



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado

Efecto insecticida de *Azadirachta indica*
frente a *Phlebotomus papatasi*

Raquel Herrero Agost

Director

Javier Lucientes Curdi

Facultad de veterinaria

2015

Índice

Resumen-Summary	2
1. Introducción	3
1.1. Leishmaniasis	3
1.1.1. Ciclo biológico	5
1.2. Los flebotomos	6
1.2.1. Control de flebotomos	9
1.3. Árbol de Neem	12
2. Justificación y objetivos.	14
3. Metodología.	15
4. Resultados y discusión	18
5. Conclusiones-Conclusions	24
6. Valoración personal y agradecimientos	26
7. Bibliografía consultada.	27

Resumen

Los flebotomos son los principales vectores de importantes enfermedades, entre las que destaca la Leishmaniasis. Las características de su ciclo, así como el amplio rango de hospedadores a los que afecta, hacen que su control sea especialmente difícil.

El árbol de Neem es originario de la India y tiene efectos inhibidores sobre el desarrollo de muchos insectos, pero no se había probado nunca su acción frente a flebotomos. El uso de un producto natural en el control de éstos vectores puede suponer el inicio del control de una enfermedad con elevada prevalencia, sobre todo en países en desarrollo. Principalmente, en el país originario de dicho árbol, donde no existe reservorio vertebrado animal, sino que el reservorio para *Leishmania donovani* es el propio hombre, y por lo tanto la acción debe centrarse en el vector, *Phlebotomus argentipes*.

Con este trabajo se ha comprobado que el "Insecticida natural de NEEM" tiene efectos larvicidas y de inhibición de la emergencia en *Phlebotomus papatasi*, a dosis 1,6%, 3,2% y 6,4%. De hecho, se obtuvieron valores del 100% de mortalidad con las tres dosis probadas. Por lo tanto, podemos estar ante una herramienta muy útil en el control de los vectores de la Leishmaniasis.

Summary

The insecticidal effect of *Azadirachta indica* against a *Phlebotomus papatasi*

Sandflies are the main vectors of important diseases, most notably Leishmaniasis. Their cycle characteristics and the broad host range affected, makes its control especially difficult.

Neem tree is native to India and has inhibitory effects on the development of many insects, but had never tested its action against sandflies. The use of a natural product in controlling these vectors can be the beginning of the control of a disease with a high prevalence, especially in developing countries. Mainly in the country of origin of the tree, where there is no reservoir vertebrate animal, but the reservoir for *Leishmania donovani* is the man itself, and therefore action should focus on the vector, *Phlebotomus argentipes*.

This work has shown that the "natural insecticide NEEM" has larvicidal effects and inhibition of *Phlebotomus papatasi* emergency at doses 1.6%, 3.2% and 6.4%. In fact, values of 100% mortality was obtained with the three doses tested. Therefore, we could be facing a very useful tool in controlling the vectors of leishmaniasis.

1. Introducción

1.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria producida por protozoos del género *Leishmania*, endémica en Europa. Su transmisión se produce por la intervención de hembras hematófagas de pequeños dípteros que pertenecen a la Familia Psychodidae y Subfamilia Phlebotominae.

Puede afectar a un gran número de hospedadores vertebrados, entre los que tenemos en orden de importancia, a cualquier cánido, humanos (aquí no se produce enfermedad a menos que exista inmunodepresión o en niños), gato (no se ha podido demostrar enfermedad visceral y además es mal transmisor), lepóridos. Por ejemplo, el fundamental transmisor en un reciente foco en Madrid ha sido la Liebre, que no sufre la enfermedad pero es un buen reservorio. La prevalencia en conejos es menor y tienen menos capacidad infecciosa para los flebotomos, al igual que los roedores, y en équidos y rumiantes los hallazgos han sido cutáneos y puntuales.

En el hombre puede cursar de forma asintomática o dar lugar a dos formas de enfermedad dependiendo de la especie de *Leishmania* y del individuo afectado. En ocasiones, pueden aparecer úlceras cutáneas de evolución benigna que a veces se complican como formas mucocutáneas, leishmaniasis cutáneas difusas o lesiones recidivantes. En otras ocasiones pueden provocar formas viscerales de evolución fatal que, según la zona geográfica, pueden derivar –a pesar del tratamiento– a leishmaniasis dérmicas post-kala-azar.

La mayor parte de los casos viscerales se concentra en el subcontinente Indio y en el este de África, mientras que el 90% de los casos cutáneos aparece en el suroeste de Asia y norte de África. En la India, *L. donovani* es causante de la grave enfermedad de Kala-Azar, y el vector responsable de su transmisión es *Ph. argentipes*. En Europa nos encontramos con *Leishmania infantum*, que da lugar a la enfermedad que se encuentra de forma endémica –Leishmaniasis zoonótica– principalmente en la cuenca mediterránea, con bajas tasas de prevalencia humana; y en España concretamente son *Ph. perniciosus* y *Ph. ariasi* los principales vectores implicados en su transmisión. La prevalencia e incidencia sólo pueden ser estimadas de manera tentativa por ser enfermedades de transmisión rural y porque muchos casos no son diagnosticados por falta de atención médica o por ser asintomáticos. Por ello, las cifras que manejan los países sólo son aproximadas.

En España, el principal número de casos humanos se produce en la Comunidad Valenciana, seguida por las de Madrid y Cataluña con un promedio total de unos 100 nuevos casos al año, de los cuales un 90% se corresponden con la forma de leishmaniosis visceral. Afecta

principalmente a adultos jóvenes, asociándose en un 43% de los casos a estados de inmunosupresión. En el 27,8 % de los casos existe coinfección con VIH.

Se estima que en España, el 7% de la población canina está infectada, aunque existen regiones donde se llega hasta un 35%. La prevalencia se establece mediante encuestas seroepidemiológicas, pese al inconveniente de que los resultados den lugar a sobreestimar (falsos positivos en casos de reacciones cruzadas con *Ehrlichia* o *Babesia*) o subestimar, ya que no todos los perros presentan un nivel de anticuerpos detectable con las técnicas convencionales, y en algunos casos, en el momento de la prueba todavía no se ha producido la seroconversión pese a estar infectados. El resultado de estas pruebas indica que entre el 50 y el 60% de los perros son positivos sin síntomas, y un 20% de ellos presenta parásitos en la piel. Estos perros, asintomáticos y con leishmaniasis cutáneas, son los auténticos portadores y por lo tanto, los que implican un mayor riesgo epidemiológico. Hasta el 15% de los infectados son capaces de superar el parasitismo sin sufrir enfermedad, de forma espontánea; el resto de animales terminará presentando síntomas.

La enfermedad en perros determina frecuentemente un proceso patológico grave, de curso crónico e insidioso que suele conducir a la muerte del animal, cuya sintomatología es muy variable. Algunos de los signos clínicos más frecuentes en perros son la pérdida de peso sin pérdida del apetito, dermatitis exfoliativa, linfadenopatía periférica y enfermedad renal progresiva. No obstante, también puede darse el caso en perros de que no se produzca enfermedad, o que el curso de la misma sea agudo. Lo que produce la muerte del animal no es directamente el parásito, sino una respuesta humoral elevada. La elevada síntesis de anticuerpos provoca la formación de inmunocomplejos que se adhieren al glomérulo renal, impidiendo el filtrado de la sangre y desencadenando una insuficiencia renal que termina siendo letal.

En cuanto al tratamiento, en torno a un 70% responde clínicamente a la terapia, pero hasta un 50% sufren reactivaciones o permanecen infectados pero asintomáticos, suponiendo un reservorio de la enfermedad.

El hecho de que se trate de una zoonosis, hace que la parasitación canina suponga un problema sanitario considerable en nuestro país, donde el perro actúa como reservorio. La Leishmaniosis una de las cinco enfermedades parasitarias más importantes, siendo de gran importancia el control tanto de la enfermedad en el reservorio como de los vectores. En otros países, en los que no existen reservorios, el control debe realizarse fundamentalmente sobre el vector.

1.1.1. Ciclo biológico de *Leishmania*

Los protozoos del género *Leishmania* son parásitos heteroxenos, ya que parte de su ciclo biológico tiene lugar en el aparato digestivo del hospedador invertebrado, y parte en células del sistema reticuloendotelial del hospedador vertebrado. El vector (hospedador intermedio) que vehicule el parásito depende de la localización geográfica. En el viejo mundo *Leishmania* se multiplica en *Phlebotomus* spp., mientras que en América lo hace en *Lutzomyia* spp. y en África en insectos del Género *Sergentomyia*.

Estos vectores son de ambientes terrestres, y por ello en inglés se conoce a los flebotomos como Sand Fly (mosca de la arena). Las hembras de estos insectos son hematófagas, pero solamente con fines reproductivos. Los adultos presentan un aparato picador-chupador, y para alimentarse de sangre realizan pequeños cortes en la piel; en este momento quedan libres los amastigotes -forma intracelular de *Leishmania* en el hospedador vertebrado- que están en los macrófagos cutáneos, ingiriéndolos. En el intestino medio, que realiza funciones de estómago, los amastigotes se transforman en promastigotes con un largo flagelo anterior. Mediante este flagelo, el promastigote se fija a la mucosa del intestino medio del flebotomo y se multiplica repetidas veces. A continuación, realiza una migración hasta la faringe en forma de promastigote metacíclico, que es la forma infectante que inoculará al hospedador vertebrado.

Cuando esto ocurre, los macrófagos sanguíneos y reticuloendoteliales comienzan a fagocitar los parásitos presentes en la lesión. Una vez en el interior del macrófago, *Leishmania* comienza a dividirse, transformándose en amastigotes de pequeño tamaño, que continúan su división intracelular hasta agotar los recursos de la célula hospedadora. Entonces, los amastigotes son liberados y otros macrófagos los fagocitan, repitiendo el ciclo intracelular. Los parásitos en el interior de los macrófagos pueden permanecer en el lugar de la picadura o dirigirse a distintas partes del cuerpo (órganos internos), dando lugar a las distintas formas de enfermedad.

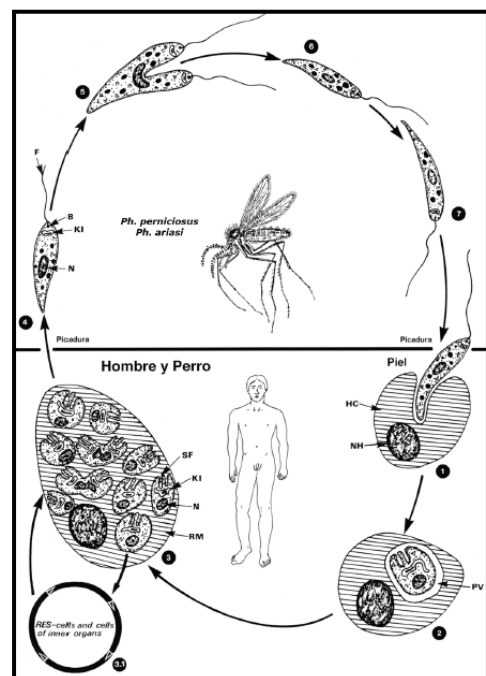


Figura 1. Ciclo de *Leishmania* en los hospedadores vertebrado e invertebrado. (Jorge P. Alvar Ezquerro, 2001)

El desarrollo del parásito en la dermis dura aproximadamente un mes; si cuando el parásito llega a los órganos del aparato retículo-endotelial el sistema inmune sigue sin ser capaz de controlar la multiplicación, se expresa la enfermedad.

1.2. Los Flebotomos

Se trata de insectos del orden Diptera (Nematocera), subfamilia Phlebotominae, que engloba tres géneros. El género *Phlebotomus* presenta numerosas especies, entre ellas *Ph. perniciosus*, *Ph. ariasi*, *Ph. langeroni*, *Ph. perfiliewi*, *Ph. mascitti*, *Ph. neglectus*, *Ph. tobbi*, *Ph. argentipes*. Los otros géneros son el G^o *Lutzomyia*, presente en América; y el *Sergentomyia*, reconocido vector de *Sauroleishmania* de reptiles en África y Europa.

En España tenemos especies del G^o *Phlebotomus* y *Sergentomyia*, de los cuales nos importan principalmente las especies *Ph. perniciosus* y *Ph. ariasi*, vectores de *Leishmania infantum*.

	Complejo	Especies	Vector principal	Localización geográfica	Hospedador definitivo	Forma de enfermedad
Sección suprapilórica		<i>L. (L.) donovani</i>	<i>Ph. argentipes</i>	Subcontinente indio	Humanos (no zoonosis)	Visceral
	Complejo Leishmania (Leishmania) donovani	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>Ph. perniciosus</i>	Mediterráneo, en Oriente Medio, Noreste de África, China...	Perro, hombre, gato, roedores, lagomorfos y accidentalmente équidos (sin causarles enfermedad)	Visceral (perro) y cutánea (resto)
	Complejo Leishmania (Leishmania) tropica	<i>L. (L.) tropica</i> <i>L. (L.) major</i> <i>L. (L.) aethiopica</i>	<i>Ph. sergenti</i> <i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. longipes</i> y <i>Ph. pedifer</i>	Mediterráneo	Humanos y roedores (jerbos reservorio)	Cutánea
	Complejo Leishmania (Leishmania) mexicana	<i>L. (L.) mexicana</i> <i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>Lutzomyia olmeca</i> <i>Lu. flaviscutellata</i>	América	Humanos y roedores	Cutánea
Sección peripilórica	Complejo Leishmania (Viannia) braziliensis	<i>L. (V.) braziliensis</i> <i>L. (V.) guyanensis</i> <i>L. (V.) peruviana</i>	Varias especies de <i>Lutzomyia</i>	América	Humanos, roedores y marsupiales	Muco-cutánea

Tabla 1. Especies de *Leishmania*, con sus vectores, distribución, especies afectadas y enfermedad que produce.

Los flebotomos sufren una metamorfosis completa u holometábola, pasando por los estadios de huevo, larva, pupa e insecto adulto volador (Figura 2). Los huevos son ovalados con superficie en forma de escamas que hacen dibujos de interés taxonómico. Se suceden cuatro estadios larvarios de aspecto vermiforme, con la cabeza bien diferenciada de color marrón, un par de antenas cortas y aparato bucal de tipo masticador. Su cuerpo es alargado, cilíndrico y segmentado. La parte torácica está formada por tres segmentos poco marcados y la abdominal por nueve, con dos largas sedas caudales características de los flebotomos en el último. La pupa mide unos 3 mm de

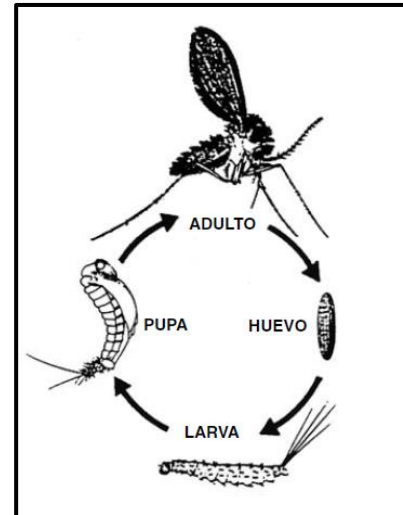


Figura 2. Ciclo vital de los Flebotomos. (Alvar-Ezquerro J.P., 2001).

longitud y tiene forma de porra. La parte abdominal es la más estrecha y está curvada, estando la cabeza y el tórax dirigidos hacia atrás. Los últimos segmentos de la pupa están envueltos con la cubierta o exuvia del cuarto estadio larvario con el que la ninfa se adhiere al sustrato. Las setas caudales de la larva se asemejan al ancla de un barco, siendo esta particularidad única entre los nematóceros.

Los insectos adultos (Figura 3) miden de 2-4 mm de longitud, son de color beige oscuro o marrón claro, y en ellos pueden observarse al microscopio abundantes sedas distribuidas por todo el cuerpo. Su aspecto es giboso porque tienen la cabeza de implantación inferior en el tórax. La cabeza presenta unos grandes ojos facetados negruzcos, largas antenas y probóscide desarrollada como aparato picador-chupador. Las patas son largas en relación al cuerpo y frágiles; las alas lanceoladas y lo más característico es que cuando están posados o picando, dejan las alas levantadas en forma de "V".



Figura 3. Hembra de *Ph. papatasi* alimentándose. (Wilson R., 2009).

Los machos se distinguen a simple vista porque presentan el extremo posterior del abdomen engrosado, ya que poseen unos apéndices articulados que forman la genitalia externa (Figura 4), que destacan mucho y permite diferenciarlos fácilmente de las hembras, que tienen el extremo del abdomen más afinado.

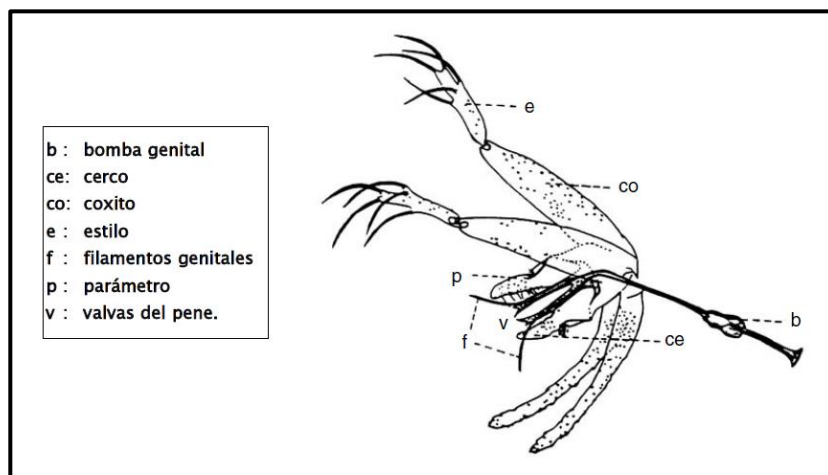


Figura 4. Genitalia del macho de *Phlebotomus perniciosus* (Légers y cols.).

La actividad de los flebotomos es principalmente crepuscular y nocturna, pudiendo prolongarse hasta el amanecer. Su vuelo es silencioso, en zig-zag y a poca altura del suelo; además, los días de lluvia o viento no vuelan. Cuando llegan a un obstáculo -una pared por ejemplo- se desplazan dando pequeños saltos y así pueden ascender hasta pisos superiores o la parte alta de los árboles.

Tanto los machos como las hembras se alimentan de azúcares de origen vegetal, que les proporcionan la energía necesaria para estar activos; pero además, las hembras deben alimentarse de sangre de vertebrados para que llevar a cabo la maduración de los huevos y su posterior puesta. No obstante, en algunas especies como *Phlebotomus mascitti* o *Phlebotomus papatasi*, no es obligatoria siempre la toma de sangre, y pueden realizar una puesta de huevos, normalmente en menor cantidad, sin ingerirla.

En condiciones naturales, la ovoposición –mediada por feromonas- tiene lugar en zonas con determinadas condiciones de oscuridad, temperatura, materia orgánica y humedad necesaria, para que se alimenten las larvas al eclosionar; como pueden ser madrigueras, gallineros, bajo piedras, hendiduras de construcciones, establos, vertederos, huecos de árboles leñosos, etc. El ciclo nunca se lleva a cabo en medios acuáticos, aunque se requiere de una humedad muy alta –cercana a la saturación- para su desarrollo. El desarrollo óptimo de los flebotomos requiere temperaturas comprendidas en el rango entre 17 y 30°C. Temperaturas por encima de 40°C destruyen los huevos y las larvas, y temperaturas por debajo de 10°C retrasan su desarrollo,

llegándolos a matar si bajan de cero grados. Estas limitaciones climatológicas hacen que su periodo de actividad anual, e incluso diaria, esté muy condicionado, lo cual determina igualmente la aparición de la Leishmaniasis, el periodo de riesgo y la extensión de la misma.

En cada puesta se depositan hasta 60 huevos, normalmente diseminados por varios sitios, de los que eclosiona la larva 1. Los estadios larvarios se alimentan de la materia orgánica que les rodea y posteriormente pasan a pupa y por último a adultos. En la Tabla 2 se observa el tiempo necesario para la evolución de algunas especies de flebotomos, en función de la temperatura.

	Colas-Belcour, 1928	Theodor, 1934	Travit, 1940 (citado por Dolmatova, 1971)	Nájera 1950	Molina, 1989
ESPECIE	<i>Ph. minuta</i>	<i>Ph. papatasi</i>	<i>Ph. papatasi</i>	<i>Ph. ariasi</i>	<i>Ph. perniciosus</i>
Tª DE MANTENIMIENTO	28 °C	22-26 °C	30 °C	28 °C	28 °C
PERIODO DE PREOVOPOSICIÓN (ingestión de sangre- puesta)	4	11	-	8-12	4-6
INCUBACIÓN DEL HUEVO	5	12	6-8	2-3	4-6
DESARROLLO LARVARIO	16	41	17-21	12-14	14-23
DESARROLLO PUPAL	6	4	7-8	2-4	7-11
DESARROLLO GONOTRÓFICO					
Desde la ingestión de sangre	31	68	-	24-35	35-42
Desde la puesta de huevos	27	57	30-37	16-23	31-36

Tabla 2. Tiempo necesario (días) para el desarrollo de los diferentes estadios evolutivos de los flebotomos.

1.2.1. Control de los flebotomos

Como ya se ha comentado, los flebotomos son vectores de *Leishmania*; pero además, pueden vehiculizar Bartoneliosis y algunos virus de la familia Bunyaviridae, como la Fiebre del Valle del Rift. Por ello, su control es especialmente importante y a la vez difícil, puesto que en muchas ocasiones transmiten enfermedades que presentan reservorios.

En la Leishmaniasis, el vector focaliza la enfermedad y la aparición de focos depende de la presencia y distribución geográfica de los vectores, como ya se ha comentado. Pero dentro del área de distribución de éstos, la enfermedad vendrá también condicionada por la climatología; en concreto por las temperaturas y la pluviometría, que afectan al periodo de actividad de los vectores. Lo que explica la frecuente variación que hay entre años en la prevalencia de la enfermedad dentro de la misma zona.

Es un insecto que presenta muchos problemas para un control efectivo de sus poblaciones, debido principalmente a las tan distintas costumbres y hábitats que presentan larvas y adultos. La lucha frente a sus larvas resulta prácticamente imposible por lo diseminados que se encuentran sus lugares de cría. En cuanto a los adultos, al ser insectos que vuelan y se desplazan a bastante distancia de sus lugares de cría las campañas de tratamiento tienen que abarcar grandes superficies, resultando muy costosas y poco prácticas. A pesar de ello, los tratamientos con insecticidas autorizados de la vegetación alrededor de lugares habitados, las paredes de las casas o incluso del interior de alguna dependencia puede disminuir el número de los flebotomos.

Estos insectos son atraídos por los animales vertebrados -especialmente las hembras, que necesitan chupar sangre-, así que los sistemas de lucha en nuestro país están orientados sobre todo a actuaciones realizadas en el ambiente donde viven los animales de los que se alimentan. Los machos también acuden a donde se encuentran los animales, pero sólo para fecundar a las hembras antes, después o incluso durante el tiempo en que estas realizan la toma de sangre. Así, podemos actuar sobre el conjunto de la población.

En nuestro país, el control de la leishmaniasis radica en la protección de nuestros animales domésticos, concretamente los perros, que actúan como principal reservorio debido a la preferencia de los flebotomos por ellos. Debido a la baja prevalencia de la enfermedad en los humanos y las graves consecuencias sobre el perro, actualmente se ha creado una fuerte conciencia en la protección de nuestros animales. Para ello, se aplican pipetas pour-on, collares con deltametrina y otros métodos que actúan como repelentes de flebotomos, tanto para evitar que puedan transmitir la leishmaniosis como para impedir que ingieran sangre de un animal parasitado. El periodo de máximo riesgo es a partir del verano, cuando el flebotomo ya ha tenido tiempo de picar varias veces y el parásito, de multiplicarse. Por ello, conviene aplicar las medidas preventivas sobre el perro hasta que se acabe la actividad de los flebotomos, momento que depende de la climatología y de la región de España de que se trate.

Los perros que llevan collares insecticidas o son tratados con pipetas u otros productos repelentes son escasamente atacados por los flebotomos. En zonas de riesgo debería ser una práctica habitual proteger a los perros para evitar que sean picados y, de esa manera, infectados. Los perros con leishmaniosis, incluso en el periodo de tratamiento o después aunque estén clínicamente curados, deberían ser tratados con repelentes en la época de riesgo, bien sea para evitar una reinfección o simplemente para evitar que sean diseminadores

del parásito, ya que algunos animales pueden quedar como reservorios y ser infectivos para los flebotomos que les pican.

En otras zonas con una mayor incidencia de leishmaniasis visceral en humana, como suele ser el caso de los países en vías de desarrollo, el control es más complejo, sobre todo por la falta de medios.

En esos casos, una opción es actuar sobre el entorno. En cuanto a las paredes, se deberían tratar periódicamente con productos insecticidas del tipo de los piretroides o, mejor aún, con pinturas con insecticidas como, por ejemplo, las que cuentan con tecnología Inesfly y que van liberando de forma lenta pero paulatina los insecticidas durante más de un año. Para una mayor exposición a estos tratamientos, deberían ser lisas, para además evitar la presencia de huecos en los que los flebotomos realicen la puesta de huevos. Igualmente, un suelo de cemento u otro material que pueda limpiarse fácilmente evitaría el acúmulo de humedad y materia orgánica, que podrían favorecer la cría de los flebotomos y de las pulgas. El uso de telas mosquiteras no siempre protege frente a la entrada de flebotomos en las casas debido al pequeño tamaño de estos insectos. Para que sean efectivas, lo adecuado es rociarlas periódicamente con un insecticida de tipo piretroide sintético, que no es destruido por la luz directa y que puede incluso actuar como repelente.

También pueden resultar de ayuda algunas peculiaridades de la biología de estos insectos que están bien documentadas como, por ejemplo, que son atraídos por la luz. Colocar trampas de luz ultravioleta como atrayente, con electrocutores eléctricos o simplemente con papel adhesivo para capturarlos, podría ser eficaz a la hora de limitar las poblaciones de estos vectores. Por otro lado, es imprescindible la limpieza.

Se ha comentado ya que las larvas se alimentan de materia orgánica, por lo que debe evitarse la acumulación de basuras sobre todo orgánicas, incluidos los restos vegetales, donde pueden criar. También sería interesante controlar las ratas, puesto que sus madrigueras sirven de lugar de cría de los flebotomos y también pueden actuar como reservorio de *Leishmania* (se han encontrado ratas infectadas por el parásito).

Para la protección de humanos -principalmente niños- se recomienda el uso de ropa protectora, así como la aplicación de repelentes como Icaridína, IR3535, (etil-butil-acetilaminopropionato), Citriodiol y DEET (N,N-Dietil-meta-toluamida).

En Israel se ha encontrado que determinadas plantas como la buganvilla y el ricino pueden ser tóxicas para los flebotomos cuando se alimentan de su savia, y en algunas zonas endémicas están proponiendo su cultivo alrededor de los lugares habitados.

1.3. Árbol de Neem (*Azadirachta indica*)

Azadirachta indica, conocido comúnmente como Margosa y Paraíso de la India en español y como Neem en inglés e hindi, es un árbol de tamaño de mediano a grande, caracterizado por su tronco corto y recto, una corteza arrugada de color de marrón oscuro a gris y una copa densa y redondeada con hojas pinadas.



Figuras 5 y 6. Árbol de Neem (GreenerPro, 2009) y hojas del árbol de Neem (Treecanadablog, 2013).

Es un árbol de rápido crecimiento que puede alcanzar de 15 a 20 metros de altura. La corteza es dura, agrietada y desde color gris claro hasta castaño rojizo. La savia es blanca grisácea y el corazón del tronco es rojo; tornándose castaño rojizo cuando se expone al aire. Las raíces consisten de una robusta raíz principal y muy desarrolladas raíces laterales.

Es originaria del sur de Asia, donde crece en los bosques naturales de las regiones más secas del sur de la India y Myanmar; además, se planta y naturaliza extensamente en las áreas semiáridas de Asia y África. Durante muchos siglos, la Margosa se ha cultivado en la India, Paquistán, Sri Lanka, Bangladesh, Myanmar, Tailandia, el sur de Malasia y en las islas más secas de Indonesia, hacia el este de Java. Ha sido introducida en varias islas del Caribe, donde se cultiva principalmente para producir sombra, combustible y numerosos productos no madereros que se obtienen de las hojas, la fruta y la corteza. Entre estos se encuentran agentes medicinales e insecticidas. La Margosa es perennifolia, es decir, tiene hojas todo el

año, excepto en las áreas susceptibles a las heladas y las sequías, ya que en condiciones severas se deshoja.

La madera del Árbol de Neem se usa para la construcción general, muebles, carretas e implementos agrícolas, botes, tallado en madera y tambores. Se usa comúnmente en la India para la parte trasera de las alacenas y para el fondo de las gavetas como un repelente para las polillas. Es una especie popular para los planteles de sombra y de ornamento en las partes más secas de la India. Es uno de los árboles más apreciados en el sur de Asia, donde se le considera como sagrado por los hindúes debido a sus propiedades para prevenir enfermedades. La semilla, la corteza y las hojas, tienen compuestos con usos antisépticos, antivirales, anti-inflamatorios, anti-ulceras y anti-hongos.

Durante los últimos años, el árbol de Neem ha sido el objeto de intensos estudios como una fuente natural de pesticidas. De las hojas, las frutas, las semillas y la corteza se extraen azadiractina, salanina, meliantriol y varios triterpenoides relacionados (o liminoides), con acción pesticida comprobada contra una gran gama de plagas de insectos y nemátodos que afectan las cosechas de vegetales, granos y cítricos.

2. Justificación y objetivos

El objetivo de esta prueba es comprobar la eficacia insecticida de un preparado comercial de extractos del árbol de Neem (*Azadirachta indica*) frente a larvas de *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), como método de lucha frente a estos insectos, vectores de Leishmaniasis y de Arbovirus.

Ya se ha hablado de que los flebotomos son vectores de importantes enfermedades, destacando entre ellas la Leishmaniasis, y el control de los mismos no siempre resulta fácil. En muchos países con un menor desarrollo económico, en los que la Leishmaniasis resulta especialmente peligrosa, parece interesante pensar en la posibilidad de encontrar una opción económica, sencilla y, por qué no, natural de controlar estos vectores.

Azadirachta indica se emplea en algunos países como pesticida natural, habiéndose realizado estudios frente a insectos del Gº *Lutzomyia* con extractos del árbol de Neem, pero nunca frente al Gº *Phlebotomus*. Puesto a que ambos géneros pertenecen a la subfamilia Phlebotominae, y ya que se trata de insectos con muchas similitudes, se quiso comprobar la efectividad de este pesticida natural sobre los flebotomos.

Así pues, el hecho de encontrar un efecto nocivo sobre el desarrollo de los flebotomos al utilizar el extracto de *Azadirachta indica*, podría ser interesante, sobre todo en aquellos países en los que el árbol de Neem se encuentra de forma natural. Además, puesto que resulta inocuo para las personas, podría emplearse en zonas cultivables sin riesgo alguno, sumando así beneficios.

3. Metodología

La prueba se realizó con una colonia de flebotomos de la especie *Phlebotomus papatasi* (Tabla 2) establecida en los insectarios del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza desde 2013.

ESPECIE	<i>Ph. papatasi</i>	<i>Ph. perniciosus</i>
Tª DE MANTENIMIENTO	35°C	35°C
PERIODO DE PREOVOPOSICIÓN (ingesta de sangre-puesta)	1-2	1-3
INCUBACIÓN DEL HUEVO	3-4	4
DESARROLLO LARVARIO	10-12	12-14
DESARROLLO PUPAL	3-4	4
DESARROLLO GONOTRÓFICO		
Desde la ingestión de sangre	27-28	30
Desde la puesta de huevos	22-24	24

Tabla 2. Duración de los ciclos de *Ph. papatasi* y *Ph. perniciosus* en el laboratorio.

Los extractos del árbol de Neem (*Azadirachta indica*) tienen propiedades insecticidas y actúan como regulador del crecimiento de las larvas de los insectos (IGR) sin ser tóxico para mamíferos y aves. En esta prueba se empleó un compuesto de uso doméstico en jardinería que tiene como base el principio Azadiractin que es un extracto del árbol del Neem (*Azadirachta indica*). Este producto comercial tiene por nombre “Insecticida natural de NEEM” de Laboratorios Flower S.A., con una composición de Azadiractin 3,2% p/v (32g/l). Concentración emulsionable.

La prueba se realizó con las larvas, por ser la fase terrestre con menos movilidad y cuya alimentación es a base de materia orgánica presente en el ambiente. En el laboratorio reciben una alimentación en polvo compuesta por la mitad de peso de granulado comercial de conejo y la mitad de heces de conejo. Ésta mezcla se deja madurar en humedad y posteriormente se deja secar y se tritura en polvo fino.



Figura 7. Material utilizado.

Los ensayos se realizaron en botes de poliestireno (Figura 8), que tienen una capa de escayola en su parte inferior para mantener la humedad. Estos botes se conservaron en cámara húmeda con una humedad relativa del 90%. A su vez esta cámara húmeda estuvo colocada en una cámara climática de crecimiento a 29-30Cº con un fotoperiodo de 17 horas de luz versus 7 horas de oscuridad. Cada bote fue identificado según perteneciese al grupo 1, 2, 3 o al grupo control. El grupo 1 correspondía al tratamiento con dosis baja (1,6%), el 2 a dosis intermedia (3,2%) y el 3 a dosis elevada (6,4%).



Figura 8. Botes de poliestireno.

Las dosis se obtuvieron del siguiente modo. Se pesaron 6,5 gramos de sustrato, constituido por heces de conejo y pienso, para cada uno de los tres botes donde posteriormente fue tratado éste sustrato, y se rotularon como “dosis mínima 1,6%”, “dosis recomendada 3,2%” y “dosis máxima 6,4%” (Figura 9). Por otro lado, en tres tubos de ensayo se colocaron 10 ml de agua para realizar las diluciones y se les añadió en cada uno 0,16 ml; 0,32 ml y 0,64 ml del producto, que se encuentra a una concentración de 3,2% p/v (32 g/l). A continuación, se pipeteó 1 ml de cada dilución a cada uno de los botes correspondientes y se dejó la mezcla reposar durante 48 horas.



Figura 9. Botes con el sustrato tratado.

A los dos días, se prepararon 12 botes, 3 para cada una de las dosis y 3 más para el control; y en cada bote se depositaron 30 larvas y una cantidad aproximada de 1 gramo de la mezcla de sustrato y producto.

A partir de este momento, se observaron las larvas a diario, contabilizando las viables, la mortalidad y las malformaciones o anormalidades achacables al tratamiento. Se monitoreó la presencia de excrementos en el fondo del bote de bioensayo y de material oscuro en el digestivo de las larvas para asegurar que la mortalidad no ha sido inducida por inanición. Los bioensayos se prolongaron hasta que todas las larvas estaban muertas o hasta que las larvas de todos los botes llegaron a individuos adultos, o lo que ocurrió primero. La mortalidad de las larvas se evaluó mediante el monitoreo de su pupación y la emergencia de individuos adultos expuestos a heces de animales tratados y no tratados.

La eficacia de la Azadiractina se asocia a las tasas de mortalidad de las larvas mediante la ecuación Fórmula de Abbot corregida.

Fórmula de Abbott:

$$\text{Mortalidad corregida} = \frac{(\text{mortalidad en bote prueba [\%]} - \text{mortalidad en bote control [\%]}) \times 100}{(100\% - \text{mortalidad en bote control [\%]})}$$

Por ejemplo: Si la mortalidad en las botes prueba es del 50% en el tiempo de diagnóstico y la mortalidad en el control es del 10%, la mortalidad corregida es $[(50\% - 10\%) / (100\% - 10\%)] \times 100 = 44.4\%$

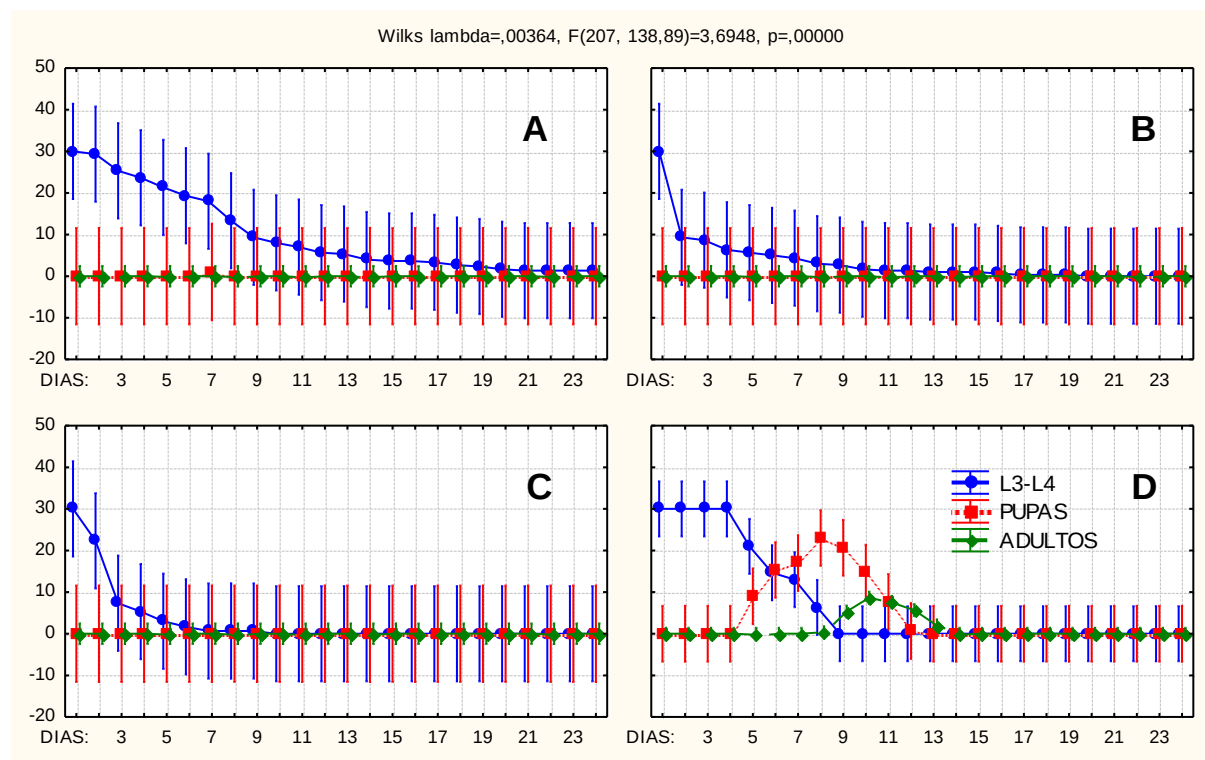
Nota: En casos del 100% de mortalidad en botes prueba, la fórmula de Abbot no tiene efecto. Por ejemplo: $[(100\% - 10\%) / (100\% - 10\%)] \times 100 = 100\%$ mortalidad corregida.

4. Resultados y discusión

Los resultados obtenidos confirman la eficacia de la Azdiractina, insecticida natural de árbol de “NEEM”, el cual presenta un efecto muy satisfactorio sobre las larvas de *Phlebotomus papatasi* -en condiciones de laboratorio-, provocándoles mortalidad y retrasos en el desarrollo normal del ciclo gonotrófico desde la fase de larvas L3-L4 a pupas y adultos.

La actividad insecticida del producto en las tres concentraciones testadas fue muy satisfactoria durante las 3 semanas y media (24 días) postratamiento que duro el estudio, con valores del 100% de Inhibición de la Emergencia (% IE) en las concentraciones D2 (3,2%) y D3 (6,4%), (Tabla 3).

Los valores de mortalidad en larvas variaron entre el 96% (dosis mínima) y el 100% (dosis recomendada y máxima). A la concentración de 1,6% (D1), el producto fue eficaz en cuanto a Inhibición de la Emergencia, aunque el tiempo de desarrollo de larvas a pupas se prolongó mucho más que en las demás dosis y el control, manteniéndose en el estadio L3-L4 durante mucho más tiempo.



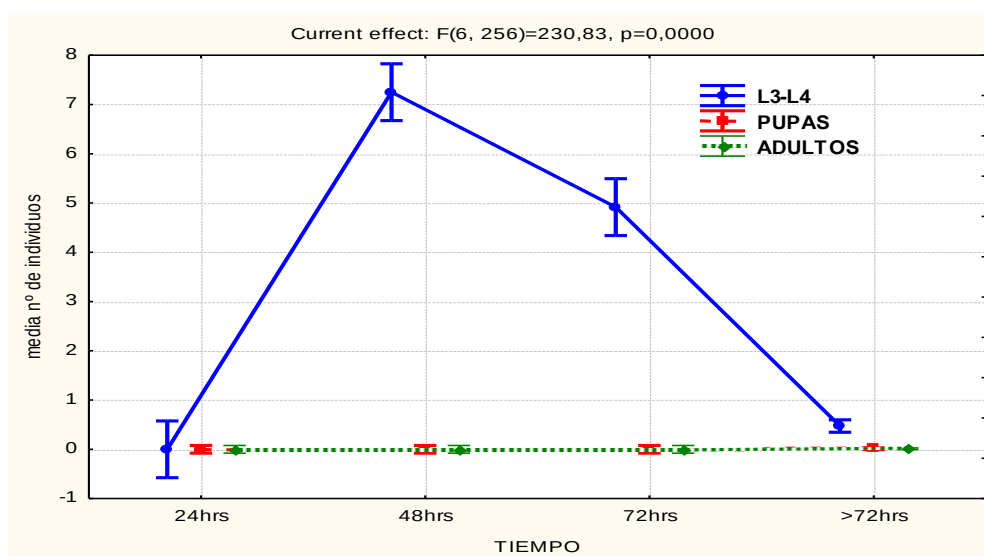
Gráfica 1.- Comparación en el tiempo de la supervivencia desde larvas L3-L4 a adultos en *Ph. papatasi*, en tres dosis distintas de Azadiractina. A=dosis mínima; B= dosis recomendada; C= dosis máxima; D= control.

En la Gráfica 1 se puede observar la comparación de los tiempos de supervivencia. En el grupo que corresponde al control (gráfica D), es decir, las larvas que no sufrieron tratamiento, el desarrollo observado fue normal, con aparición de pupas y adultos en los tiempos habituales.

La gráfica A (Gráfico 1) representa el resultado de la supervivencia de las larvas que fueron alimentadas con sustrato al 1,6% de Azadiractina, y se observa como la supervivencia se prolonga más que en las preparaciones tratadas con las dosis recomendada y máxima (B y C). En la gráfica B se observa como la supervivencia de las larvas tratadas con la dosis recomendada (3,2% de producto) se reduce desde muy pronto; incluso antes que en el caso C, en el que los insectos fueron alimentados con una mezcla al 6,4% (dosis máxima). Además, se refleja que en las tres concentraciones la emergencia de pupas y adultos fue nula.

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas entre las medias de los tratamientos con dosis recomendada y máxima ($F=3,28$; $P<0,05$) con un nivel de fiabilidad del 95%. Es decir, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre estas dosis. Este resultado sugiere que al aumentar la dosis, no aumenta la mortalidad de larvas en menos tiempo (que a la dosis recomendada), pero que tampoco se ve afectada negativamente la eficacia del producto. Asimismo, la disminución de porcentaje de dosis recomendada en este resultado permite aceptar la hipótesis de que el aumento de la concentración o la disminución realizada en este trabajo, con respecto a la densidad larval no aumentarían la sobrevivencia de pupas, por lo que no afectaría negativamente la eficacia del producto.

En la dosis recomendada el mayor porcentaje de mortalidad se observó a las 48 horas (gráfica 2) antes que a la dosis máxima, en la cual la mortalidad sucedió entre las 48 y 72 horas, y en adelante. Además, se refleja que la diferencia de mortalidad entre las tres dosis es significativa a las 48 y 72 horas. A las 48 horas, es la dosis recomendada (D2) la que provoca una mayor mortalidad (69%, frente al 25,55% de la dosis máxima); y a las 72 horas, la mortalidad de la dosis recomendada y máxima (D3) son prácticamente iguales, existiendo diferencia con respecto a la dosis baja (D1), que solamente ha matado al 15 % de las larvas.



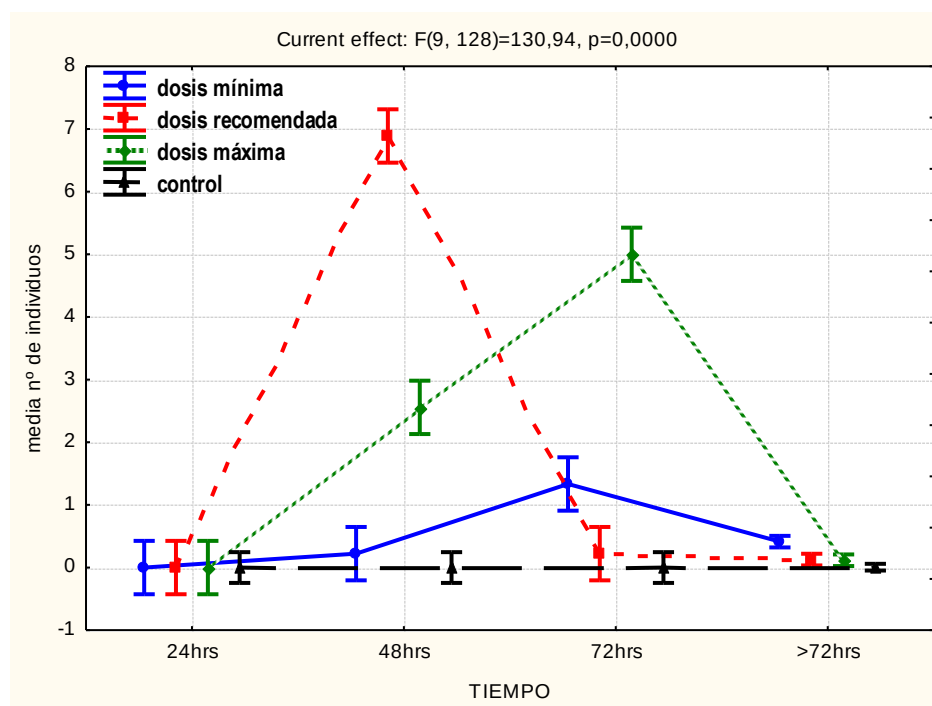
Gráfica 2. Relación de mortalidad fase larvaria-tiempo en la dosis recomendada.

F	Nº larvas iniciales L3-L4	mortalidad 24 horas L3-L4	%	mortalidad 48 horas L3-L4	%	mortalidad 72 horas L3-L4	%	mortalidad >72 horas L3-L4	%	Nº de pupas iniciales	Mortalidad pupas	%
D1	30	0 (± 0)	0 (± 0)	1 (± 1,15)	2,22(± 3,84)	5 (± 2,51)	15,55(± 8,38)	29 (± 2,30)	95,55 (± 7,69)	1 (± 0,57)	1 (± 0,57)	100 (± 0)
C	30	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0
D2	30	0 (± 0)	0 (± 0)	21 (± 3,05)	69 (± 10,18)	21,33 (± 2,30)	71,11 (± 7,69)	30 (± 0)	100 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
C	30	0	0	0	0	2	7		0	28	0	0
D3	30	0 (± 0)	0 (± 0)	8 (± 2,51)	25,55(± 8,38)	23 (± 2,51)	75,55 (± 8,38)	30 (± 0)	100 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)	0 (± 0)
C	30	0	0	0	0	0	0		0	30	0	0
p(IC)		NS		0,230009		0,103142		0,000126			0,422650	

Tabla 3. Porcentajes de mortalidad de larvas L3-L4 hasta adultos, posterior al tratamiento con azadiractina, desde las 24 has hasta >72 has, a las máximas y mínimas concentraciones recomendadas. Cada valor representa el promedio de tres repeticiones (± DS). Los valores de p(IC) 95% en la misma fila que difieren de color son significativamente distintos ($P \geq 0,05$). D1= (azadiractina 1,6 %); D2= (azadiractina 3,2 %); D1= (azadiractina 6,4 %); C= control.

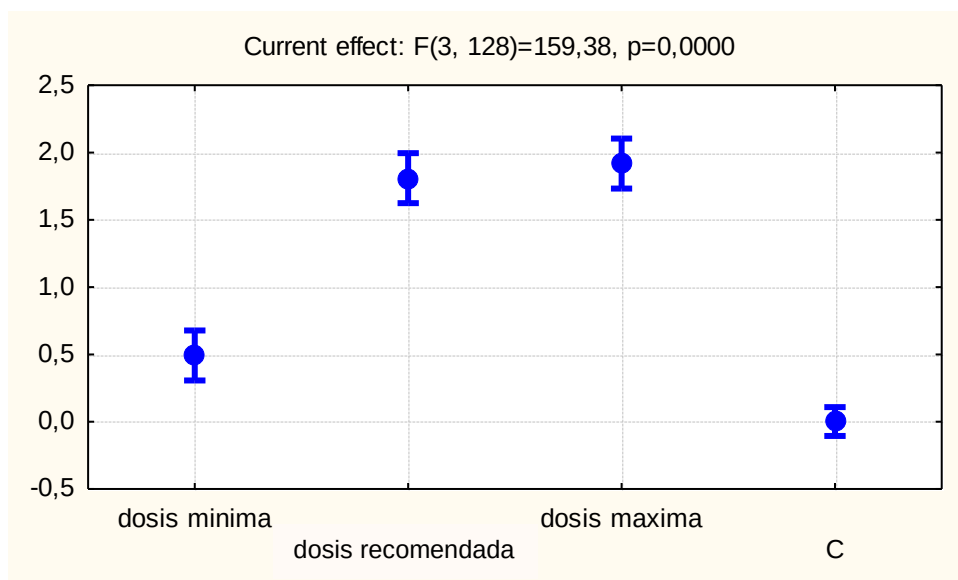
Como se observa en la Tabla 3, las tres dosis consiguen una mortalidad del 100% pasadas las 72 horas (solamente en una de las réplicas alcanzó el estado de pupa una larva y de ésta no emergió un adulto, por lo que no resulta significativo con respecto a las demás concentraciones). Las pruebas estadísticas de comparaciones entre las medias (porcentajes de mortalidad a las 24, 48, 72 y >72 horas) demostraron la presencia de diferencias significativas entre las mismas al nivel de significación del 5%. Según estas pruebas, la media de 69,0% (D2), fue significativamente mayor que la de 2,22% (D1) ($p < 0,05$) de mortalidad. Así mismo, entre las medias (95% dosis A y 100% dosis B y C) después de las 72 horas, no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,000126$ [$p > 0,05$]) con un nivel de significación del 5%. Esto significa que tras las 72 horas postratamiento en las tres concentraciones se obtuvo una mortalidad total de larvas -exceptuando la pupa encontrada en una réplica, que no llegó a la fase adulta- por lo que el resultado final no fue significativamente distinto entre las tres dosis pasadas las 72 horas (Tabla 3).

En la Gráfica 3 se puede observar que se logró obtener una actividad letal mucho más efectiva postratamiento en la dosis recomendada, con valores de mortalidad larvaria del 69%, frente al 25,55% de la dosis máxima respectivamente (Gráfica 3 y tabla 3). El análisis de varianza mostró la presencia de diferencias estadísticas significativas en las medias de los tratamientos con respecto al grupo control.



Gráfica 3. Efectividad de la dosis con respecto a la mortalidad.

En la Gráfica 4 se compara la letalidad de las 3 dosis, observándose que a nivel global no resulta significativa la diferencia entre las dosis recomendada y máxima. Es decir, pese a que la dosis recomendada mate a las larvas en un tiempo más corto, la dosis máxima sigue matando pasadas las 72 horas y el resultado final es el mismo (100% de letalidad). Así, la efectividad de ambas dosis resulta prácticamente idéntica, existiendo una notable diferencia con la de la dosis mínima.



Gráfica 4.- Comparación de la efectividad letal sobre las tres concentraciones de azadiractina y un grupo control.

También se observaron anomalías en cuanto al color (melanización), incapacidad en la movilidad, dificultad de ingestión del sustrato tratado: parámetros que se observan en la fase más tardía de desarrollo larval.

En conclusión, la formulaciones probadas y aplicadas tienen una actividad letal sobre larvas de *Ph. papatasi*. Es de esperar que la persistencia de estas concentraciones sea aún menor en dosis todavía más bajas a la estudiada en este trabajo; sin embargo habría que plantearse la posibilidad de comparar los efectos que se pudieran observar, como si existiría mayor número de pupas viables y su posterior desarrollo adulto, en los cuales podría tener influencia en la reproducción, ovogénesis, puesta de huevos y desarrollo larvario normal. También se tendrá que tomar en cuenta la realización de ensayos a nivel de condiciones de campo, debido a la influencia de variables climáticas adversas y mayor densidad por m² de dosis del producto.



Figuras 10 y 11. Corresponden a larvas de *Ph. papatasi* en estadio L3-L4 normales. Se puede observar contenido de ingestión del alimento (sustrato) en su aparato digestivo; así como la apariencia de las setas intersegmentales, los pelos caudales y pseudópodos normales.



Figuras 12 y 13. Comparación de las larvas del grupo control con las tratadas con la dosis mínima recomendada (1,6%). Se puede observar una melanización de toda la zona protoplasmática. En ambos casos se observa una gran degradación de las larvas tratadas.



Figuras 14 y 15. Comparación de larvas tratadas con la dosis recomendada (A) y máxima (B). En el primer caso, la larva tratada ha alcanzado el estadio de final de L4. En el segundo caso, se observa melanización de la larva tratada.

5. Conclusiones

Aunque los IGRs e insecticidas son ampliamente utilizados para el control de vectores de enfermedades en condiciones de campo, se sabe poco sobre su efecto del ciclo de desarrollo de estos insectos, sobre todo en las primeras etapas de desarrollo de esta especie. El estudio presentado muestra que la exposición a la azadiractina, ejerce efectos distantes, reflejados por alteraciones en el curso de la maduración normal de las larvas. En consecuencia, el número de larvas viables va disminuyendo incluso a dosis muy bajas. El aumento de la concentración del agente activo no aumentó el porcentaje de mortalidad en menor tiempo, independientemente de la temperatura constante a la que fueron sometidos los sustratos tratados, ya que se sabe que una temperatura mucho mayor podría resultar en una inactivación del insecticida, alterando las sustancias químicas aplicada y reduciendo la eficacia de la mortalidad larvaria.

Así, se produjo una mortalidad del 98-100% de las larvas en función de la dosis. Solamente se formó una pupa en el lote tratado con la dosis mínima, pero tampoco evolucionó. Por lo tanto, la efectividad del producto en cuanto letalidad total es del 100%, ya que no emergió ningún adulto con las tres dosis empleadas.

Comprobada la efectividad de este producto a nivel de laboratorio, podría ser interesante estudiar su efecto a nivel de campo, tanto con las dosis estudiadas como con otras incluso más bajas.

El principal interés de comprobar la efectividad del insecticida natural de árbol de “NEEM” radica en su posible uso en el control de flebotomos, importantes vectores de graves enfermedades, como ya se ha comentado. En la India, de donde es originario el árbol de Neem, los flebotomos (*Ph. argentipes*) crían en zonas ganaderas, siendo complejo su control. Además, transmiten el parásito *Leishmania donovani*, que causa la enfermedad de Kala-Azar, por lo que encontrar un método barato y sencillo de control de su vector supondría una gran ayuda. Una de las ventajas del preparado empleado en nuestro experimento es su fácil uso, ya que podría diluirse y esparcirse posteriormente sobre el estiércol, para frenar el desarrollo larvario y así controlar la población de adultos.

Conclusions

Although IGRs and insecticides are widely used to control disease vectors in field conditions, little is known about the effect of the development cycle of these insects, especially in the early stages of development of this species. The study presented shows that exposure to azadirachtin, exerts distant effects, reflected by alterations in the course of normal maturation

of larvae. Consequently, the number of viable larvae decreases even at very low doses. Increasing the concentration of active agent did not increase the mortality rate in less time, regardless of the constant temperature at which underwent treated substrates because it is known that a much higher temperature may result in inactivation of the insecticide by altering applied chemicals and reducing the effectiveness of larval mortality.

Thus, there was 98-100% mortality of larvae in a dose dependent. Only a pupa is formed in the group treated with the lowest dose, but also did not evolved. Therefore, the effectiveness of the product as total lethality is 100% because it did not emerge any adult with three doses used.

Proven the effectiveness of this product in the laboratory, it could be interesting to study its effect at the field level, with both doses studied as other even lower.

The main interest of testing the effectiveness of the natural insecticide tree "NEEM" is its possible use in the control of sandflies, important vectors of serious diseases, as already mentioned. In India, where it originated Neem tree, sandflies (*Ph. Argentipes*) reared in pastoral areas, with complex control. Also they transmit the parasite *Leishmania donovani*, which causes Kala-Azar disease, so finding a cheap and easy way to control the vector would be a great help. An advantage of the preparation used in our experiment is its ease of use, as it could be diluted and spread manure later on, to stop larval development and thus control the adult population.

6. Valoración personal y agradecimientos

La realización de éste trabajo me ha permitido conocer el trabajo real en un laboratorio e iniciarme en el campo de la investigación aplicada. Además, resulta grato ver que los resultados son satisfactorios y que podría llegar a ser interesante el uso del producto probado, en el control de estos vectores tan importantes, los flebotomos.

Para terminar con éste proyecto debo agradecer la ayuda incondicional de Vladimir Oropeza, sin la cual este trabajo no habría sido posible; y a mi tutor, Javier Lucientes, por sus imprescindibles aportaciones y la orientación brindada, así como por dedicarme tanto tiempo, sacándolo de donde no lo había.

7. Bibliografía consultada

- Alvar J.P. (2001). *Las leishmaniasis: de la biología al control*. Laboratorios Intervet S.A., Salamanca.
- Amóra S., Bevilaqua C., Feijó F., Alves N. y Maciel M. (2009). *Control of Phlebotomine (Diptera: Psychodidae) Leishmaniasis Vectors*. Neotropical Entomology 38(3):303-310.
- Andrade-Coelho C.A., Araujo N., Silva V.C., Souza A.A., Salabert M. y Ferreira E. (2014). *Effects of Azadirachtin on the Biology of Lutzomyia longipalpis (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Adult Female, the Main Vector of American Visceral Leishmaniasis*. J. Med. Entomol. 51(4): 891-895.
- Andrade-Coelho C.A., Souza N.A., Feder M.D., Da Silva C.E., Garcia E.S., Azambuja P., Gonzalez M.S. y Rangel E.F. (2006). *Effects of Azadirachtin on the Development and Mortality of Lutzomyia longipalpis Larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae)*. J. Med. Entomol. 43(2): 262-266.
- Andrade-Coelho C.A., Souza N.A., Gouveia C., Silva V.C., Gonzalez M.S. y Rangel E.F. (2009). *Effect of Fruit and Leaves of Meliaceae Plants (Azadirachta indica and Melia azedarach) on the Development of Lutzomyia longipalpis Larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) Under Experimental Conditions*. J. Med. Entomol. 46(5): 1125-1130.
- Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias sanitarias (CCAES), (Octubre de 2012). *Evaluación del riesgo de transmisión de Leishmania infantum en España*. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, Madrid.
- Chelbi I. y Zhioua E. (2007). *Biology of Phlebotomus papatasi (Diptera: Psychodidae) in the Laboratory*. J. Med. Entomol. 44(4): 597-600.
- Contreras M.A. (2013). *Lutzomyia spp. (Diptera: Psychodidae) en zonas cafeteras de la región andina colombiana: taxonomía e importancia médica*. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Encinas J., Fernández F.J., Lasheras M.D., Barbas F.J. *Leishmaniosis canina y humana: una visión de conjunto*. Revista Profesión Veterinaria: 28-33.
- Gama A., Elias J., Ribero A.J., Alegria N., Schalling H., Silva F., Santarém N., Cardoso L. y Cotovio M. (2014). *Cutaneous leishmaniosis in a horse from northern Portugal*. Veterinary Parasitology 200: 189-192.

Haniff S. (2011). *Lutzomyia, simulum y culicoides* [en línea]. Israel: Medicina at IPG hospital. [Consulta: 19-05-2015]. Disponible en: <http://es.slideshare.net/shanazhaniff/lutzomyia-simulum-y-culicoides>

Harwood R.F. y James M.T. (1987). *Entomología Médica y Veterinaria*. México: Editorial Limusa.

Hasker E., Singh S.P., Malaviya P., Picado A., Gidwani K., Singh R.P., Menten J., Boelaert M. y Sundar S. (2012). *Visceral Leishmaniasis in Rural Bihar, India*. Emerging Infectious Diseases, Vol. 18, Nº 10.

Healthy people. *Árbol de Neem* [en línea]. [Consulta 21-05-2015]. Disponible en: <http://www.arboldeneem.com/>

Hiepe T., Lucius R. y Gottstein B. (2011). *Parasitología general, con principios de inmunología, diagnóstico y lucha antiparasitaria*. Zaragoza: Editorial ACRIBIA, S.A.

Jiménez M., González E., Martín-Martín I., Hernández S., Molina R. (2014). *Could wild rabbits (Oryctolagus cuniculus) be reservoirs for Leishmania infantum in the focus of Madrid, Spain?* Veterinary Parasitology 202: 296-300.

Kesari S., Bhunia G.S., Chatterjee N., Kumar V., Mandal R., Das P. (2013). *Appraisal of Phlebotomus argentipes habitat suitability using a remotely sensed index in the kala-azar endemic focus of Bihar, India*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 108(2): 197-204.

Lucientes J. y Castillo J.A. (2013). *Algunas reflexiones para mejorar la lucha frente a los flebotomos* [en línea]. Zaragoza, España. [Consulta: 02-06-2015]. Disponible en: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia/8741/articulos-archivo/algunas-reflexiones-para-mejorar-la-lucha-frente-a-los-flebotomos.html>

Lucientes J., Castillo J.A., Gracia M.J., Peribáñez M.A. (2005). *Flebotomos, de la biología al control*. Revista Electrónica de Veterinaria REDVET. Vol. VI, nº8: 1-8.

Maia C., Ramos C., Coimbra M., Bastos F., Martins Â, Pinto P., Nunes M., Vieira M.L., Cardoso L. y Campino L. (2014). *Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal*. Maia et al. Parasites & Vectors, 7:115.

Molina, R., et al., *The hare (Lepus granatensis) as potential sylvatic reservoir of Leishmania infantum in Spain*. Vet. Parasitol. (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.05.006>

Moreno I., Álvarez J., García N., de la Fuente S., Martínez I., Marino E., Toraño A., Goyache J., Vilas F., Domínguez L., Domínguez M. (2014). *Detection of anti-Leishmania infantum antibodies in sylvatic lagomorphs from an epidemic area of Madrid using the indirect immunofluorescence antibody test*. Veterinary Parasitology 199: 264-267.

Parrotta J.A. y Chaturvedi A.N. (1994). *Azadirachta indica* A. Juss., *Margosa*, *neem* [en línea]. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station.

Ready P.D. (2013). *Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents*. Annu. Rev. Entomol. 58:227-50.

Sandoval C.M., Angulo V.M., Gutiérrez R., Muñoz G., Ferro C. (1998). *Especies de Lutzomyia (Diptera: Psychodidae) posibles vectores de leishmaniasis en la ciudad de Bucaramanga, Santander, Colombia*. Colombia. Biomédica, 18(2): 161-168

Sanmartín Durán M.L. (1992). *Avances en Parasitología Protozoaria*. Universidad de Santiago de Compostela: Servicio de Publicación e Intercambio Científico.

Schmidt G.D. y Roberts L.S. (1989). *Foundations of Parasitology*. 4ª Edición. St. Louis, Missouri: Times Mirror/Mosby College Publishing.