

Toxicidad a dosis repetidas de *Azadirachta indica* A. Juss. (árbol del Nim)

Repeated dose toxicity in *Azadirachta indica* A. Juss (Neem tree)

Clara Azalea Berenguer Rivas,^I Alfredo Alfonso Castillo,^{II} Onel Fong Lores,^{III} Aníbal Domínguez Odio,^{IV} Juan E. Betancourt Hernandez,^V Dani Laramendi Griñan,^{VI} Hilario Salas Martínez,^{VII} Edgar Puentes Zapata,^{VI} Nioslaymy Wawoe Díaz^{VII}

^ILicenciada en Ciencias Farmacéuticas. Máster en Ciencias en Medicina Natural, Tradicional y Bioenergética. Investigadora Agregada. Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED). Santiago de Cuba, Cuba.

^{II}Médico Veterinario. Máster en Ciencias en Toxicología Experimental. TOXIMED. Santiago de Cuba, Cuba.

^{III}Licenciado en Bioquímica. Investigador Agregado. TOXIMED. Santiago de Cuba, Cuba.

^{IV}Médico Veterinario. Investigador Agregado. Centro Provincial de Higiene y Epidemiología. Santiago de Cuba, Cuba.

^VMédico Veterinario. Máster en Patología Clínica. TOXIMED. Santiago de Cuba, Cuba.

^{VI}Médico Veterinario. TOXIMED. Santiago de Cuba, Cuba.

^{VII}Técnico de Laboratorio Clínico. TOXIMED. Santiago de Cuba, Cuba.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: *Azadirachta indica* A. Juss., conocida como árbol del Nim, tiene múltiples aplicaciones para la agricultura, la medicina veterinaria y la salud, es una especie vegetal de importancia relevante por su uso como antimicrobiano, antiparasitario e inmuoestimulante.

OBJETIVO: detectar signos de toxicidad tras la administración diaria durante 28 d de la decocción de *A. indica*.

MÉTODOS: se realizó un ensayo de toxicidad a dosis repetidas a una decocción de esta planta administrando una dosis de 1 000 mg/kg por vía oral a ratas Sprague Dawley durante 28 d. Se evaluaron los signos clínicos y el peso corporal de los animales en estudio y se realizaron exámenes de hematología, bioquímica sanguínea, análisis anatomopatológico e histopatológico.

RESULTADOS: la decocción de la planta no produjo alteraciones significativas en el peso corporal, ni hubo signos clínicos indicadores de toxicidad. No se observaron alteraciones en los indicadores hematológicos y bioquímicos atribuibles a la sustancia de ensayo. Los resultados anatomopatológicos no mostraron alteraciones sobre sistemas, órganos y tejidos.

CONCLUSIONES: el estudio no demostró efectos tóxicos en el modelo animal utilizado, que pudieran estar asociados a la administración repetida de la decocción de la planta *A. indica* en las condiciones empleadas.

Palabras clave: toxicidad, dosis repetidas, *Azadirachta indica*.

ABSTRACT

INTRODUCTION: *Azadirachta indica* A. Juss, known as Neem tree, has various applications in agriculture, veterinary medicine and health care, thus it is a relevant vegetable species due to its antimicrobial, antiparasitic and immunostimulating properties.

OBJECTIVE: to detect any signal of toxicity after daily oral administration of decoction for 28 days.

METHODS: a repeated dose toxicity assay using a *A. indica* decoction at a dose of 1000 mg/kg, orally administered to Sprague Dawley rats for 28 days. Clinical signs and body weight of the study animals were evaluated together with hematological, blood chemistry, anatomopathological and histopathological analyses.

RESULTS: this decoction brought about neither significant change in the body weight nor clinical signs indicating toxicity. There were not altered hematological and biochemical indicators that may be attributed to the substance under testing. The anatomopathological results did not show any alteration upon systems, organs and tissues.

CONCLUSIONS: the study did not reveal toxic effects in the animal model that might be connected with the repeated oral administration of *A. indica* decoction under the study conditions.

Key words: toxicity, repeated dosage, *Azadirachta indica*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la utilización y el estudio de las plantas medicinales han tomado un notable auge. Sin embargo, los conocimientos tradicionales en la actualidad se están perdiendo a un ritmo acelerado, y el recurso biológico se ve amenazado ante el avance de la frontera agrícola y de las grandes ciudades.¹ En Cuba, se ha dado un notable impulso al conocimiento de la flora medicinal del archipiélago, con las evaluaciones farmacológicas y toxicológicas de especies nativas y exóticas de amplio uso popular como medicinales.²

La planta *Azadirachta indica* A. Juss., más conocida como árbol del Nim, margosa, Nim, es considerado uno de los árboles más prometedores del siglo XXI.³ Se

introduce en Cuba en la primera década del siglo XX y es generalizado en 1990 para su utilización en la agricultura como un bioinsecticida natural.⁴

En Cuba se reportan aplicaciones en la práctica médica como acaricida a través de la crema DerNim-U y múltiples usos como antiparasitario,⁴ por lo que en el Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED) a través del Proyecto Territorial 36-06/04 "Evaluación toxicológica de plantas medicinales con acción antimicrobiana empleadas en la salud comunitaria", los autores del presente trabajo evaluaron la toxicidad a dosis repetidas por espacio de 28 d de la decocción de la planta *A. indica* en ratas Sprague Dawley.

MÉTODOS

El estudio se realizó conforme lo establecido en las guías de buenas prácticas y en la Guía para el cuidado, uso y reproducción de los animales de experimentación en el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Todo el procedimiento fue concebido como se estipula en el ensayo 407 de las Directrices de la Organización Económica para la Cooperación y Desarrollo (OCDE),⁵⁻⁸ así como lo descrito en el Manual de los Procedimientos Operacionales de Trabajo.

De *A. indica* se recolectaron hojas y tallos, las cuales se obtuvieron a través del proyecto territorial # 36-06/04 "Evaluación toxicológica de plantas medicinales con acción antimicrobiana empleadas en la salud comunitaria", esta fue certificada y avalada en el Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO) de Santiago de Cuba. Se preparó una decocción de *A. indica*, su concentración se determinó basada en el contenido de sólidos totales.

Se utilizaron en el estudio 30 ratas Sprague Dawley, 10 ratas por cada grupo de experimentación (5 hembras y 5 machos), con un peso promedio de 150 a 200 g; se mantuvieron en condiciones convencionales, temperatura de 22 ± 3 °C, humedad relativa de 65 % como promedio y un fotoperíodo de 12 h luz y 12 h oscuridad. El día antes del inicio del estudio se conformaron los grupos de ensayo: el grupo control, al cual se le administró el vehículo, en este caso agua estéril; y los grupos experimental y satélite a los que se les administró la sustancia en estudio. Las ratas se pesaron para sobre este peso, determinar el volumen de la decocción de la sustancia de ensayo a administrar. Este peso se realizó semanalmente para que la dosis fuera la misma durante todo el ensayo (1 000 mg/kg), porque en ensayos anteriores donde se aplicó una dosis de 2 000 mg/kg no se detectaron efectos tóxicos. La dosis del extracto fue administrada de forma directa (sin diluir) en un volumen de 2 mL/100 g de peso corporal. Al concluir los 28 d de administración y observación, se realizó la necropsia de los animales.

Observaciones clínicas

Se realizaron observaciones clínicas a los animales dos veces al día posadministración, que incluyeron: cambios en la piel, pelos, ojos y membranas mucosas; también los sistemas respiratorio, circulatorio, autónomo y nervioso central, así como la actividad somatomotora y el comportamiento. Además se le prestó atención especial a la observación de temblores, convulsiones, salivaciones, diarreas, letargo, sueño y coma.

Peso corporal

Los animales se pesaron al inicio del estudio y los días 7, 14, 21, 28. Se empleó no solo para calcular los volúmenes de la decocción de Nim a administrar, sino también para detectar posibles variaciones de peso corporal durante la etapa experimental.

Parámetros hematológicos

Una vez transcurridos los 28 d del estudio se determinaron en sangre total las variables hematológicas siguientes: hemoglobina, conteo global y diferencial de leucocitos.

Parámetros de química sanguínea

En el plasma se determinaron las variables bioquímicas siguientes: glucosa (Gluc), colesterol total (Col-T), proteínas totales (PT), triglicéridos (TG) y las enzimas hepáticas alanin aminotransferasa (ALAT) y aspartato aminotransferasa (ASAT). Las muestras fueron procesadas en un analizador automático HITACHI 920, empleando sueros controles Precinorm U y Precipath U, ambos de la firma Boehringer Mannheim GmbH.

Estudio anatomopatológico

El examen macroscópico incluyó la superficie externa del cuerpo, todos los orificios y cavidades (craneal, torácica y abdominal) así como sus órganos: (hígado, riñones, adrenales, testículos, epidídimo, timo, bazo, pulmones y corazón) de todos los animales.

Para el examen histopatológico se tomaron muestras de los órganos siguientes: cerebro, cerebelo, puente de Varolio, médula espinal (región cervical, torácica y lumbar), glándula tiroides, paratiroides, timo, esófago, glándulas salivales, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, páncreas, riñones, adrenales, bazo, corazón, tráquea y pulmones, aorta, gónadas, órganos sexuales accesorios (glándulas mamarias, próstata), útero, vejiga urinaria, ganglios linfáticos (uno cerca de la vía de administración y uno distante de esta), el nervio periférico (ciático o tibial) preferentemente próximo al músculo, y una sección de médula ósea de los animales de todos los grupos. Las muestras se fijaron en formol 10 % neutro y se procesaron por el método de parafina.

Análisis estadístico

Los cálculos se efectuaron con el auxilio del programa SPSS para Windows, versión 11,5 en una máquina Pentium IV. Se utilizó la prueba ANOVA de un factor para la

comparación de pares de estudio y se utilizó la prueba t para muestras pareadas. Los valores promedios del peso corporal se compararon por un método no paramétrico, la prueba de la U de *Mann-Whitney*.

Para el análisis de los parámetros hematológicos y bioquímicos: se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) tomando como factores los grupos confeccionados y los sexos; en las variables en que existieron diferencias, se le aplicó una prueba de rango múltiple de Duncan.⁹

RESULTADOS

Signos clínicos

El ensayo concluyó con 100 % de supervivencia. En ninguno de los animales tratados se observaron signos clínicos que pudieran asociarse a efectos tóxicos sistémicos; el comportamiento de los animales fue el normal para la especie.

Comportamiento del peso corporal

En la tabla 1 se indica el aumento en el peso corporal observado en los animales en estudio, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los días del ensayo dentro de cada grupo, así como entre los diferentes sexos.

Tabla 1. Variación del peso corporal (g) en ratas Sprague Dawley en el ensayo de prueba límite de una decocción de *Azadirachta indica*

Grupo	Sexo	Tiempo (días)				
		0	7	14	21	28
Control	H	177,24 ± 12,51	195,96 ± 14,88	216,48 ± 10,42	234,22 ± 10,43	248,70 ± 12,46
	M	225,84 ± 11,75	280,26 ± 10,99	314,14 ± 9,05	351,84 ± 7,31	356,88 ± 7,71
Experimental	H	176,78 ± 18,74	198,70 ± 18,48	219,96 ± 25,20	236,34 ± 31,14	241,12 ± 31,09
	M	234,80 ± 11,78	283,72 ± 13,34	327,50 ± 16,22	358,32 ± 17,17	363,84 ± 14,86
Satélite	H	183,58 ± 7,89	196,26 ± 7,43	216,36 ± 12,15	229,98 ± 11,25	236,54 ± 9,93
	M	222,14 ± 4,38	271,78 ± 6,36	314,30 ± 7,67	343,44 ± 10,11	360,70 ± 10,27

H: hembras, M: machos.

Exámenes hematológicos

En la tabla 2 se puede observar el comportamiento de los parámetros hematológicos estudiados: hemoglobina y leucocitos totales, así como las subpoblaciones leucocitarias: linfocitos y neutrófilos en ratas Sprague Dawley, tras la administración oral de una decocción de la planta *A. indica* durante 28 d. Al realizar el análisis estadístico se encontró que solo existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de hemoglobina para los diferentes sexos.

Tabla 2. Comportamiento de los parámetros hematológicos en ratas Sprague Dawley en el ensayo de prueba límite de una decocción de *Azadirachta indica*

Grupo	Sexo	Hemoglobina (g/L)	Leucocitos ($\times 10^9/L$)	Linfocitos ($\times 10^9/L$)	Neutrófilos ($\times 10^9/L$)
Control	H	124,6 \pm 0,89	6,26 \pm 0,94	4,88 \pm 0,76	1,38 \pm 0,29
	M	137,6 \pm 1,52	6,42 \pm 0,62	5,10 \pm 0,40	1,32 \pm 0,24
Experimental	H	123,0 \pm 2,17	6,64 \pm 0,55	5,28 \pm 0,32	1,36 \pm 0,25
	M	138,6 \pm 2,12	6,68 \pm 0,59	5,38 \pm 0,44	1,30 \pm 0,16
Satélite	H	124,4 \pm 2,70	6,72 \pm 0,64	5,42 \pm 0,69	1,30 \pm 0,20
	M	137,8 \pm 3,03	6,76 \pm 0,36	5,54 \pm 0,26	1,22 \pm 0,13

H: hembras, M: machos.

Exámenes de química sanguínea

En la tabla 3 se refleja el comportamiento de los parámetros bioquímicos. Una vez realizado el análisis estadístico de estos biomarcadores se pudo observar un incremento significativo ($p < 0,05$) de la glucosa en las ratas machos del grupo experimental con respecto al control, la cual no resultó significativa para el grupo satélite. En el caso de los grupos de hembras se mantuvo este comportamiento, pero no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$).

Tabla 3. Comportamiento de parámetros bioquímicos en ratas Sprage Dawley en el ensayo de prueba límite de una decocción de *Azadirachta indica*

Grupo	Sexo	Gluc (mmol/L)	TG (mmol/L)	Col-T (mmol/L)	PT (g/L)	ALAT (U/L)	ASAT (U/L)
Control	H	3,38 ± 0,18	1,18 ± 0,33	0,98 ± 0,30	66,8 ± 2,17	24,50 ± 3,53	36,48 ± 3,56
	M	3,48 ± 0,23	1,62 ± 0,15	1,1 ± 0,21	67,4 ± 3,3	27,84 ± 2,72	37,44 ± 1,67
Experimental	H	3,62 ± 0,15	1,16 ± 0,26	0,96 ± 0,27	67,4 ± 2,88	23,46 ± 1,98	38,66 ± 0,63
	M	3,78 ± 0,18 *	1,76 ± 0,15	1,1 ± 0,21	69,8 ± 1,79	27,04 ± 4,50	34,32 ± 3,19
Satélite	H	3,62 ± 0,30	1,30 ± 0,27	1,02 ± 0,19	67,8 ± 2,86	25,72 ± 1,92	37,28 ± 2,73
	M	3,68 ± 0,13	1,74 ± 0,10	0,9 ± 0,20	69,8 ± 2,17	28,62 ± 4,42	36,22 ± 3,33

H: hembras, M: machos, Gluc: glucosa, Col-T: colesterol total, PT: proteínas totales, TG: triglicéridos, ALAT: alanin aminotransferasa, ASAT: aspartato aminotransferasa.
* Diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

En el caso de los triglicéridos no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los grupos de estudio, sin embargo, sí se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los sexos de cada grupo.

El comportamiento de las enzimas ALAT y ASAT, biomarcadores por excelencia de hepatopatías causadas por exposición a sustancias químicas, muestra solo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las hembras del grupo experimental y los machos del grupo satélite para la enzima ALAT; así como entre las hembras y los machos del grupo experimental para la enzima ASAT.

Estudio anatomopatológico

No se produjo la muerte de ningún animal durante el estudio, por ello todos fueron sacrificados al finalizar la investigación. Al realizar la necropsia no se encontraron lesiones macroscópicas ni microscópicas atribuibles a la sustancia de ensayo, que corroboró la ausencia de alteraciones bioquímicas y hematológicas.

DISCUSIÓN

El descubrimiento de un alto porcentaje de fármacos de origen vegetal es resultado del estudio científico de plantas bien conocidas y empleadas en la medicina tradicional. No obstante a ello, se debe tener en cuenta que ciertas plantas medicinales no han mostrado las propiedades que les atribuye la experiencia popular, e incluso algunas han resultado peligrosas.¹⁰ De ahí la necesidad de realizar estudio farmacológicos y toxicológicos, estos últimos son los que cumplen la finalidad de determinar la seguridad de su uso.

En este trabajo se muestran los resultados de un estudio toxicológico realizado a un producto natural proveniente de la planta *A. indica*. En Cuba se investiga el

producto "DerNim-U" (ungüento) preparado a partir del aceite y extracto de las semillas del árbol *A. indica*, al cual se le determinó la toxicidad dérmica y oftálmica.⁴ Sin embargo no se tiene información sobre las propiedades tóxicas de esta planta por vía oral, que constituye una de las vías más empleadas por la población, de ahí su importancia.

El peso corporal es un parámetro fundamental dentro de un estudio toxicológico y el comportamiento se corresponde con lo reportado en las normas para el uso y cuidado de los animales de laboratorio,⁶ así como en estudios de caracterización de parámetros fisiológicos en esta especie animal,¹¹ y estudios realizados en CENPALAB.^{12,13}

Los exámenes hematológicos y de química sanguínea son de gran valor en los ensayos toxicológicos a largo plazo, porque son indicativos del alcance y profundidad de un daño, además los resultados pueden correlacionarse con los posibles daños sobre un órgano específico.

Los valores obtenidos en los indicadores hematológicos no mostraron alteraciones importantes, las variaciones encontradas están dentro del rango normal establecido por el grupo control y por estudios de caracterización de esta especie realizados en CENPALAB.^{12,13}

Cuando se evaluó el comportamiento de los metabolitos glucosa, triglicéridos, colesterol y proteínas totales debe destacarse que se encontraron dentro del rango de valores normales reportados para esta especie animal.

Al analizar las diferencias obtenidas tras la evaluación del comportamiento de las enzimas ALAT y ASAT, estas carecen de significación biológica, porque las actividades de ambas enzimas hepáticas se encontraron dentro del rango de valores normales establecidos a partir de los controles, que coincide con los reportados para esta especie animal.¹³

Por todo lo anterior, se puede concluir que en las condiciones de ensayo empleadas, la decocción de la planta no produjo alteraciones significativas en el peso corporal, ni se observaron signos clínicos indicadores de toxicidad. Las diferencias observadas en los indicadores hematológicos y bioquímicos para los 2 sexos, no son relevantes biológicamente y no se mostraron alteraciones anatómo-histopatológicas atribuibles al efecto de la sustancia de ensayo sobre sistemas, órganos y tejidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fuentes VR, Granda MM. Conozca las plantas medicinales. La Habana: Editorial Científico-Técnica; 1997. p. 6-7.
2. Morón F, Sierra P, Villán J, Martínez MJ. Las plantas medicinales en la terapéutica. Rev Cubana Med Gen Integr. 1991;7(3):276-84.
3. Parrotta JA, Chaturvedi AN. *Azadirachta indica* A. Juss. Neem, margosa. SO-ITF-SM-70. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station; 1994. p. 66-72.

4. Estrada J, Diaz FS. Experiencia de la Aplicación del *DerNim U* como Acaricida natural en el tratamiento de la escabiosis. *Acta Farm Bonaerense*. 2005;24(4):555-8.
5. OECD Guideline for the testing of chemicals. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents 407. Adopted by the council on 27th July, OECD, Paris, 1995. 1-28 [serie en Internet]. [citado 25 May 2008]. Disponible en: <http://www.oecd.org/dataoecd/50/41/37477972.pdf>
6. Guide for the care and use of laboratory animals. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press; 2001.
7. Buró Regulatorio para la Protección de la Salud Pública. Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico de Seguridad Sanitaria y Medioambiental. Regulación 39/2004. La Habana: MINSAP; 2004.
8. Food and Drug Administration. Good Laboratory Practice for nonclinical laboratory studies [serie en Internet]. [citado 25 May 2008]. Disponible en: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/980335s1.pdf>
9. Joseph KH, Walter BP. Statistical analysis of developmental toxicity data. Development toxicology. In: Wallace Hayes A, editor. Principles and methods of toxicology. 3th ed. New York: Raven Press; 1994. p. 349-61.
10. Miller LG. Herbal medicinals: selected clinical considerations focusing on known or potential drug-herb interactions. *Arch Intern Med*. 1998;158:2200-11
11. Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB. Reference range data base for serum chemistry and haematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environm Health*. 1986;18:161-88.
12. Alemán C. Reference database of mains physiological parameters in Sprague Dawley rats from 6 to 32 months. *Lab Anim*. 1998;32(4):457-66.
13. Alemán C. Reference database for the principal physiological indicators in three species of laboratory animal. *Lab Anim*. 2000;34(1):358-78.

Recibido: 7 de octubre de 2009.

Aprobado: 7 de junio de 2010.

MSc. *Clara Azalea Berenguer Rivas*. Centro de Toxicología y Biomedicina. Autopista Nacional, Km 1 1/2, AP 4033, Santiago de Cuba, Cuba. Teléfs.: 53 (22) 64 3346. Correo electrónico: azalea@toxi.scu.sld.cu