

## **Efecto del extracto de hojas de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) en la Diabetes Mellitus inducida por Estreptozotocina en ratones**

Effect of the extract of leaves of Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) in the Diabetes Mellitus with Streptozotocin in mice

**<sup>1</sup>González MS, <sup>1</sup>Márquez AA, <sup>1</sup>Meléndez CE y <sup>1</sup>López-Ortega AA**

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales "Dr. Haity Moussatché" (UNIHM), Decanato Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Email: mariasol@ucla.edu.ve

### **RESUMEN**

Entre las plantas más importantes con alto contenido de principios activos que se emplean como agentes terapéuticos para la cura efectiva de diferentes enfermedades, se encuentra el árbol Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). En el presente estudio se determinó el efecto del extracto de hojas de Nim sobre la Diabetes Mellitus inducida por estreptozotocina. Se utilizaron ratones hembras adultas de la cepa NMRI, colocadas en las condiciones del bioterio de 10 animales/jaula. Las hembras fueron asignadas aleatoriamente a tres grupos: uno Control (no se le suministró extracto de Nim) y dos Experimentales con un suministro de extracto acuoso de hojas de Nim, al 10% y 20%, respectivamente. A todos los animales se les indujo diabetes mediante inyección i.p. de estreptozotocina (40 mg/Kg de peso corporal durante 5 días). A los 0, 15 y 30 días postratamiento se determinó a todos los animales glucosa plasmática mediante kit comercial Wiener Lab. Además, se realizó control semanal de glucosa, cuerpos cetónicos y pH en orina mediante cintas reactivas de Combur test. Los resultados indicaron que la administración oral del extracto acuoso de Nim a una concentración del 10% mostró que pudo revertir el proceso diabetogénico porque la glicemia tanto a los 15 y 30 días postratamiento, fue semejante al valor obtenido en el día 0, el peso corporal inicial se mantuvo a los 15 días de experimentación para aumentar a los 30 días. Además, la ingesta de agua y de alimento tendió a disminuir como así mismo en la orina la glucosa y cuerpos cetónicos fueron negativos.

Palabras Clave: Nim (*Azadirachta indica*), Diabetes Mellitus, ratón.

### **ABSTRACT**

Among the most important plants with high content of active substances used as therapeutic agents for effective cure of different diseases, is the Nim tree (*Azadirachta indica* A. Juss). In the present study, the effect of Neem leaf extract on streptozotocin-induced diabetes mellitus, was determined. Were used adult female mice of strain NMRI, placed in the animal laboratory conditions of 10 animals / cage. Females were randomly assigned to three groups: a control (not supplied him with Neem extract) and two experimental with a supply of aqueous extract of Neem leaves, 10% and 20% respectively. All animals were diabetes-induced by ip injection of streptozotocin (40 mg / kg body weight for 5 days). At 0, 15 and 30 days after treatment was determined for all animals plasma glucose using commercial kit Wiener Lab also performed weekly monitoring of glucose, ketones bodies and pH in urine using strips Combur test. The results indicated that oral administration of aqueous extract of Neem at a concentration of 10% was able to reverse the diabetogenic process because glucose both 15 and 30 days after treatment, was similar to the value obtained on day 0, the initial body weight was maintained at 15 days of experimentation to increase at 30 days. In addition, water and food intake tended to decrease and in the urine glucose and ketone bodies were negatives.

Palabras Clave: Nim (*Azadirachta indica*), Diabetes Mellitus, mice.

## INTRODUCCIÓN

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto del extracto acuoso de hojas del árbol Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) en la Diabetes Mellitus (DM) inducida por estreptozotocina (STZ) en ratones NMRI hembras adultas.

### Aspectos metabólicos de la Diabetes Mellitus:

La DM es un conjunto heterogéneo de alteraciones metabólicas caracterizadas por intolerancia a la glucosa e hiperglicemia crónica. Así, la DM tipo 1 es un desorden autoinmune en el cual hay destrucción de las células del páncreas con caída de la producción endógena de insulina; la susceptibilidad a este tipo de DM está influenciada por factores tanto genéticos como ambientales [1]. Por su parte, son rasgos distintivos de la DM tipo 2: la resistencia a la insulina, la disfunción y el deterioro de las células  $\beta$  [2].

En un animal, la hiperglicemia puede indicar que existen alteraciones de los procesos metabólicos mediados por la acción de la insulina, como por ejemplo, en la captación de glucosa a nivel muscular o hepático, y en la gluconeogénesis en el hígado [3]. En el diabético descompensado, los ácidos grasos libres, los triglicéridos y generalmente el colesterol se encuentran elevados en el plasma. La mayor concentración de ácidos grasos libres es consecuencia de un mayor flujo de estos desde los depósitos adiposos hacia el hígado y otros tejidos [4].

La insulina estimula el almacenamiento de los triacilgliceroles al inactivar la triacilglicerol lipasa, que es la enzima encargada de hidrolizar los enlaces éster de las moléculas de grasa en el adipocito [5].

Un aumento de la lipólisis ocasiona la pérdida de la influencia inhibidora normal de la insulina sobre una lipasa hormonosensible que se encuentra en el tejido adiposo. Además la disminución de la utilización de la glucosa da como resultado una menor disponibilidad del glicerol-3-fosfato para la reesterificación de los ácidos grasos en el adipocito [5].

### Inducción experimental de la Diabetes Mellitus:

La estreptozotocina es un antibiótico de amplio espectro que presenta propiedad antitumoral, oncogénica y diabetogénica [6]. Esta última se caracteriza por inducción de insulinosis que lleva a destrucción de las células beta del páncreas [7]. Es ampliamente usada como un método de inducción de diabetes experimental en animales [8, 9]. En ratas adultas hembras Sprague-Dawley administradas por vía intraperitoneal en una dosis de 40 mg de STZ por

Kg de peso corporal, durante cinco días consecutivos, ha permitido evaluar algunos parámetros fisiológicos y bioquímicos que se producen en la diabetes tipo I [10]. Así mismo, para la determinación de la actividad de la lipasa hepática, se ha administrado STZ en dosis de 65 mg/Kg en ratas machos de la cepa Wistar [11].

### Propiedades del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss):

Es tradicional en los países asiáticos el uso medicinal del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) y en los lugares donde el árbol ha sido introducido, como en América Tropical y África. A su utilidad e importancia, se debe añadir el aspecto económico ya que es un cultivo de fácil manejo agronómico, de rápido crecimiento, fácil de adquirir, de bajo costo, lo cual permite obtener productos naturales de menor precio que los químicos que son aplicados tradicionalmente para combatir enfermedades y plagas que atacan al hombre, animales y vegetales y por su origen biológico, no ocasiona efectos nocivos al agroecosistema [12]. En el territorio norte de Australia se ha reportado el cultivo del Nim y se ha detallado las características de esta especie, tales como aspectos botánicos, ecológicos y de los productos que se pueden elaborar de la planta [12].

El 90% de la población de muchos países africanos actualmente confía exclusivamente en las plantas como la fuente para obtener medicinas, por lo que en el año 2000 la Organización Mundial de la Salud en la carta de Ginebra, recomendó la investigación en el área de la medicina obtenida de las plantas, particularmente en enfermedades crónicas tales como la DM [13, 14].

En Trinidad y Tobago durante varios años, se han realizado estudios sobre las plantas medicinales, entre las cuales se encuentra el Nim, usadas en el tratamiento de diferentes enfermedades en perros. Una de las investigaciones se realizó desde el año 1995 al 1998 mediante entrevistas a un grupo de 86 profesionales relacionados con la salud animal canina (criadores, veterinarios, extensionistas y técnicos) además de 28 practicantes de la etnoveterinaria. En la etapa final se organizó 4 reuniones de trabajo con 55 de los entrevistados, para discutir los datos etnoveterinarios obtenidos, entre los cuales el Nim junto con otras especies vegetales se les ubicó entre los antihelmínticos [15].

Para evaluar en el Nim su posible efecto anticancerígeno, Tepsuwa et al. [16] realizaron un estudio en el que se administró durante tres semanas flores de Nim en la dieta de ratas hembras de la cepa Sprague Dawley, distribuidas antes, durante y después de ser inducido el cáncer mamario; la dieta de flores

de Nim, disminuyó la actividad de algunas monooxigenasas dependientes del P-450, lo que demostró tener el efecto de prevenir el cáncer mamario en ratas, de igual forma al administrar la dieta a los animales con previa inducción de cáncer, los efectos fueron una reducción en la multiplicación y formación de tumores tanto benignos como malignos en la glándula mamaria y a nivel hepático, en el orden de 44,0 y 88,9%, respectivamente.

Entre los efectos terapéuticos del Nim, ha sido establecido su acción contra la Malaria ya que inhibe in vitro al citocromo P-450 del *Plasmodium falciparum* responsable de esta enfermedad [17].

El efecto del extracto de hojas frescas de Nim en dosis de 500 mg/Kg, sobre el daño hepático causado por el Paracetamol (2 g/Kg) en ratas, fue establecido por Bhanwra et al., con base a los niveles sanguíneos de aspartato aminotransferasa y gamma glutamil transpeptidasa, los cuales se mostraron significativamente disminuídos paralelamente a la reducción de la necrosis hepática inducida por el Paracetamol [18].

En la Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales Dr. Haity Moussatché (UNIHM) del Decanato de Ciencias Veterinarias, UCLA, se ha estudiado el efecto del extracto acuoso de hojas frescas de Nim, sobre la úlcera gástrica inducida por estrés por inmovilización a 7°C, con un ayuno previo de 24 horas. Se obtuvo como resultado que el extracto crudo acuoso de las hojas de Nim revertió el daño gástrico ya que el tejido se mostró sano, lo que no se observó en los animales controles no recibieron el extracto presentaron un extenso daño de la mucosa gástrica inclusive con áreas perforadas, este efecto fue dependiente de la concentración del extracto y de la vía de administración [19].

Los extractos de Nim pueden reducir la actividad de la aldosa reductasa presente en las cataratas inducidas en ratas por la Diabetes Mellitus. La actividad inhibitoria del Nim sobre la aldosa reductasa fue mayor comparada con extractos obtenidos de otras plantas como la *Ocimum sanctus*, *Withania somnifera* y *Curcuma long* [20].

#### **Efecto hipoglicemiante del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss):**

En un estudio sobre la diabetes inducida en ratas, se evaluaron 30 plantas usadas en medicina en la India, entre las que se incluyó al Nim; los resultados obtenidos confirmaron su efecto hipoglicemiante tanto en extracto acuoso como en solvente orgánico. La combinación (1:1) del extracto acuoso preparado con polvo de raíz y de hojas de *A. Augusta* y de *A. indica*,

administrada por vía oral en dosis de 200 mg/Kg una vez al día por 8 semanas, a ratas diabéticas por aloxano, indujo una disminución significativa de la glucosa en sangre en ayunas, la prueba de tolerancia de glucosa [21]. El extracto acuoso también disminuye la formación de peróxidos de lípidos cuantificados por TBAR`S (sustancias reactivas con el ácido 2-tiobarbitúrico) [22].

En un estudio en ratones machos, el efecto del extracto acuoso de diez plantas, en el tratamiento de la DM, dio como resultado que tres de estas plantas, entre ellas el *Azadirachta indica* A. Juss, mostraron actividad hipoglicemiante, mediada posiblemente por su capacidad inhibitoria sobre el cortisol [23].

#### **Efecto antioxidante del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss):**

Estos últimos años, se han centrado los estudios en el papel del estrés oxidativo, entre otros factores, debido a que puede constituir el acontecimiento dominante y común en la patogenia de las complicaciones diabéticas [24].

Robertson et al. han indicado que la hiperglicemia residual, especialmente la posterior a la ingestión de alimentos, genera ROS (formas reactivas del oxígeno) que inducen EO en las células del páncreas. Esta aseveración está apoyada en sus observaciones de que: la exposición de islotes aislados, a altas concentraciones de glucosa, causa aumento del nivel intracelular de peróxidos que no puede ser neutralizado puesto que las células presentan intrínsecamente baja actividad de proteínas antioxidantes, lo cual las hace vulnerables a la acción de las ROS, así el tratamiento con antioxidantes protege a los modelos animales de DM (ratas Wistar diabéticas por STZ) contra el desarrollo completo de la hiperglicemia. Los autores postulan que el mecanismo molecular causante del efecto negativo de la glucosa sobre la funcionalidad de las células, se debe a la desaparición de dos promotores (PDX-1 and MafA) de la actividad insulínica, ya que han demostrado que la administración in vitro de antioxidantes, previene la desaparición de estos factores de transcripción con normalización de la expresión genética de la hormona [25].

Además, el tratamiento oral de ratas diabéticas por STZ con extractos (500 mg/kg de peso corporal) de *Allium sativum*, *Azadirachta indica*, *Momordica charantia*, y *Ocimum sanctum*, no solamente disminuye el nivel de glucosa sanguínea sino que también inhibe la formación de peróxidos lipídicos en la sangre y reactiva enzimas antioxidantes en los glóbulos rojos, con restauración de los niveles de glutatión reducido y de metales trazas [26].

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Población y Muestra:** Se utilizaron ratones hembras NMRI adultas con peso promedio de  $27,5 \pm 2,5$  g, provenientes del Bioterio Central de la UCL.A, de éstos se seleccionaron al azar 30 hembras que fueron colocadas de 10 animales por jaula, bajo ciclos de luz de 12 horas, en las condiciones estandarizadas del Bioterio de la UNIHM y con libre acceso al agua y a un alimento comercial para ratones Ratarina® (Protinal, Venezuela). Este alimento concentrado en pellets contiene: proteína cruda 26%, grasa cruda 2%, fibra cruda 6% y extracto libre de nitrógeno 40%. Las hembras fueron asignadas aleatoriamente a tres grupos: uno Control (no se le suministró extracto de Nim) y dos Experimentales con un suministro de extracto acuoso de hojas de Nim, al 10% y 20%, respectivamente.

**Preparación del extracto acuoso de Nim:** A 100 gramos de hojas frescas de Nim se agregó 100 ml de agua y se procesó en un extractor de jugo (Oster, modelo 3167-014, China). De este extracto concentrado de hojas de Nim se preparó dos diluciones acuosas p/v, una al 10% y otra al 20%, para ser suministradas diariamente a los animales, en el agua de bebida durante 30 días.

**Inducción de Diabetes Mellitus:** Se realizó mediante una inyección i.p. diaria de estreptozotocina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) disuelta en buffer citrato sódico 0,05 pH 4,5 M, en una dosis de 40 mg/Kg de peso corporal durante 5 días, de acuerdo a Like y Rossini [8]. El grupo experimental se dividió en dos subgrupos a los cuales se les suministró a través del agua de bebida durante 30 días, el extracto acuoso de hojas de Nim en concentraciones de 10 y 20%, respectivamente.

**Determinación de glucosa plasmática:** A todos los animales, sin someterlos a ayuno, se les extrajo por punción de la vena coccígea media, una muestra de sangre la cual se recolectó en tubo Eppendorf con anticoagulante (EDTA-Na4 al 2%). Se separó el plasma por centrifugación a 800 x g durante 20 min en una microcentrífuga refrigerada para tubos Eppendorf (Brinkman Instr. modelo 5402, Westbury, NY, USA). En el plasma se determinó la concentración de glucosa plasmática a los 0-15 y 30 días post tratamiento con extracto de Nim. La cuantificación se realizó mediante el sistema enzimático de la Glucosa oxidasa / Glucosa peroxidasa diseñado por Trinder [27] y evaluado por

Lott y Turner [28]. Se utilizó un kit comercial Wiener Lab (Rosario, Argentina).

Adicionalmente, se realizó seguimiento diario del peso corporal mediante una balanza para animales (Ohaus, Triple Beam serie 700, Florham Park, NJ, USA). También la cantidad de agua consumida se determinó diariamente y se calculó el promedio semanal por animal. El alimento consumido se determinó al final de cada semana. Estas mediciones realizadas en los diferentes grupos permitieron establecer una tendencia en el comportamiento diabético de los animales.

**Determinación de parámetros urinarios:** A partir del día 0 y hasta los 30 días se realizó la medición semanal en orina de pH, glucosa y cuerpos cetónicos mediante cintas reactivas Combur test (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania). Para obtener la muestra de orina se presionó suavemente la zona abdominal baja del ratón y la gota obtenida se vertió sobre la cinta reactiva.

**Análisis de los Datos:** El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó mediante el programa SPSS versión 17.0 para Windows. Se les aplicó una prueba descriptiva (media, desviación estándar, error tipo de las medias) y una de comparación de las medias (Prueba "t" de Student,  $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSION

**Peso Corporal:** A través del tiempo de experimentación, el peso corporal de los ratones sufrió cambios que se muestran en la Tabla I. Se puede observar que el grupo control (diabético sin administración de extracto acuoso de Nim) presentó una disminución significativa del peso, lo cual se mantuvo hasta los 30 días post-administración de STZ. Este resultado está de acuerdo con lo reportado por Mora et al. [29] quienes obtienen una baja del peso corporal en ratas Wistar con DM inducida por STZ (33 mg/Kg de peso) a los 20 días de haber iniciado la experimentación. Esta disminución se explicaría porque en la DM se suprime la disminuida utilización de carbohidratos, como fuente de energía, con degradación de proteínas con pérdida de masa muscular, a lo que hay que sumar la elevada diuresis del diabético, que también induce baja de peso.

**Tabla 1: Peso corporal (g) de ratones hembras con Diabetes Mellitus inducida por STZ con suministro de extracto acuoso de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss)**

Día	Grupo Control	Grupo Nim 10%	Grupo Nim 20%
0	30,9±4,3	27,8±2,6	27,5±2,2
15	24,4±3,5*	26,6±1,8	23,7±3,0
30	27,2±1,4	32,1±1,8*	26,6±4,1

Los valores representan la Media±DS de 10 animales en cada grupo. \*P<0,05 en relación al peso al día 0 del mismo grupo

Los grupos a los cuales se trató con extracto acuoso de Nim, presentaron un comportamiento diferente en cuanto a la evolución del peso corporal (Tabla I). Cuando el suministro fue al 10%, el peso inicial se mantuvo a los 15 días de experimentación para aumentar en forma significativa a los 30 días postratamiento. Pero cuando se suplementó con extracto acuoso de Nim al 20%, se observó una tendencia a la disminución de peso corporal hasta el término de la experiencia lo que indicó que el efecto protector del Nim a esta concentración no se manifestó.

El resultado alcanzado en el grupo con DM por STZ y administrado con extracto acuoso de Nim al 10% coincide con el reporte de Bhat et al. [30] en ratones Swiss con DM por STZ (una sola dosis i.p. de 3 mg / 25 g peso corporal) y tratados con extracto clorofórmico de Nim (100 ug/200 uL) reconstituido en agua destilada con 0,5% de DMSO e inyectado i.p. durante 21 días. El peso corporal, importante parámetro de la DM, aumentó gradualmente en los ratones diabéticos tratados con el extracto de *A. indica* mientras que los no tratados presentaron una continua pérdida de éste.

**Consumo de Agua de Bebida y de Alimento:** La ingestión ad libitum del agua de bebida fue diferente en los grupos experimentales con respecto al grupo control tal como se muestra en la Tabla II. Los ratones controles (diabéticos sin suministro de extracto acuoso de Nim) mostraron alta ingesta de líquido durante toda la experiencia, lo cual se corresponde con la polidipsia características de la DM.

El grupo con menor suministro de extracto acuoso de Nim (10%) presentó una tendencia a disminuir su ingesta de agua, que se hizo estadísticamente significativa (P<0,025) en la 3a semana experimental, para luego retornar a su nivel inicial. Los ratones tratados con 20% de Nim también disminuyeron

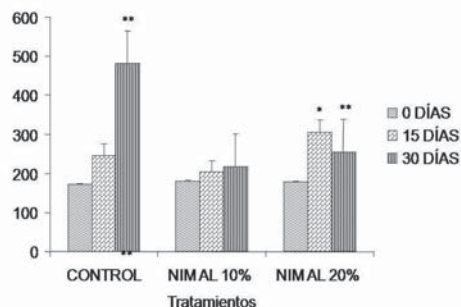
(P<0,025) su ingesta líquida durante la 3a semana.

**Tabla II: Consumo semanal promedio de agua de bebida (ml) y de alimento (g) en ratones hembras con Diabetes Mellitus inducida por STZ y administradas con extracto acuoso de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss).**

Semana	Grupo Control		Grupo Nim 10%		Grupo Nim 20%	
	Agua	Alimento	Agua	Alimento	Agua	Alimento
1*	5,1±1,8	24	4,9±1,8	17	5,4±2,6	27
2*	6,1±0,5	40	2,9±0,6	24	4,4±1,4	40
3*	6,2±1,1	40	2,1±1,3*	24	1,5±1,7*	33
4*	5,5±1,9	80	5,5±1,8	18	6,1±4,7	32

Los valores representan la Media±DS de 10 animales. \*P<0,05 en relación al valor de la 1ª semana del mismo grupo.

Los resultados indicaron que el grupo control mostró un paulatino aumento del consumo de alimento ingerido en la semana, lo que concuerda con la hiperglicemia mostrada por los ratones de este grupo, que no recibió suministro de extracto acuoso de Nim (Gráfico 1).



**Gráfico 1.- Concentración plasmática de Glucosa (mg/dl) en ratones hembras.** Cada uno de los valores representa la Media±DS de 10 animales. \*P<0,05 con respecto al valor control del mismo grupo. \*\*P<0,01 con respecto al valor control del mismo grupo.

El grupo experimental administrado con Nim al 20%, elevó en la 2a semana su ingesta de alimento, para retornar a su nivel menor en las dos últimas semanas. Este hallazgo estaría relacionado con la variación de la glicemia observada en este grupo. De igual forma, no hubo modificación del consumo de alimento en los ratones pertenecientes al grupo que se suministró extracto acuoso al 10% de Nim y que tal como se

muestra en el gráfico 1.

**Concentración Sanguínea de Glucosa:** En el Gráfico N° 1 se puede observar que el grupo control (diabético sin administración de Nim) la concentración sanguínea de glucosa sin ayuno, aumentó notablemente en relación al nivel observado al día 0, la diferencia fue altamente significativa ( $P < 0,005$ ) a los 30 días postratamiento con STZ. Estos resultados están de acuerdo con otros autores que han indicado que en ratas Wistar la administración de STZ en una sola dosis de 33 mg / Kg de peso corporal induce inicialmente una baja de la glucosa sanguínea en ayunas, la cual a los 5 días postratamiento alcanza niveles de 200 mg/dL, aumento altamente significativo en relación al valor control sin STZ (70mg/dL) y que se mantiene hasta el final de la experiencia (22 días). Con una dosis de 50 mg STZ / Kg de peso, los niveles sanguíneos de glucosa en ayunas llegan a 300 mg/dL que son mantenidos hasta el final de la observación [29].

En el grupo con administración de extracto acuoso al 10% de Nim, los niveles de glucosa sanguínea tanto a los 15 y 30 días postratamiento, no fueron estadísticamente diferentes del valor obtenido en el día 0. A diferencia del grupo con administración de extracto acuoso al 20% de Nim que presentó hiperglicemia estadísticamente significativa a los 15 días ( $P < 0,05$ ) y 30 días ( $P < 0,001$ ) postratamiento en relación al nivel de glucosa observado en el día cero de este grupo.

Estos resultados indicaron que el extracto acuoso al 10% de Nim suministrado por vía oral, mostró un efecto hipoglicemiante en animales con DM inducida por STZ en dosis de 40 mg/Kg de peso corporal durante 5 días. En relación a esto, Akinola et al. [31] han expresado que los medicamentos a base de plantas son terapias complementarias en el manejo de la diabetes mellitus. Estos autores estudiaron el efecto sobre la glucosa sanguínea y la histopatología de los islotes pancreáticos, del tratamiento crónico de ratas Wistar diabéticas por STZ (única inyección i.p. de 70 mg/kg peso corporal) con el extracto etanólico de hojas de *A. indica* (Nim) administrado por vía oral por 50 días. Todas las ratas con hiperglucemia en el grupo tratado con el Nim se habían convertido en normoglucémicas al final de la semana 2. Por 50 días, el número de células viables fue mayor en las ratas tratadas con Nim. Los resultados confirman el efecto hipoglicemiante del Nim y sugieren el potencial de esta especie vegetal en la mejora de las lesiones de los islotes pancreáticos en la DM.

En el presente estudio, una mayor concentración de Nim (20%) no indujo el efecto hipoglicemiante esperado, quizás a cierto grado de rechazo por parte

de los ratones debido posiblemente al sabor amargo de la solución. En un reporte anterior ha sido indicado que el efecto protector del extracto acuoso de Nim, en la mucosa gástrica a la úlcera inducida por estrés a baja temperatura, no se manifiesta a altas concentraciones del Nim [19].

**Medición en orina de Glucosa, Cuerpos Cetónicos y pH:** Al inicio del estudio los ratones de los tres grupos (control, Nim 10% y Nim 20%) presentaron en orina, glucosa y cuerpos cetónicos negativos. El pH promedio para el grupo control fue  $7,25 \pm 0,95$ , para el grupo Nim 10% fue  $7,40 \pm 0,55$  y para el grupo Nim 20% fue  $8 \pm 0,1$ . En el transcurso del tiempo experimental, el 60% de los ratones controles presentó glucosa y cuerpos cetónicos positivos en orina, cuyo pH se acidificó a  $5,80 \pm 0,45$ . Con respecto a los grupos administrados con extracto acuoso de Nim, también disminuyó el pH urinario a  $5,60 \pm 0,55$  (Nim 20%) y  $6,8 \pm 1,09$  (Nim 10%). Así mismo, este último grupo continuó con glucosa y cuerpos cetónicos negativos a diferencia del grupo Nim 20%, en el cual el 20% de los ratones presentó glucosa y cuerpos cetónicos positivos en orina. Mendoza et al. [32] han indicado que el análisis de orina de ratones NMRI hembras con DM inducida por STZ (en dosis de 40 mg/Kg de peso corporal durante 5 días) realizado el día 0 y luego semanalmente, para evidenciar presencia de glucosa, cuerpos cetónicos y valor de pH, con el uso de cintas reactivas Combur test, revela que a los quince días luego de la inducción de Diabetes Mellitus, todos estos parámetros variaron. El nivel de glucosa en orina en de 50 mg/dL, cuerpos cetónicos positivos (+) y el pH de su valor normal 6, baja a 5. Estos valores se mantienen hasta los 30 días postratamiento.

El mecanismo de acción de la STZ se inicia con su entrada a las células por la vía del transportador de glucosa (Glut2), lo que causa alquilación del ADN con activación de la ADP-polinucleosilación, proceso que es más importante para la acción diabetogénica de la STZ que el daño del ADN mismo porque provoca depleción celular de NAD<sup>+</sup> y ATP. Después del tratamiento con STZ hay aumento de la defosforilación del ATP lo que proporciona sustrato para la xantina oxidasa con formación de radicales superóxidos y consecuentemente de  $^{\circ}\text{OH}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Además, libera cantidades tóxicas de NO que inhibe la actividad de la aconitasa y participa en el daño al ADN. Todo este conjunto de acciones de la STZ da como resultado la destrucción de las células por necrosis [33]. Ante este devastador efecto de la STZ sobre las células productoras de insulina, que puede asemejarse a lo que sucede en la DM no inducida, cabe esperar que tanto el Nim como otras especies vegetales abran la

posibilidad de una nueva generación de medicamentos con efecto antidiabético particularmente sobre la protección y regeneración de los islotes, mas aún cuando actualmente se añade otra propiedad al extracto de Nim, la de ser neuroprotector. En un estudio realizado por Akinola et al. [34] se muestra que la diabetes mellitus no tratada se asocia con déficit prefrontal de los cuerpos de Nissl determinado por análisis morfológico y estrés oxidativo, cuantificado por los niveles de malondialdehído y de la glutatión peroxidasa, en ratas Wistar. La ausencia de estos déficits en las ratas tratadas con extracto de hojas de Nim amargo, sugiere un efecto neuroprotector del extracto, en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina. Esto puede mejorar la función cognitiva de la corteza prefrontal cuya falla se presenta en la diabetes mellitus.

### CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos permiten concluir que la Estreptozotocina indujo un estado diabetogénico en ratones hembras adultas de la cepa NMRI. La administración oral del extracto acuoso de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) a una concentración del 10%. mostró la capacidad de revertir el proceso diabetogénico. Este hallazgo es valioso tanto en medicina humana como veterinaria, puesto que permitiría el uso terapéutico del Nim como agente hipoglicemiante en la DM, además de su bajo costo.

Es necesario tener en cuenta lo que indican Thakur et al. [35] con respecto a que los extractos de plantas son de composición compleja y se deben hacer grandes esfuerzos dirigidos al aislamiento, identificación y purificación de los constituyentes bioactivos

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" y a FONACIT por el financiamiento para este estudio.

### BIBLIOGRAFIA

[1] Kantárová D, Buc M, Stuchlíková M, Moká? M, Vrlík M. Ethio-pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus in humans. A review. *Centr Eur J Immunol* 2006; 31 (3-4):102-110.

[2] Hayden M R. Islet amyloid and fibrosis in the cardiometabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J Cardiometab Syndr* 2007; 2(1):70-75.

[3] Feldman E, Nelson R. *Diabetes Mellitus. Endocrinología de perros y gatos.* McGraw-Hill

Interamericana editores. México; 2000. p. 370-390.

[4] Lombardi B. Pathogenesis of fatty liver. *Feder Procceed Exp Biol* 1965; 24 (3-4):1200-1205.

[5] Mckee T, Mckee J. *Bioquímica, la base molecular de la vida.* 3 ed. McGraw-Hill Interamericana editores. México; 2003. Cáp 12: p 398-414.

[6] Ganda OP, Rossini AA, Like AA. Studies on streptozotocin diabetes. *Diabetes.* 1976; (7):595-603.

[7] Flores C, Márquez Y, López-Ortega A, Mendoza C, Colmenarez V, Salas Y. Caracterización de la Diabetes Mellitus experimental inducida con streptozotocina en ratones NMRI. *Gaceta Cs Vet* 2006; 12(1):13-18.

[8] Like AA, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976; 193(4251):415-417.

[9] Hugues B, Rodríguez J, Marrero M. Animales de experimentación como modelos de Diabetes Mellitus Tipo 2. *Rev Cub Endocrinol* 2002; 3(2):160-168.

[10] Tiskow G. Evaluación del estrés oxidativo en ratas con Diabetes Mellitus tipo I inducida por estreptozotocina: efecto protector de la hormona melatonina. *Gaceta Cs Vet* 2006; 12(1):19-26.

[11] Tsuguhiko N, Shiro Y, Toshitaka T, Takeshi K, Takio H, Ryoyu T. The effects of Streptozotocin Diabetes on hepatic triglyceride lipasa activity in the rats. *Metabolism* 1979. 28(1):30-40.

[12] Schmutterer, H. The tree and its characteristics. The Neem tree *Zadirachta indica* A. Juss and other meliaceous plants. En: *Neem: a treatise. Chapt: Geographical distribution, ethnobotany and indigenous uses of Neem.* Singh KK, Phogat S, Tomar A, Dhillon RS, editores. I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi, India; 2008. p 21-41.

[13] Hostettmann K, Marston A, Ndjoko K, Wolfender J. The potential of african plants as a source of drugs. *Curr Organic Chem* 2000; 4(10):973-1010.

[14] Ebong P, Atangwho I, Ubana E, Eneji G. The antidiabetic efficacy of combined extracts from two continental plants: *Azadirachta indica* (A. Juss) (Neem) and *Vernonia amygdalina* (Del.) (African Bitter Leaf). *Am J Biochem Biotechnol* 2008. 4 (3):239-244

[15] Lans C, Harper T, Georges K, Bridgewater E. Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago. *Prev Vet Med* 2002; 45(3-4): 201-220.

[16] Tepsuwa A, Kupradinun P, Kusamran W. Chemopreventive potencial of Neem flowers on carcinogen-induced rat mammary and liver carcinogenesis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2002. 3(3):231-238.

[17] Omar S, Zhang J, MacKinnon S, Leaman D, Durst T, Philogene B, Arnason J, Sanchéz-Vindas P, Poved, L, Tamez P, Pezzuto M. Traditionally Used

- Antimalarials from the Meliaceae. *Curr Top Med Chem* 2003; 3(2):133-139.
- [18] Bhanwra S, Singh J, Khosla P. Effect of *Azadirachta indica* (Neem) leaf aqueous extract on paracetamol-induced liver damage in rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 2000; 44(1):64-68.
- [19] González MS, Mendoza C, Colmenarez V, Linaréz NO, López-Ortega AA. Inducción de úlcera gástrica en ratas Sprage Dawley mediante inmovilización a baja temperatura. Efecto del ayuno previo. *Gac Cs Vet* 2007; 13(1):16-22.
- [20] Halder N, Joshi S, Gupta S. Lens aldose reductasa inhibiting potencial of some indigenous plants. *J Ethnopharmacol* 2003; 86(1):113-116.
- [21] Kar A, Choudhary B, Bandypadhyay N. Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medician plants in alloxan diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2003; 84(1):105-108.
- [22] Halim E. Lowering of blood sugar by water extract of *Azadirachta indica* and *Abroma augusta* in diabetes rats. *Indian J Exp Biol* 2003; 41(6):636-40.
- [23] Gholap S, Kar A. Hypoglycaemic effects of some plant extracts are possibly mediated through inhibition in corticosteroid concentration. *Pharmazie* 2004; 59(11):876-878.
- [24] Moussa S. Oxidative stress in Diabetes Mellitus. *Romanian Omani J Biophys*, 2007; 18(3):225-236.
- [25] Robertson R, Zhou H, Zhang T, Harmon J. Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in Type 2 diabetes. *Cell Biochem Bioph* 2007; 48(2-3): 139-146.
- [26] Chandra A, Mahdi AA, Singh RK, Mahdi F, Chander R. Effect of Indian herbal hypoglycemic agents on antioxidant capacity and trace elements content in diabetic rats. *J Med Food* 2008; 11(3):506-512.
- [27] Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase. *Ann Clin Biochem* 1969; 6:24-27.
- [28] Lott JA, Turner K. Evaluation of Trinder's glucose oxidase method for measuring glucose in serum and urine. *Clin Chem* 1975; 21:1754-1760.
- [29] Mora AC, Aragón MD, Ospina LF. Caracterización del estrés oxidativo en ratas Wistar diabéticas por Streptozotocina. *Vitae* 2009; 16(3):311-319.
- [30] Bhat M, Kothiwale S, Tirmale A, Bhargava S, Joshi B. Antidiabetic properties of *Azadirachta indica* and *Bougainvillea spectabilis*: In vivo studies in murine diabetes model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011; 2011: 561625. Published online 2011 June 18. doi: 10.1093/ecam/nep033
- [31] Akinola O, Caxton-Martins E, Dini L. Chronic treatment with ethanolic extract of the leaves of *Azadirachta indica* ameliorates lesions of pancreatic islets in Streptozotocin diabetes. *Int J. Morphol* 2010; 28(1):291-302.
- [32] Mendoza C, El Abed Y, López-Ortega A. Inducción por estreptozotocina de Diabetes Mellitus experimental en ratones. *Memorias I Jornadas de Investigación del Decanato de Ciencias Veterinarias. UCLA. Del 13 al 14-11-1997. Tarabana, Venezuela. Abstract p. 39.*
- [33] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001; 50(6):537-546.
- [34] Akinola O, Omotoso O, Dosumu O, Akinola OS, Olotufore F. Diabetes-induced prefrontal nissl substance deficit and the effects of neem-Bitter leaf extract treatment. *Int J Morphol* 2011; 29(3):850-856.
- [35] Thakur G, Pal K, Mitra A, Mukherjee S, Basak A, Rousseau D. Some common antidiabetic plants of the Indian subcontinent. *Food Rev Internat* 2010; 26:364-385.