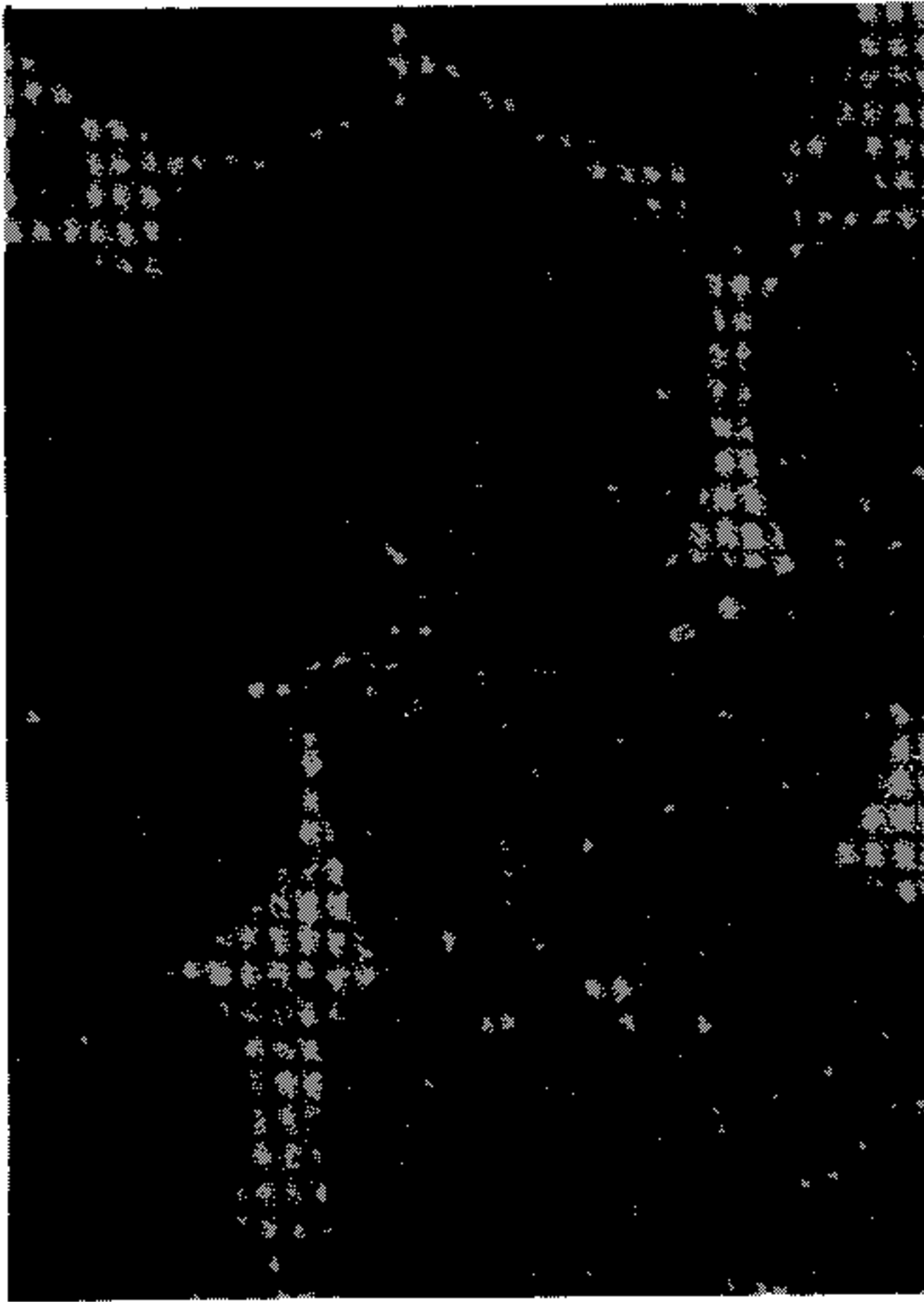


Fig. 6 – Aspecto de los residuos de oocitos abortivos en ovario de *Lu. townsendi* con 96 horas de desarrollo después de la ingestión de sangre.

Fig. 7 – Glándulas accesorias repletas de fosfolípidos al final de la digestión sanguínea.

Fig. 8 – Ovario de *Lu. townsendi* parida mostrando acúmulos de melanina en un calix hipertrofiado.

Fig. 9 – Estómago de *Lu. townsendi* parida mostrando inclusiones glóbulares en las células epiteliales del estómago.



## CUADRO 2

Disminución gradual del número de ovariolos desarrollados por *Lu. townsendi* en el curso de las 24 hasta las 120 horas de un ciclo gonadotrófico

## Horas después de la ingurgitación

Nº de ♀♀	24	48	72	96	120
1	48 - 46	28 - 25	28 - 22	18 - 17	13 - 13
2	48 - 49	24 - 30	14 - 15	22 - 23	17 - 18
3	48 - 40	20 - 24	27 - 25	11 - 22	14 - 15
4	57 - 52	19 - 25	24 - 17	13 - 18	12 - 15
5	76 - 47	19 - 30	18 - 23	12 - 16	16 - 12
6	40 - 40	30 - 29	22 - 20	10 - 14	10 - 10
7	42 - 38	19 - 23	15 - 15	23 - 12	20 - 20
8	36 - 38	27 - 25	21 - 14	22 - 24	11 - 15
9	43 - 45	- -	10 - 22	- -	12 - 10
10	34 - 36	- -	13 - 17	- -	15 - 13
$\bar{x}$	43,20	24,80	19,10	17,31	14,05
s:	5,31	4,02	5,01	4,88	3,05
n:	20	16	20	16	20

2º) En el curso de un ciclo gonadotrófico, a partir de una hembra virgen y nulípara, las glándulas accesorias en un comienzo vacías, con células túrgidas y con aspecto corniforme, se van llenando de un material granular de color pardo que se acumula progresivamente en la luz glandular produciendo la hipertrofia de la glándula; después de la ovopostura, la glándula aparece con escaso contenido, forma de saco y contorno irregular.

3º) El estómago, que en las nulíparas nacidas en el laboratorio, exhibe las células epiteliales sin vacuolas o material alguno distinguible con el microscopio a 450X, después de la ingestión y ovoposición, aparece conteniendo desde 4 hasta 8 glóbulos diminutos o 1 hasta 3 glóbulos de mayor tamaño que no llegan a hipertrofiar a la célula que los contiene.

4º) El ovario de las hembras vírgenes, con folículos refráctiles y ovariolos apretados con escaso espacio o contenido interfolicular, después de la ovopostura, exhibe un calix integrado por conjuntos de membranas o de diminutos glóbulos irregulares interfoliculares y entre ellos, a veces, acúmulos de material melanoide.

Nuestros resultados señalan diferencias microscópicas entre los ovarios, glándulas accesorias y el aspecto del estómago entre hembras vírgenes nacidas en el laboratorio y hembras paridas silvestres. Las diferencias se resumen en el Cuadro 3.

*Estudio citoquímico*

Dos estructuras nos han llamado particularmente la atención; por una parte la presencia en el estómago de las hembras que han digerido sangre hayan hecho o no una postura, de gotitas o glóbulos de color pardo y por la otra, la gradual acumulación de material granuloso en la luz de las glándulas accesorias durante el proceso de la digestión sanguínea.

Para una identificación aproximada de la naturaleza química de tales materiales hemos aplicado técnicas citoquímicas *in toto*, sobre órganos frescos disecados y también, para mayor precisión, a secciones de hembras que han concluido una digestión sanguínea

## CUADRO 3

Diferencias y analogías gonadotróficas entre hembras nulíparas y paridas de *Lutzomyia townsendi*

	<i>Nulíparas</i>	<i>Paridas</i>
Ovarios	Refráctiles, con apretados ovariolos y con escaso o ningún espacio o material interfolicular. Calix poco visible.	Refráctiles u opacos, ovariolos dispersos entre un calix con estructuras granulares e membranosas y a veces gránulos melanoides.
Glándulas accesorias	Estrechas, vacías y refráctiles; corniformes y sin contenido parduzco o granular incoloro.	Gruesas, opacas y con restos de un material pardo oscuro; a veces imperceptible a rápida inspección.
Estómago	Con células epiteliales la más de las veces bien definidas y sin material de inclusión de algún tipo.	Células epiteliales poco o nada diferenciadas, con hasta 8 gránulos amarillentos pequeños o 3 glóbulos de un material pardo claro.
Ovariolos	Con un número $\bar{x}$ : $38,7 \pm 5,2$ de ovariolos por ovario y cifras extremas desde 28 hasta 47 folículos.	Con un número $\bar{x}$ : $37,1 \pm 5,2$ ovariolos por ovario y cifras extremas desde 27 hasta 46 folículos.

con retención de los huevos. Las secciones han sido hechas por cortes con criostato y tratadas de acuerdo con dos marchas analíticas: en un primer intento, partiendo del alto contenido en hemoglobina en la dieta, investigamos los productos de degradación de estas proteínas conjugadas y en un segundo intento, considerando la alta tasa de fosfolípidos de las membranas de los eritrocitos ingeridos o una posible fracción lipídica procedente de suero sanguíneo de la ingesta, a la presencia de lípidos simples o conjugados.

En los primeros ensayos empleamos directamente al estómago e intestino posterior disecado en hembras con 120 horas de digestión, para hacer sobre ellos reacciones citoquímicas. Fueron negativas las reacciones de Gmelin para hematoidina y pigmentos biliares, la técnica de Stein modificada para pigmentos biliares y los métodos de Kutlik y de Glenner para bilirrubina, hemosiderina y lipofucsina, descritos en el apéndice 26 de la obra de Pearse (1972).

La marcha analítica para lípidos se hizo de acuerdo con Bancroft (1967); habiéndose observado reacciones positivas a lípidos con Oil Red, decidimos seguir las observaciones sobre secciones longitudinales de hembras con 120 horas de digestión, con  $5 \mu$  de espesor. El estudio de las secciones coloreadas según la técnica de sulfato de azul de Nilo de Smith-Dietrich modificada por Cain en 1947, dió reacción azul (positiva para lípidos ácidos) en el epitelio del estómago y en las glándulas accesorias y reacción roja (lípidos neutros) en los huevos contenidos en el abdomen. Con la finalidad precisar la naturaleza de los lípidos ácidos del epitelio estomacal y de las glándulas accesorias, ensayamos la técnica para fosfolípidos de Smith-Dietrich coloreando con hematoxilina de Kultschitzky según Martoja & Martoja-Pierson (1967); esta reacción, en las células epiteliales del estómago, reveló la presencia de fosfolípidos en gotitas muy similares a las que se observan *in vivo* y en fresco o a las teñidas con Oil Red; en las glándulas accesorias la reacción fue azul intensa y uniforme con la hematoxilina de Kultschitzky.

Estos ensayos citoquímicos revelan la naturaleza fosfolipídica de las vacuolas residuales de la digestión estomacal de la sangre ingerida por *Lu. townsendi* y también de

una sustancia similar en la secreción que se acumula en las glándulas accesorias durante la digestión y maduración de los folículos. En estos últimos, al lado de los constituyentes proteicos del vitelo, hay también grandes glóbulos de grasa neutra que se colorean con Oil Red y azul de Nilo y que se extraen con los solventes orgánicos en la reacción de Smith-Dietrich para fosfolípidos.

*Aplicación de los criterios de paridad al reconocimiento de Lutzomyia townsendi silvestres*

Aplicamos los criterios de paridad, precisados en el Cuadro 3, al estudio de 462 hembras silvestres capturadas con trampa de Shannon en la localidad de Calderas próxima a la ciudad de Trujillo.

El estudio de la secuencia de las alteraciones de los ovarios, de las modificaciones de las glándulas accesorias y de las células gástricas en hembras silvestres de *Lu. townsendi*, ingurgitadas en el laboratorio, así como la observación de hembras nacidas en el laboratorio sean nulíparas o paridas, conduce a las siguientes proposiciones finales.

1. — La ingestión de sangre a repleción induce el inicio del ciclo gonadotrófico con el transporte y la acumulación de vitelo en *todos* los ovarios.

2. — La digestión progresiva de la sangre ingerida y la adicional acumulación de vitelo, induce la maduración total de tan solo una proporción de huevos y el aborto progresivo de algunos oocitos, con la respectiva degeneración y la acumulación, a veces, de gránulos de melanina en el ovario.

3. — La digestión de sangre ingerida conduce a la acumulación de fosfolípidos en las células del estómago y en las glándulas accesorias. Presumiblemente esto sucede independiente de la cantidad de sangre ingerida.

4. — La presencia de un calix con membranas, glóbulos y gránulos de melanina, son signos inequívocos de una ingesta completa y de una postura a término y generalmente se acompaña de un estómago y glándulas accesorias con fosfolípidos.

5. — La presencia de fosfolípidos en el estómago y en las glándulas accesorias revela simplemente ingestión de sangre en pequeña o gran cantidad.

6. — Una ingesta no suficiente podría modificar la condición de los oocitos y colocarlos en fase diferente a la I de Christophers, lo mismo podría ocurrir tras una postura donde los oocitos en relevo podrían también ser distintos de los de la fase I de Christophers.

Bajo estas seis suposiciones hemos examinado los resultados de las disecciones de 462 hembras silvestres, considerando primero la ausencia de calix como criterio primario de paridad a juzgar por las observaciones de 6 hembras nacidas en el laboratorio y sobrevivientes a la postura y también a 10 hembras nulíparas criadas en el laboratorio.

En un primer esfuerzo analítico hemos tomado en cuenta tres de los cuatro caracteres que presumiblemente podrían considerarse para fijar un criterio de nulíparidad o de paridad, así: a) ausencia o presencia de un calix, condición de los oocitos y de las glándulas accesorias; o bien, b) ausencia o presencia de calix, condición de los oocitos y del estómago. En un segundo esfuerzo consideramos a los cuatro caracteres.

En el Cuadro 4 presentamos los resultados. Considerando a un calix complejo como signo de paridad y la escasa o nula visibilidad del mismo como signo de nulíparidad, el estudio de la data a partir de estos supuestos, ofrece resultados confiables que permiten distinguir a las hembras nulíparas. En efecto, la ausencia de calix aparece con un valor de

CUADRO 4

Resultados de las disecciones de 462 hembras silvestres de *Lu. townsendi* mostrando la combinatoria de cuatro caracteres gonadotróficos y los respectivos porcentajes en la muestra

Variable	Calix ovarico		Oocitos en Fase I		Glandulas accs. Fosfolípidos		Estomago Fosfolípidos		Numero en la muestra	%
	Presente	Ausente	Si	No	Si	No	Si	No		
A		+	+			+			239	51.7
		+	+		+				76	16.5
		+		+		+			1	0.2
		+		+	+				13	2.8
Totales									329	71.20
B		+	+			+			10	2.2
		+	+		+				4	0.9
		+		+		+			11	2.4
		+		+	+				108	23.4
Totales									133	28.9
C		+	+				+		251	54.3
		+	+				+		64	13.9
		+		+			+		1	0.2
		+		+			+		13	2.8
Totales									329	71.2
D		+	+					+	10	2.2
		+	+				+		4	0.9
		+		+				+	1	0.2
		+		+			+		118	25.5
Totales									133	18.8
E		+	+			+		+	188	40.7
		+	+			+	+		49	10.6
		+	+		+			+	63	13.6
		+	+		+		+		15	3.3
		+		+		+		+	0	0.0
		+		+		+	+		1	0.2
		+		+	+	+		+	1	0.2
		+		+	+	+			15	3.3
Totales									332	71.9
F		+	+			+		+	7	1.5
		+	+			+	+		1	0.2
		+	+		+			+	3	0.7
		+	+		+		+		0	0.0
		+		+		+		+	0	0.0
		+		+		+	+		12	2.6
		+		+	+	+		+	1	0.2
		+		+	+	+			106	22.9
Totales									130	28.1

más de 70%, asociado claramente a la ausencia de fosfolípidos en el estómago, en las glándulas accesorias o en ambos órganos (variables A, C y E). La presencia de calix es también confiable como para utilizarlo *a priori* como signo de paridad. En las variables B, D y E se ofrecen valores de 23,4, 25,5 y 22,9% con respecto a la muestra total. Entre 130 hembras con calix modificado y típico de las paridas en condiciones de laboratorio, el 81,5% aparece asociado a la presencia de fosfolípidos en el estómago y las glándulas accesorias, en cambio no hay ninguna hembra con calix de parida sin fosfolípidos en aquellos órganos; todas estas hembras mostraron oocitos en fase distinta a la fase I de Christophers. La asociación de la ausencia de un calix aparente con oocitos en fase I, sin la presencia de fosfolípidos en el estómago y en las glándulas accesorias (variable E) es indicativo no solo de nuliparidad sino de ayuno sanguíneo en tales hembras; el 56,6% de las hembras consideradas nulíparas — a juzgar por esta asociación — no habían ingerido sangre lo que sugiere que un 53% de las nulíparas han ingerido una cierta cantidad de sangre, sin que esta haya sido suficiente para desencadenar un ciclo gonadotrófico completo. Una modificación de los oocitos como para colocarlos en una fase más avanzada de la fase I de Christophers aparentemente solo sería posible después de una postura; apenas 4,5% presentaron esta característica en condiciones de nuliparidad.

A juzgar por los resultados obtenidos, la detección de paridad en *Lu. townsendi* es confiable en un 81,5%. La ausencia de un calix y la ausencia de fosfolípidos en las glándulas accesorias aparece en el 72,6% de las nulíparas y el mismo carácter asociado a la ausencia de fosfolípidos en el estómago, aparece en el 76,3% de las mismas, lo que da un mas bajo criterio de confiabilidad. Es importante señalar la presencia de dos hembras que mostrando ovarios con oocitos en fase distinta a la I de Christophers mostraron fosfolípidos en el estómago o en las glándulas accesorias. La presencia de fosfolípidos en el estómago y en las glándulas accesorias es un fenómeno equivalente e indica simplemente la ingestión de sangre.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

El conocimiento de la edad fisiológica de los flebótomos, así como de sus hábitos o preferencias alimentarias y la actividad picadora diaria o estacional, constituyen la data fundamental para estudios epidemiológicos de las enfermedades cuyos agentes etiológicos transmiten.

En la Región Neotrópica estos estudios sobre edad fisiológica han sido realizados principalmente por investigadores británicos y norteamericanos (Chaniotis & Anderson, 1967; Johnson & Hertig, 1961; Lewis, 1965).

Flebótomos con pocas horas de emergencia pupal, con asociación gonadotrófica y en condiciones de ayuno, los ovarios de cada ovario politrófico están formados por un germinario apical y un folículo conectado al oviducto; las glándulas accesorias así como el estómago aparecen usualmente vacíos. Tras la ingestión de sangre a repleción se desencadenan cambios dramáticos mediados por mecanismos neuroendocrinos (Tombe, 1970) que culminan con la maduración de un determinado número de huevos, la acumulación de un material granular de secreción en las glándulas accesorias y la presencia de glóbulos lipídicos en las células gástricas. Otros órganos como las glándulas salivales y los tubos de Malpighio sufren también modificaciones que por su carácter irregular no han sido útiles para determinar variaciones morfológicas que pudieran servir para distinguir una hembra nulípara de una parida (Lewis & Minter, 1960; Lewis, 1965).

El diminuto tamaño de los ovarios en Phlebotominae hace difícil si nó imposible el empleo de la técnica de Detinova (1962) que permite precisar el número de ovoposturas en mosquitos por la disección de los ovarios y el recuento de las reliquias ovariolares o simplemente la apreciación de paridad por la compleja morfología de las tráqueas.

Utilizando *a priori* criterios análogos y derivados del conocimiento con Culicidae, Lewis (1965) disecó hembras silvestres de cinco especies de *Lutzomyia* de Honduras Británica. Un calix ovárico grueso y rugoso fue considerado carácter de paridad, como también lo fue la presencia de un cuerpo graso bien desarrollado; la presencia de secreción granular en las glándulas accesorias no ofreció resultados confiables. Es importante observar que la validez de estos caracteres varió de una especie a otra.

En un estudio posterior Lewis, Lainson & Shaw (1970) registran la presencia o ausencia de secreción granular en las glándulas accesorias de *Lu. flaviscutellata* y en otras once especies de *Lutzomyia* con un error aproximado de 6,9% para las paridas y de 13,3% para las nulíparas. Chaniotis & Anderson (1967) estudiando tres especies de *Lutzomyia* de California, encuentran útil y confiable la presencia de secreción en las glándulas accesorias para distinguir a las hembras paridas; en este caso la distinción entre nulíparas y paridas se hizo con hembras criadas en el laboratorio; el carácter apareció confiable con un 5% de error.

El examen de 462 hembras silvestres de *Lu. townsendi* capturadas en el Estado Trujillo, ha tomado en cuenta principalmente a la morfología del calix ovárico para separar nulíparas y paridas, complementando esa característica con observaciones adicionales de los folículos ovariolares y de la presencia o ausencia de fosfolípidos en las células del estómago y en las glándulas accesorias.

La morfología del calix ovárico en las hembras paridas es compleja y la complicación deriva de dos procesos funcionales poco conocidos; por una parte la inhibición del desarrollo en el último folículo de algunos ovariolos que es un fenómeno regular en casi todos los mosquitos y por la otra, la presencia no siempre constante de melanina en el calix ovárico. El fenómeno de la degeneración folicular o de la oogénesis abortiva ha sido discutido por Detinova (1962). El proceso de atrofia de algunos folículos en ovarios individuales ocurre simultáneamente con la maduración progresiva de otros y para que ocurra, la hembra debe haber ingerido sangre y la mayoría de los últimos folículos encontrarse en la fase I - II o II de desarrollo.

Se han planteado varias hipótesis para explicar la oogénesis abortiva. Se ha invocado la acción de un factor humoral que no es producido por el corpora lutea (Larsen & Bodenstein, 1959) sino producido por los propios ovarios (Clements, 1963). Aparentemente, el ovario mismo segrega un inhibidor que actúa sobre los folículos menos desarrollados (Meola & Lea, 1972). En *Aedes* allatectomizados el fenómeno de la oogénesis abortiva ocurre, lo que indica que la hormona del cuerpo alado no limita el desarrollo de los huevos (Lea, 1963). La atrofia folicular probablemente conduce a la deposición de melaninas como un proceso de reacción inmune del insecto (Nappi, 1975). Es especulable que en el proceso de atrofia participen activamente lisosomas que normalmente intervienen en el transporte de vitelo hacia los oocitos (Roth & Porter, 1964). Procesos de autólisis podrían conducir a la síntesis de melanina como una reacción de defensa (Lipke, 1975).

El proceso de la digestión de sangre por el estómago en los flebótomos es escasamente conocido; se podrían inferir algunos conocimientos a partir de la abundante literatura sobre el proceso digestivo en otros hematófagos. Feng (1951) estudió la formación de la membrana peritrófica en tres especies de flebótomos de China, señalando que la digestión de la sangre se realiza desde la periferia hacia el interior. La digestión es relativamente lenta y en *Phlebotomus papatasi* la hemólisis ocurre aún cuatro días después de la ingesta (Adler & Theodor, 1926). En *Phlebotomus argentipes* es posible reconocer, mediante precipitinas, sangre humana o de ratón ingerida ocho días antes y en pequeña cantidad (Lloyd & Napier, 1930); esta última observación sugirió a Gooding (1972) que algún componente antigénico de la sangre persistía en el estómago resistiendo a la digestión de las enzimas proteolíticas del mismo. El proceso de la digestión estomacal en *Aedes* y *Anopheles* ha sido estudiado por Gander (1968); al final de una primera fase que concluye con la formación de la membrana peritrófica a las 16 horas en *A. egypti* y a las 30 en

*A. stephensi*, cesa la actividad secretora de las células epiteliales y comienza la aparición de gotitas oleosas en la masa sanguínea, iniciándose la fase II con la acumulación de carbohidratos y de lípidos en las células epiteliales. En los flebótomos, a juzgar por los hallazgos de Feng (1951) y de Gemetchu (1974), el proceso de la digestión es similar al de los Culicidae y la presencia de las gotas de lípidos, particularmente de fosfolípidos, podría dar cuenta de la reactividad antigénica tardía del "contenido" del estómago que observaron Lloyd & Napier (1930) y que Gooding (1972) supuso que existía. La cantidad de fosfolípidos es variable en el estómago de las hembras silvestres de *Lu. townsendi* o en las nacidas en el laboratorio y alimentadas sobre el hamster; es especulable la existencia de transporte de fosfolípidos desde la pared gástrica hasta las glándulas accesorias; en estas últimas la acumulación es progresiva y alcanza su máximo al final de la digestión.

La consideración de los tres caracteres morfológicos, cuyos mecanismos de producción hemos discutido para las hembras de *Lu. townsendi*, nos ha permitido diferenciar con un 72% de seguridad, a las hembras nulíparas.

En estudios epidemiológicos sobre leishmaniasis, la segura paridad de los flebótomos no es asunto que tenga mayor importancia que el que se refiere al reconocimiento de hembras que han ingerido sangre de un posible mamífero reservorio. El establecimiento de una infección por leishmanias dermatropas en un flebótomo no requiere de una ingesta completa de sangre o de la sangre misma; a menudo hemos registrado infecciones con gran número de promastigotos que completan su desarrollo anterior en *Lu. townsendi* que se han ingurgitado con linfa sobre la pata de un hamster infectado con *L. mexicana* (Scorza, 1981). En estos términos, lo importante es distinguir a hembras que no han ingerido sangre de aquellas que lo han hecho. Esto es tanto más importante cuando se trabaja con especies que son gonadotróficamente discordantes y que, por ende, necesitan más de una ingesta de sangre para madurar un lote de huevos.

En nuestro trabajo sin embargo, por ser *Lu. townsendi* un flebótomo con concordancia gonadotrófica, hemos prestado particular atención a la condición de los ovarios, especialmente a la presencia de un calix irregular y a oocitos terminales en fase distinta de la fase I de Christophers. Adicionalmente y como un criterio de confirmación, hemos precisado el aspecto de las células gástricas y de las glándulas accesorias, buscando gotitas o gránulos de fosfolípidos respectivamente. La ausencia de un calix acompañado de oocitos en fase I, sin la presencia de fosfolípidos estomacal o en las glándulas accesorias, constituyen de acuerdo con nuestros resultados, caracteres inequívocos de nuliparidad. Según ello, en una muestra de 462 hembras silvestres estos caracteres aparecieron respectivamente en 239 y 251 ejemplares para un 51,7 y 54,3% de nulíparas. La presencia de fosfolípidos en las glándulas accesorias, en estas hembras nulíparas tuvo lugar en un 16,5% de la muestra total y en un 23,1% de las 329 hembras identificadas como nulíparas. 13,9% en la muestra presentaron en el estómago. Tomando en cuenta los cuatro caracteres, contando aquellas hembras sin calix desarrollado y oocitos en fase I, que podían o no presentar fosfolípidos, la proporción de nulíparas alcanzó hasta el 68%. Hembras con cálices ausentes y oocitos en fase diferente a la I, son escasas y apenas alcanzan a un 4% de la muestra total, lo que sugiere que confiando en el carácter condición normal de un calix, el error de nuliparidad es relativamente alto.

La caracterización de las hembras paridas, tomando en cuenta los caracteres en estudios dan mejores resultados; un 106% de las hembras consideradas paridas, 106 entre 130, presentaron cálices hipertrofiados y granulares y con oocitos más avanzados de la fase I y podrían considerarse ciertamente como paridas.

En conclusión, estimamos que es más práctico y seguro precisar un criterio de paridad que otro de nuliparidad. Hembras con ovarios refringentes, sin cálices, y sin fosfolípidos en el estómago o en las glándulas accesorias, aproximan la seguridad del diagnóstico de nuliparidad en un 56,6% de confianza.

## SUMMARY

*Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959) is the main anthropophilic sandfly in endemic places for *Leishmania braziliensis* and *L. garnhami* in Western Venezuela.

The study of laboratory bred females, nulliparous or parous and, wild females fed on man as well as wild females maintained with sucrose, allowed to establish a criterion of nulliparity with 56.6% of confidence for those captured in field conditions. In the same wild females, parity can be assessed with 81.5% of confidence.

After blood digestion of full-engorged females a gonotrophic cycle is completed. Abortive oogenesis and accumulation of phospholipids in midgut epithelial cells and into accessory glands are observed.

The ovoposition produces a thick and irregular ovaric calix with rests of abortive oocytes and accumulation of a melanin-like black pigment. All these changes are enough for identification of a parous fly.

The presence of phospholipids in the stomach and accessory glands of a nulliparous sandfly is indicative of digestion of an incomplete blood meal.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sr. Julio C. Márquez por su constante ayuda en el trabajo de campo; al Lcdo. Ernesto Rodríguez M.Sc. por la colaboración en la interpretación de la data, al Sr. José V. Scorza Jr. por el trabajo microtécnico y a la Sra. Maritza Rondón por la asistencia técnica. A la Lcda. Maritza Carnevali M. Sc. que nos proporcionó flebotomos de su colonia. A la Br. Leyla Abchi por la preparación del manuscrito.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER, S. & THEODOR, O., 1926. The mouthparts, alimentary tract, and salivary apparatus of the female in *Phlebotomus papatasi*. *Ann. Trop. Med. Parasit.*, 20 :109-142.
- BANCROFT, J.D., 1967. *An introduction to histochemical technique*. London, Butterworths, 268 pp.
- CALDERON, L., 1973. *Phlebotomus townsendi* Ortiz, 1959, en una zona endémica de leishmaniasis tegumentaria del Estado Mérida, Venezuela. *Acta Cient. Venez.*, 24 (Supl.) :87.
- CASTRO, T.A. & SCORZA, J.V., 1977. Cultivo de *Lutzomyia townsendi* (Ortiz, 1959), (Diptera, Psychodidae) a partir de una población alopátrica del estado Mérida, Venezuela. *Bol. Dir. Malar. y San. Amb.*, 17 :224-229.
- CHANIOTIS, B.N. & ANDERSON, T.R., 1967. Age structure, population dynamics and vector potential of *Phlebotomus* in Northern California. *J. Med. Ent.*, 4 :251-254.
- CHRISTOPHERS, S.R., 1911. The development of the egg follicle in anophelines. *Paludism*, 2 :73, en Detinova (1962).
- CLEMENTS, A.W., 1963. *The Physiology of Mosquitoes*. MacMillian Co., 393 pp.
- DETINOVA, T.S., 1962. *Age-grouping methods in Diptera of medical importance*. W.H.O. Ginebra, 216 pp.
- FENG, L.C., 1951. The role of the peritrophic membrane in leishmania and trypanosome infections of sandflies. *Pekin Nat. Hist. Bull.*, 19 :327-334.



- GANDER, E., 1968. Zur Histochemie und Histologie des Mittelharnes von *Aedes aegypti* und *Anopheles stephensi* in Zusammenhang mit den Blutverdauung. *Acta Trop.*, 25 :132-175.
- GEMETCHU, T., 1974. The morphology and fine structure of the midgut and peritrophic membrane of the adult female, *Phlebotomus longipes* Parrot and Martin (Diptera: Psychodidae). *Ann. trop. Med. Parasit.*, 68 :111-124.
- GOODING, R.H., 1972. Digestive processes of haematophagous insects. I A literature review. *Questions Entomol.*, 8 :5-60.
- JOHNSON, P.T. & HERTIG, M., 1961. The rearing of *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae). II. Development and behaviour of Panamanian sandflies in laboratory culture. *Ann. Ent. Soc. Amer.*, 54 :764-776.
- KILLICK-KENDRICK, R., 1979. Biology of *Leishmania* in phlebotominae sandflies. En *Biology of the Kinetoplastida*, vol. 2, Ed. por W.H.R. Lumsden y D.A. Evans. Acad. Press, 395-460 p.
- KILLICK-KENDRICK, R.; LEANEY, A.; RIOUX, J.; TURNER, D.; YOUNG, C. & LANOTTE, G., 1978. Marking sandflies with fluorescent powders. Symp. Proc. Med. Entomol. Cent. London, p. 132.
- LARSEN, J.R. & BODENSTEIN, D., 1959. The humoral control of egg maturation in the mosquito. *J. Exp. Zool.*, 140 :343-377.
- LEA, A.O., 1963. Some relationships between environment, corpora allata, and egg maturation in aedine mosquitoes. *J. Insect. Physiol.*, 9 :793-809.
- LEWIS, D.J., 1965. Internal structures of some Central American phlebotomine sandflies. *Ann trop. Med. & Parasit.*, 59 :375-385.
- LEWIS, D.J. & MINTER, D.M., 1960. Internal structural changes in some African Phlebotominae. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 54 :351-365.
- LEWIS, D.J.; LAINSON, R. & SHAW, J., 1970. Determination of parous rates in Phlebotomine sandflies with special reference to Amazonian species. *Bull. ent. Res.*, 60 :200-219.
- LIPKE, H., 1975. Melanin in host-parasite interaction. En *Invertebrate Immunity*. Ed. por K. Maramorosch y R. Shope. Acad. Press., 327-336 pp.
- LLOYD, R.B. & NAPIER, L.E., 1930. The blood-meal of sandflies investigated by means of precipitating antisera. *Indian J. Med. Res.*, 18 :347-359.
- MARTOJA, R. & MARTOJA-PIERSON, M., 1967. *Initiation aux techniques l'histologie animale*. Masson & Cie. Ed., París, 191-192 pp.
- MEOLA, R. & LEA, A.O., 1972. Humoral inhibition of egg development in mosquitoes. *J. Med. Ent.*, 9 :99-103.
- MOGOLLON, J.; MANZANILLA, P. & SCORZA, J.V., 1977. Distribucion altitudinal de nueve especies de *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae), en el estado Trujillo, Venezuela. *Bol. Dir. Malar. y San Amb.*, 12 :206-223.
- NAPPI, A.J., 1975. Parasite encapsulation in insects. En *Invertebrate Immunity*. Ed. por K. Maramorosch y R. Shope Acad. Press, 293-326 pp.
- PEARSE, A.G.E., 1972. *Histochemistry* Vol. 2. Churchill Livingstone, Edimn. & London, 1388-1399 pp.
- PIFANO, F.C.; ALVAREZ, A.; ORTIZ, I., DAGERT, C. & SCORZA, J.V., 1959. *Phlebotomus panamensis* Shannon, 1928; transmisor de la leishmaniasis tegumentaria en Venezuela. *Gac. Med., Caracas*, 68 :229-235.
- ROTH, T.F. & PORTER, K.R., 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. *J. Cell Biol.*, 20 :313-332.

SCORZA, J.V., 1981. Observaciones inéditas.

SCORZA, J.V.; GOMEZ, I. & RAMIREZ, M., 1968. 3. Notas bionómicas sobre *Phlebotomus townsendi* Ortiz, 1959. *Acta Biol. Venez.*, 6 :28-40.

SCORZA, J.V.; ORTIZ, I. & GOMEZ, I., 1968. Observaciones biológicas sobre algunos flebótomos de "Rancho Grande" (Venezuela) 5. Modalidades gonadotróficas de *Phlebotomus townsendi* Ortiz, 1959. *Acta Biol. Ven.*, 6 :52-65.

SCORZA, J.V.; ORTIZ, I. & GOMEZ, I., 1968. 8. Sobre la fluctuación estacional de los flebótomos en los microhabitats. *Acta Biol. Venez.*, 6 :97-104.

SCORZA, J.V.; MACIAS, P.A.; MOGOLLON, J. & MARQUEZ, J.C., 1981. La leishmaniasis de la ciudad de Trujillo, Venezuela. En preparación.

TOMBES, A.S., 1970. *An introduction to Invertebrate Endocrinology*. Acad. Press, 183-193 pp.

WARD, R.D., 1974. Granule formation in the accessory glands of a laboratory strain of *Lu. longipalpis* (Diptera: Phlebotomidae) from Ceará State, Brasil. *Trans. Roy. Soc. trop. Med. & Hyg.*, 68 :171.