

ARTICULO ORIGINAL

Ciclo de vida y colonización de *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae), vector de *Leishmania* spp. en América Latina

Olga L. Cabrera¹, Marisol Neira², Felio Bello³, Cristina Ferro¹

Resumen

Lutzomyia ovallesi (Diptera: Psychodidae), presente en un foco de *Leishmania (V) braziliensis* en Reventones, Cundinamarca, región ubicada en el centro de Colombia, se crió y mantuvo por catorce generaciones bajo condiciones de laboratorio con una temperatura diaria entre 22-28 °C y una humedad relativa entre 90 y 98%. Después de la emergencia, se llevaron machos y hembras a vasos de poliestireno (transparente) y se mantuvieron en una nevera de icopor. La duración de cada uno de los estadios del ciclo de vida observado en las crías individuales fue: huevo 9-12 días (\bar{x} = 10,42, DE = 0,86); larva I 7-11 días (\bar{x} =9,9, DE=3,06); larva II 7-13 días (\bar{x} =9,5, DE= 3,06); larva III 4-12 (\bar{x} =7,4, DE=1,50); larva IV 9-19 días (\bar{x} =15,16, DE=2,66) y pupa 8-16 días (\bar{x} =11, DE=1,89). El tiempo promedio para el desarrollo total del ciclo biológico fue de 63,36 días. La longevidad para las hembras presentó un rango entre 5 y 10 días (\bar{x} =9,36) y para los machos entre 4 y 13 días (\bar{x} =7,44).

Con respecto a la productividad registrada a partir de un promedio de 30 hembras de *Lutzomyia* por vaso de cría, se obtuvo una producción mínima de 260 flebotomos en la quinta generación y una máxima de 4.511 en la décimotercera generación.

Palabras clave: colonización, *Lutzomyia ovallesi*, ciclo de vida.

Life cycle and colonization of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae), vector of *Leishmania* spp. in Latin America

Abstract

The sandfly *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) from a focus of *Leishmania braziliensis* in Reventones, Cundinamarca, central Colombia, was reared and maintained for fourteen generations under laboratory conditions with daily temperature between 22-28 °C and relative humidity between 90 and 98%. Males and females after emergence were kept in clean rearing containers within a poliestirene cage. Life cycle for individual rearing at each stage was as follows: egg, 9-12 days (\bar{x} =10.42, sd=0.86); first stage larva, 7-11 days (\bar{x} =9.8, sd=3.06); second stage larva 7-13 days (\bar{x} =9.5, sd=3.06); third stage larva 4-12 days (\bar{x} =7.4, sd=1.5); fourth stage, 9-19 days (\bar{x} = 15.16, sd=2.6); pupa, 8-16 days (\bar{x} =11, sd=1.89). The average time for total development was 63.36

¹ Laboratorio de Entomología, Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

² Departamento de Química y Biología, Universidad de La Salle, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

³ Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética, Universidad de La Salle, Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

days. The life expectancy of females ranged from 5 to 10 days (\bar{x} =9.36) and males range from 4-13 days (\bar{x} =7.44).

A minimum productivity of 260 sandflies in the F5 generation and a maximum of 4511 sandflies in the F13 generation, were obtained based on an average of 30 females of *Lutzomyia* for rearing vial.

Key words: colonization, *Lutzomyia ovallesi*, life cycle.

Introducción

Lutzomyia ovallesi (Ortiz, 1951) es un flebótomo del grupo *verrucarum* (Theodor 1965) que tiene importancia médica; en Guatemala fue incriminada como vector de *Leishmania braziliensis* (1) y en Venezuela es considerado vector primario de leishmaniasis cutánea (2); en una zona endémica del Estado de Miranda, fue hallada naturalmente infectada con promastigotes identificados como *L. braziliensis* (3). Bofante-Garrido *et al.* aislaron e identificaron de esta especie un híbrido entre *L. braziliensis* y *L. guyanensis* (4); por otro lado, M.A. Barrios *et al* aislaron un híbrido formado por *L. braziliensis* y *L. mexicana* (5). En Belice, Panamá y Colombia ha sido hallada infectada con flagelados no identificados (6,7), y en Panamá es señalada como vector sospechoso de *L. panamensis* (8). *L. ovallesi* fue descrita originalmente en Venezuela, a partir de insectos capturados en Duaca, Estado de Lara (9). Su distribución geográfica en América Central corresponde a todos los países: México, Honduras, Guatemala, Nicaragua, Belice, Costa Rica y Panamá (9) y en el noroccidente de América del Sur ha sido registrada en Colombia, Venezuela y la isla de Trinidad (9-11). En Colombia, el primer hallazgo de esta especie se hizo con material recolectado en el Chocó, Osorno *et al.* 1967 (11) y su actual distribución en el país es relativamente amplia con registro para Tolima, Sucre (12), Cundinamarca, Caldas, Boyacá, Santander, Norte de Santander, Antioquia, Magdalena y Chocó (13).

El grupo *verrucarum* (Theodor, 1965) está formado por 28 especies, de las cuales la mayoría son originarias de los Andes colombiano-venezolanos, en áreas montañosas y cafeteras (14, 15). Quince de estas especies están presentes en Colombia y ocho ya han sido

descritas en el país (13); la mayoría es considerada importante en salud pública por ser vectores confirmados o sospechosos (16).

El establecimiento de colonias de flebótomos es de gran importancia en entomología, puesto que permite obtener información de los aspectos básicos del ciclo de vida del desarrollo de los estadios inmaduros y de la longevidad de los adultos, aspectos imposibles de observar en estos insectos vectores en el campo (17); además, permite disponer de material para la realización de ensayos de competencia vectorial. De las especies de *Lutzomyia* del grupo *verrucarum* presentes en Colombia, siete han sido mantenidas por varias generaciones bajo condiciones experimentales; *L. youngi* por seis generaciones en Venezuela (18) y nueve en Colombia (19); *L. ovallesi* por seis (18); *L. torvida* por cuatro; *L. quasitownsendi* por veintidos; *L. spinicrassa* por veintiuna; *L. longiflocosa* por diecisiete (20) y *L. evansi* por cinco generaciones (17).

Estudios entomológicos realizados en el foco endémico de *L. braziliensis* en Reventones, municipio de Anolaima (Cundinamarca) (9), revelan que *L. ovallesi* representa la segunda especie en abundancia (14,49%) después de *L. torvida* (78,83%) (21); considerando los antecedentes descritos anteriormente, el presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el ciclo de vida de *L. ovallesi* (Ortiz, 1952), especie antropofílica presente en el foco estudiado, y mantenerlo por varias generaciones hasta lograr su colonización.

Materiales y métodos

Los adultos de *L. ovallesi* fueron capturados en la vereda El Platanal, inspección de Reventones, el 27 de febrero y 11 de marzo de 1997 entre las 18:00 y las 22:00 horas, período seco en el cual

la precipitación mínima fue de 0,0 mm y la máxima de 32,5 mm; la temperatura máxima y la humedad relativa registrada en los días muestreados fue de 28 °C y 76,7%, respectivamente, para una zona localizada a una latitud 4° 57' N, una longitud 74° 25' W y a una altura de 1.450 m, datos cercanos a los de la zona estudiada (información suministrada por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia).

Para las capturas se utilizó trampa Shannon y cebo humano protegido; a medida que llegaban los insectos se recogían con un aspirador de boca y se llevaban al interior de una jaula de tela delgada y transparente (muselina) de 25x25 cm. Una vez recogido el material y para evitar cambios fuertes de humedad y temperatura, la jaula con los insectos se colocó en una caja de poliestireno (icopor); antes de cerrar la caja, se les suministró agua y solución azucarada, saturada, en motas de algodón ubicadas en la parte superior de la jaula. A la mañana siguiente, se transportaron al Laboratorio de Entomología del INS en Santa Fe de Bogotá.

En el insectario, las hembras se expusieron para la respectiva ingestión sanguínea durante 40 minutos sobre un hámster anestesiado, con una dosis de pentotal sódico de 10 mg/kg del peso del animal (22). 80% de las hembras llenas de sangre se dispuso para cría masiva; para la obtención más precisa de la duración de cada uno de los estadios del ciclo de vida, se colocaron individualmente en vasos de cría 40 hembras alimentadas; todos los adultos se mantuvieron en los vasos mencionados dentro de una nevera de icopor en el insectario y diariamente se les proporcionó solución azucarada, saturada, y agua; los adultos se llevaban al interior de una jaula únicamente cuando requerían de ingestión de sangre (tres días después de la emergencia; la figura 1 muestra el manejo dado a cada réplica en el laboratorio); la temperatura bajo la cual se mantuvieron estuvo entre 22 y 28 °C y la humedad relativa entre 90-98%. Los vasos de cría utilizados fueron preparados con anterioridad siguiendo las indicaciones de R.G. Endris *et al.* (23). Después de la oviposición, las hembras muertas se removieron y se les hizo un tratamiento con KOH al 10% y fenol, de acuerdo

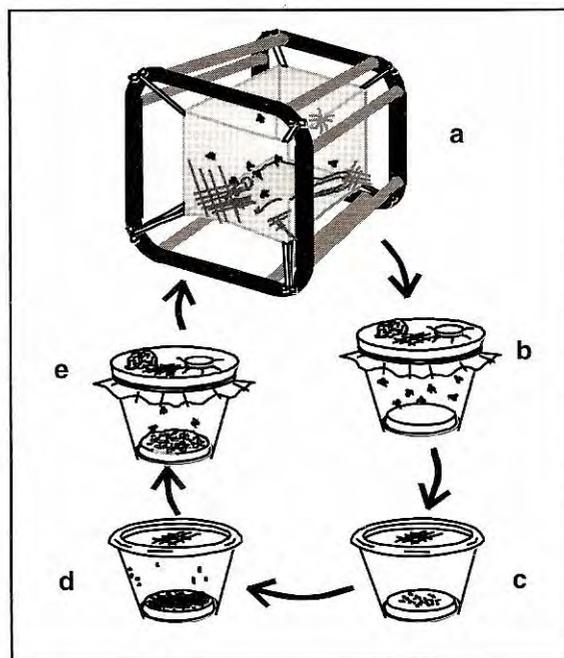


Figura 1. Manejo de las muestras de *L. ovallesi* en el laboratorio.

- a. Alimentación de las hembras sobre hámster anestesiado
- b. Hembras alimentadas en vaso de cría (base de yeso)
- c. Oviposición
- d. Suministro de alimento a las larvas
- e. Emergencia de adultos

con el protocolo ajustado por el Laboratorio de Entomología del INS; se identificaron según las claves taxonómicas de Young, 1979, Young & Duncan, 1994, observando los principales caracteres diagnósticos; además, se contó con la ayuda de la colección de referencia del INS. Diariamente se hizo un seguimiento a cada muestra con el fin de controlar la temperatura y la humedad. Después de la eclosión, a las larvas se les ofreció alimento (materia orgánica envejecida) preparado según D.G. Young *et al.* (24) y modificado por Ferro *et al.* (25), el cual se suspendió cuando las larvas de IV estadio empezaban a disminuir su actividad alimenticia y su movilidad, entrando al periodo prepupal.

Para determinar la longevidad de machos y hembras, se reunieron en un vaso ejemplares nacidos el mismo día. Se registró el número de insectos muertos por día y el sexo al que pertenecían.

Resultados

En el primer muestreo, se recolectó un total de 337 insectos distribuidos en cinco especies; las más abundantes correspondieron a *L. torvida* (66%) y *L. ovallesi* (17,2%), seguidas por *L. nuñeztovari* (14,1%), *L. pia* (2,1%) y una especie del subgénero *Helcocyrtomyia* cercana a *L. scorzai* (0,6%); del muestreo realizado en marzo, se obtuvieron 772 insectos que correspondieron a las tres primeras especies mencionadas, con porcentajes de 63,4, 23,3 y 9,3, respectivamente. Vale la pena resaltar que en el último día de muestreo del mes de marzo, realizado con trampa Shannon, predominó *L. ovallesi*, obteniéndose un total de 197 hembras (28 hembras/hora/persona) de *L. ovallesi*, con respecto a 119 hembras (17 hembras/hora/persona) de *L. torvida*.

El rango de duración y el promedio en días para cada uno de los estadios del ciclo de vida de *L. ovallesi* observado en 10 generaciones (4-13 generación) fue: para huevo, 7-15 (10,3); para larva I, 5-10 (7,04); para larva II, 4-12 (6,35); para larva III, 4-12 (6,30); para larva IV, 4-13 (7,5); para pupa, 6-16 (9,92), y el promedio observado en las muestras individuales fue, para huevo, 10,3; para larva I, 9; para larva II, 9,3; para larva III, 7,4; para larva IV, 15,2 y para pupa 10,9, con un promedio para el ciclo total de 62,1 días, (figuras 2, 3 y 4).

Se observó que las hembras silvestres de *L. ovallesi* requieren de 5,3 días para completar su ciclo gonadotrófico, mientras que las hembras obtenidas en la colonia requieren de 4,2 días.

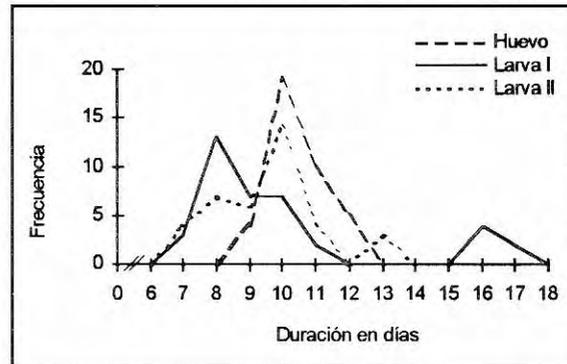


Figura 2. Rangos de duración para huevo, larva I y larva II de *L. ovallesi*.

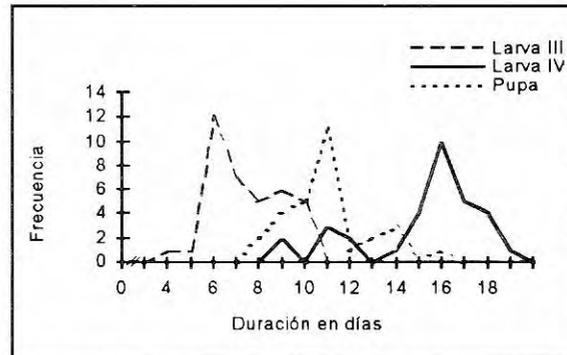


Figura 3. Rangos de duración para la larva III, larva IV y pupa de *L. ovallesi*.

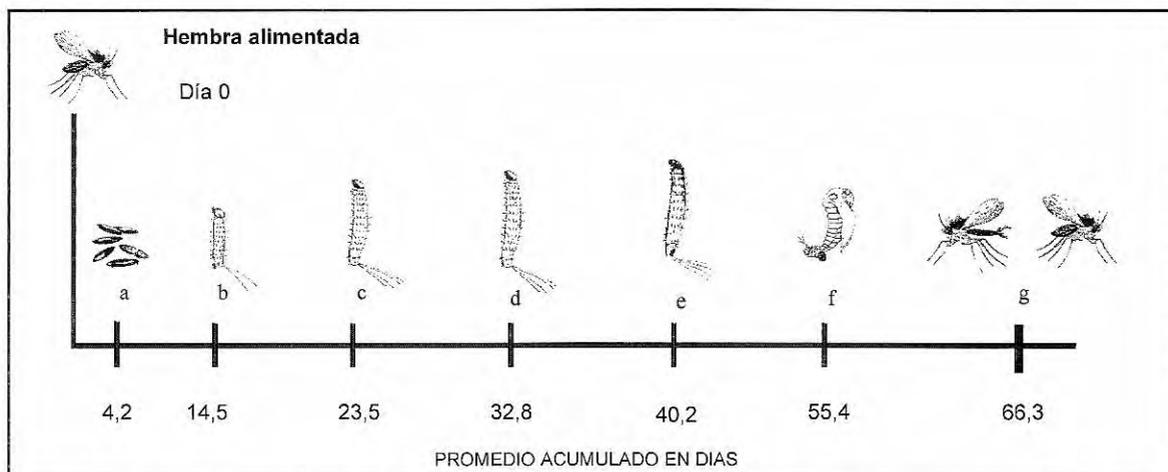


Figura 4. Promedio acumulado de la duración en días para los diferentes estadios de *L. ovallesi* (Diptera: Psychodidae). a. Huevo, b. Larva I, c. Larva II, d. Larva III, e. Larva IV, f. Pupa, g. Adulto macho y hembra.

La longevidad promedio para las hembras (en días) fue de 9,36, con un rango entre 5 y 10 días; para los machos fue de 7,44 con un rango entre 4 y 13 días.

Respecto a la cría masiva, se inició con la mezcla de las tres especies más abundantes: *L. torvida*, *L. ovallesi* y *L. nuñeztovari*; durante tres generaciones se mantuvo esta mezcla; a partir de la cuarta generación, *L. ovallesi* se perfiló como la única; las otras dos especies desaparecieron.

La tasa de mortalidad registrada para esta especie fue baja, tan sólo se observó un 7,7% para huevo y un 10,4% para pupa.

La productividad observada, reuniendo en un mismo vaso de cría un promedio de 30 hembras alimentadas, aumentó progresivamente; es decir, en la cuarta generación se obtuvo un total de siete vasos y, en la última generación, 26 con un número mínimo de 260 individuos (99 machos y 161 hembras F5) y un número máximo de 4.511 individuos (2.006 machos y 2.505 hembras F13); es decir que entre la F5 y la F13 en colonia, el número de hembras aumentó 15 veces.

Discusión

En América Latina, Venezuela, Brasil y Colombia han sido pioneros en el desarrollo de estudios de colonización y mantenimiento en el laboratorio de especies de flebotomos que desempeñan un papel importante en salud pública. En Colombia, en el insectario del Laboratorio de Entomología del Instituto Nacional de Salud, se han mantenido colonias estables por más de cuarenta generaciones consecutivas de *L. longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912), *L. shannoni* (Dyar, 1929) y *L. quasitownsendi*, (Osorno *et al.* 1972) (21, 26, 27). Las de *L. longiflocosa*, (Osorno-Mesa *et al.* 1970), *L. spinicrassa*, (Moraes *et al.*, 1969) y *L. walkeri* (Newstead, 1914) se mantuvieron por más de 10 generaciones y, luego, presentaron problemas, hasta que finalmente desaparecieron, lo que se atribuyó, principalmente, a la inapetencia de las hembras por la comida de sangre, disminución en el número de huevos ovipositados, mortalidad de las larvas de IV estadio y dificultad para pasar a

pupa. En el Cideim, en Cali, se mantuvieron las especies *L. longipalpis* (Lutz y Neiva, 1912), *L. gomezi* (Nitzulescu, 1931), *L. lichyi* (Floch y Abonnenc, 1950) y *L. evansi* (Nuñez-Tovar, 1924) (17).

El éxito en el establecimiento de una colonia de *Lutzomyia* depende no sólo del cuidado diario, sino, además, de las condiciones ambientales estables bajo las cuales se mantienen, del alimento preparado para las larvas y de la ingestión de sangre por parte de los adultos hembras. *L. ovallesi* es una especie que no presentó mayores problemas en su proceso de adaptación a los cambios ambientales ofrecidos; el método utilizado para el mantenimiento de los adultos y las nuevas modificaciones que le fueron incorporadas representa un aporte para los trabajos relacionados con cría y mantenimiento de flebotomos; como consecuencia, la productividad a partir de la cuarta generación ha sido relativamente alta (datos no publicados, Laboratorio de Entomología); en ocho generaciones, la colonia aumentó 17 veces el número de individuos.

El alimento preparado en el laboratorio y proporcionado a partir del primer estadio larval ha resultado apropiado; la mortalidad observada fue poco representativa; de igual manera, la temperatura y la humedad relativa mantenidas durante el estudio fueron adecuadas para las larvas de esta especie.

Los porcentajes de mortalidad señalados para los estadios de huevo y pupa, caracterizados por su inmovilidad, fueron mayores con respecto a los observados en las larvas; es muy probable que las condiciones en las cuales se mantuvieron no fueran las más adecuadas y que la presencia de depredadores (ácaros) en los vasos de cría afectaran principalmente a las pupas.

El valor promedio del ciclo de desarrollo obtenido en este trabajo para *L. ovallesi*, se encuentra dentro del rango determinado para esta especie. E. Nieves obtuvo un promedio de 48,9 días con un rango entre 34 y 72 días (18). Con respecto a especies de la misma serie (*verrucarum*), Mirsa encontró que, bajo condiciones apropiadas de temperatura y humedad relativa, *L. evansi*

presenta un tiempo de desarrollo entre 31-51 días (28); Montoya y colaboradores refieren una duración promedio del ciclo de vida para esta misma especie de 41,8 días.

Al comparar la duración del ciclo de vida de *L. ovallesi* con la duración determinada para especies cercanas (serie *townsendi*), como *L. torvida* y *L. longiflocosa* (29), criadas en el mismo laboratorio y cuyos valores promedios fueron de 95,85 y 93,79 días respectivamente, se aprecia la prolongada duración para estas especies en contraste con el promedio registrado para la especie aquí estudiada.

Lo anterior sugiere que *L. ovallesi* es una especie colonizable bajo las condiciones descritas; además, presenta un ciclo de vida corto que facilita los estudios de competencia vectorial, criterio importante en el proceso de incriminación. En Colombia, esta especie aún no es un vector confirmado, pero sí es considerada vector sospechoso, por su abundancia (30), por encontrarse infectada naturalmente con flagelados (31) en los focos de Arboledas (Norte de Santander) y La Mesa (Cundinamarca) (datos no publicados, Laboratorio de Entomología, INS); además, por ser susceptible a infectarse con *L. braziliensis* en ensayos de infección experimental con ejemplares procedentes de Reventones (Cundinamarca) (32).

Aunque *L. ovallesi* capturada en Reventones, foco de *L. braziliensis*, no representa la especie predominante, puede estar involucrada en la transmisión del parásito, desempeñando un papel complementario o secundario en el ciclo epidemiológico de la leishmaniasis, probablemente en época seca.

Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a Colciencias por la cofinanciación del proyecto, código NO. 1243-04-179-95; a Erika Santamaría y a Marco Fidel Suárez del Laboratorio de Entomología.

Referencias

1. Rowton E, De Mata M, Rizzo N, Porter C, Navin T. Isolation of *Leishmania braziliensis* from *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 1992;46:4 465-8.
2. Feliciangeli MD, Rodríguez N, Bravo A, Arias F, Guzmán B. Vectors of cutaneous leishmaniasis in north-central Venezuela. *Med Vet Entomol* 1994; 8:317-24.
3. Feliciangeli MD, Reyes RM, Limongi JE. Natural infections of *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) with parasites of the *Leishmania braziliensis* complex in a restricted focus of cutaneous leishmaniasis in northern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1988;83:393-4.
4. Bofante-Garrido R, Spinetti H, Cupillo E, Momen H, Grimaldi G. *Lutzomyia ovallesi* (Diptera: Psychodidae) as a vector of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Parassitologia* 1991;33:1 99-104.
5. Barrios MA, Rodríguez N, Feliciangeli DM, Ulrich M, Pinardi ME. Coexistence of two species of *Leishmania* in the digestive tract of the vector *Lutzomyia ovallesi*. *Am J Med Hyg* 1994;51:5 669-75.
6. Williams P. Phlebotomine sandflies and leishmaniasis in British Honduras (Belize). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1970;64:317-68.
7. Young DG, Morales A, Kreutzer RD, Alexander JB, Corredor A, Tesh RB. Isolations of *Leishmania braziliensis* from cryopreserved Colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1987;24:587-9.
8. Christensen HA, Fairchild GB, Herrero A, Johnson CM, Young DG, De Vasquez AM. The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. *J Med Entomol* 1983;20:453-84.
9. Young DG, Duncan M. Guide to the identification and geographic distribution of *Lutzomyia* sand flies in Mexico, the West Indies, Central and South America (Diptera: Psychodidae). Gainesville, FA. Associated Publishers 1994:181.
10. Osorno E, Morales A, De Osorno F, Ferro C. Phlebotominae de Colombia (Diptera: Psychodidae) IX. Distribución geográfica de especies de *Brumptomyia* Franca y Parrot, 1921 y *Lutzomyia* Franca, 1924 encontradas en Colombia. *Acad Col Cien Exac Fis Nat* 1972;14:53 45-68.
11. Young DG. A review of the bloodsucking Psychodidae flies of Colombia (Diptera: Phlebotominae and Sycoracinae). University of Florida Agricultural Experiment Stations Bull 806; 1979.
12. Morales A, Corredor A, Cáceres E, Ibagos AL, De Rodríguez C. Aislamiento de tres cepas de *Leishmania* a partir de *Lutzomyia trapidoi* en Colombia. *Biomédica* 1981;1(4):198-207.
13. Montoya J, Ferro C. Flebotomos (Diptera: Psychodidae) de Colombia. 1998. En prensa.
14. Feliciangeli DM, Arredondo C, Ward RD. Phlebotomine sandflies in Venezuela: Review of the *verrucarum* species group of *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) with description of a new species from Lara. *J Med Entomol* 1992;29:729-44.

15. **Warburg A, Montoya J, Jaramillo C, Cruz AL, Ostrovska K.** Leishmaniasis vector potential of *Lutzomyia* spp. in Colombian coffee plantations. *Med Veterinary Entomol* 1991;5:9-16.
16. **Wolff M.** Flebotomíneos en el Departamento de Antioquia: Informe de la presencia de nuevas especies para la región. *Entomólogo* 1994;22:77 2-6.
17. **Montoya J, Cadena H, Jaramillo C.** Rearing and colonization of *Lutzomyia evansi* (Diptera: Psychodidae), a vector of visceral leishmaniasis in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93(2):263-8.
18. **Nieves E.** Problemas de colonización de especies flebotomíneas bajo condiciones de laboratorio con especial referencia a *Lutzomyia youngi*, *Lutzomyia ovallesi* y *Lutzomyia migonei* (tesis) Mérida, Venezuela. Univ. de los Andes; 1995.
19. **Santamaría E, Ferro C.** Productividad y desarrollo larval en relación con la densidad de individuos en una colonia de *Lutzomyia youngi*. XXVI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN 1999:56.
20. **Morales A, Suárez M, Cabrera OL, Neira M, Bello F, Ferro C.** Colonización de algunas especies de la serie townsendi, grupo *verrucarum*, presentes en Colombia. *Biomedica* 1997;17(2):157.
21. **Ferro C, Cabrera OL, Ayala M, Santamaría E, Castillo M, Cárdenas R, et al.** Especies del grupo *verrucarum* (Diptera: Psychodidae) y su papel como vectores en dos focos de *Leishmania braziliensis* del centro de Colombia. XXV Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN, 1998:41.
22. **Killick-Kendrick R, Leaney AJ, Ready PD.** The establishment, maintenance and productivity of a laboratory colony of *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *J Med Ent* 1977;13:4,5 429-40.
23. **Endris RG, Perkins PV, Young DG, Johnson RN.** Techniques for laboratory rearing of sand flies (Diptera: Psychodidae). *Mosquitos News* 1982;42:3 400-7.
24. **Young DG, Perking PV, Endris RG.** A larval diet for rearing phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1981;18: 446.
25. **Ferro C, Cárdenas E, Corredor D, Morales A, Munstermann L.** Life cycle and fecundity analysis of *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93:195-9.
26. **Ferro C, Morales A.** Flebotómos de Colombia: estudios realizados por el Laboratorio de Entomología, 1965 - 1997. En: Toro G, Hernández CA, Raad J, editores. Instituto Nacional de Salud 1917-1997: una historia, un compromiso. Santa Fe de Bogotá: Instituto Nacional de Salud, 1998:219-33.
27. **Cabrera OL, Morales A, Suárez M, Díaz A, Ferro C.** Ciclo de vida de *L. quasitownsendi* y evolución del tiempo de desarrollo a través de 22 generaciones. *Biomédica* 1997;17:1 82.
28. **Mirsa A.** Sobre la biología de algunos flebotómos (Diptera: Psychodidae) y datos sobre otros hematófagos colectados en Altagracia de Orituco (Estado Guárico, Venezuela). *Rev San y Asist Social* 1953;18:(5,6):789-96.
29. **Neira M, Díaz-Martínez A, Bello F, Ferro C.** Estudio en condiciones de laboratorio de los ciclos de vida de *Lutzomyia torvida* y *Lutzomyia longiflocosa* (Diptera: Psychodidae), posibles vectores de *Leishmania braziliensis* en la zona cafetera colombiana. *Biomédica* 1998;18(4):251-5.
30. **Alexander B, Ferro C, Young DG, Morales A, Tesh RB.** Ecology of phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a focus of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in north-eastern Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87(3):387-95.
31. **Young DG, Morales A, Kreutzer RD, Alexander JB, Corredor A, Tesh RB, Ferro C, de Rodríguez C.** Isolations of *Leishmania brasiliensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) from cryopreserved Colombian sand flies (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol* 1987;24:587-9.
32. **Santamaría E, Castillo M, Cárdenas R, Bello F, Ayala M, Ferro C.** Competencia vectorial de las especies de *Lutzomyia* del grupo *verrucarum* (Diptera: Psychodidae) en un foco endémico de *Leishmania braziliensis* en Reventones, Cundinamarca. *Biomédica* 1999;19(2):115-26.