

Efecto del liofilizado del fruto *Azadirachta indica* a. Juss sobre la glucemia en ratas

Effect of lyophilisate of the fruit *Azadirachta indica* a. Juss on glycemia in rats

Juan Luis Rodríguez Vega ^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-2639-7339>

Richard Fredy Garcia Ishimine ¹ <https://orcid.org/0000-0002-6675-9779>

Davis Alberto Mejía Pinedo¹ <https://orcid.org/0000-0002-8790-1682>

Miryam Griselda Lora Loza¹ <https://orcid.org/0000-0001-5099-1314>

Wilmer Leoncio Calderón Mundaca ² <https://orcid.org/0000-0002-1995-1063>

¹ Escuela de postgrado, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú

² Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Facultad de ciencias biológicas, Lambayeque, Perú

*Autor para correspondencia: galloide@hotmail.com

Recibido: 22/04/2021

Aprobado: 26/12/2021

RESUMEN

Introducción: La glicemia es una característica preponderante de ciertos síndromes metabólicos crónicas prevalentes en el mundo y constituye un problema de salud pública,

donde para normalizar los niveles de glucosa en la sangre se ha empleado tradicionalmente la *Azadirachta indica* desde hace más de cuatro mil años., como alternativa terapéutica.

Objetivo: Determinar el efecto sobre la glicemia en diabetes experimental en *Rattus rattus* Var *Albinus* del extracto acuoso liofilizado del fruto *Azadirachta indica* A. Juss, “Neem”, a 200 mg y 400 mg

Método: Se empleó un diseño experimental, prospectivo, longitudinal con una muestra de 30 ratas machos divididas en 3 grupos a quienes se les indujo diabetes experimentalmente con estreptozotocina, a dos grupos se administraron dos dosis extracto acuoso liofilizado de Neem y al tercero agua ad libitum como placebo.

Resultados: El día 1 día tuvo una concentración de glucosa promedio de $283,7 \pm 7,7$ mg/dl; para el 7 día se apreció una concentración de $179,5 \pm 6.4$ mg/dl; para el 14 día la concentración promedio de glucosa fue de $91,1 \pm 9,1$ mg/dl; y para el día 21 se obtuvo na concentración de glucosa promedio de $84,4 \pm 11,6$ mg/dl, finalmente una concentración para el día 28 la glucosa promedio de $60,2 \pm 4,9$ mg/dl.

Conclusiones: El extracto liofilizado del fruto de Neem posee efecto hipoglucemiante a dosis de 200 mg y 400 mg.

Palabras clave: Glicemia, *Azadirachta indica*, ratas.

ABSTRACT

Introduction: Glycemia is a preponderant characteristic of certain chronic metabolic syndromes prevalent in the world and constitutes a public health problem, where *Azadirachta indica* has traditionally been used to normalize blood glucose levels for more than four thousand years. as a therapeutic alternative.

Objective: To determine the effect on glycemia in experimental diabetes in *Rattus rattus* Var *Albinus* of the freeze-dried aqueous extract of the fruit *Azadirachta indica* A. Juss, “Neem”, at 200 mg and 400 mg

Method: An experimental, prospective, longitudinal design was used with a sample of 30 male rats divided into 3 groups that were experimentally induced diabetes with

streptozotocin, two groups were administered two doses of lyophilized aqueous Neem extract and the third one with water ad libitum as placebo.

Results: On day 1 he had an average glucose concentration of 283.7 ± 7.7 mg / dl; For the 7th day, a concentration of 179.5 ± 6.4 mg / dl was observed; for the 14th day, the average glucose concentration was 91.1 ± 9.1 mg / dl; and for day 21 an average glucose concentration of 84.4 ± 11.6 mg / dl was obtained, finally a concentration for day 28 the average glucose of 60.2 ± 4.9 mg / dl.

Conclusions: The lyophilized extract of the Neem fruit has a hypoglycemic effect at doses of 200 mg and 400 mg.

Keywords: Glycemia, Azadirachta indica, rats.

Introducción

Los síndromes metabólicos crónicos donde el metabolismo de los carbohidratos se expresa en una hiperglucemia son los más prevalentes en el mundo y constituye un problema de salud pública creciente donde muchos de estos trastornos fisiopatológicos se producen como consecuencia de defectos en la secreción de insulina.⁽¹⁾ La glucosa es la principal fuente de calor y energía en el organismo, que procede fundamentalmente de los carbohidratos ingeridos; sólo en forma parcial y bajo regulación puede proceder del catabolismo del glucógeno.^(2,3) El páncreas endocrino está compuesto por cerca de un millón de unidades celulares (los islotes de Langerhans), denominadas células β que produce y almacena la hormona proteínica insulina, también poseen gránulos hidrosolubles, pueden presentarse en dos tipos: como por ejemplo (α -1 ó D) secretan somatostatina que inhibe la liberación de insulina y glucagón.^(4,7)

El mantenimiento de los niveles de glucosa es uno de los mecanismos homeostáticos más finamente regulado en el cual toma parte el hígado, los tejidos extrahepáticos y diversas hormonas contrarreguladoras e insulina.⁽⁵⁾ La concentración de la glucosa sanguínea varía, en el adulto humano, entre 80 y 100 mg/100 ml. Después de la ingestión de una comida de carbohidratos, puede elevarse a 120 ó 130 mg/100 ml. Durante el ayuno, el nivel cae el

alrededor de 60 a 70 mg/100 ml.⁽⁸⁾ La homeostasis normal de la glucosa está regulada por tres procesos interrelacionados: producción hepática, captación y utilización por los tejidos periféricos sobre todo por el músculo estriado, influyen en estos tanto la insulina, hormona encargada del transporte hacia las células para su utilización como fuente de energía, como sus antagonistas: el glucagón, catecolaminas, cortisol y hormona de crecimiento, que generen hiperglucemia ^(6,9). En los hepatocitos la glucosa interacciona con el transportador GLUT2 que no depende de insulina, ingresando por la membrana celular, la glucocinasa incrementa su afinidad por la glucosa y con ello la capacidad fosforiladora a glucosa-6-fosfato; como esta enzima no es inhibida por su producto (glucosa-6-fosfato), sostiene una rápida fosforilación que mantiene una concentración muy baja de glucosa en el hepatocito.⁽¹⁰⁾ A nivel experimental existen diversos métodos para inducir hiperglicemia en animales de experimentación, entre ellos la pancreatoclectomía parcial o total, la utilización de sustancias tóxicas para el páncreas tales como estreptozotocina (STZ).⁽¹¹⁾ La acción de STZ en la célula β produce hiperglicemia y una disminución de los niveles de insulina circulantes a las 2 horas después de administrada, sin embargo, 6 horas post administración, se presenta hipoglicemia e hiperinsulinemia y finalmente, los niveles de insulina disminuyen y se produce hiperglicemia mantenida.⁽¹²⁾

Las plantas medicinales han sido siempre fuente de sustancias farmacológicamente activas y de interés terapéutico, formando parte de la composición de productos para la medicina tradicional y moderna, alimentos y suplementos nutraceúticos. En el 2005 la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló que más del 80 % de la población mundial depende de plantas medicinales para atender problemas de salud en la atención primaria y recomendó mayor investigación en el área, sobre todo en relación al tratamiento de enfermedades crónicas como la diabetes mellitus.⁽¹³⁾ Entre las plantas más importantes con alto contenido de principios activos que se emplean como agentes terapéuticos de diferentes enfermedades, se encuentra el árbol Neem (*Azadirachta indica*), Los antiguos herbarios hindúes descubrieron sus propiedades y uso que se encuentra en el antiguo sanscrito desde hace 4000 años.⁽¹³⁾ El Neem es tradicionalmente empleado en la India donde se refieren a esta planta como la “farmacia de la aldea” o la “botica del pueblo” debido a sus muchos fines medicinales para curar y prevenir distintas enfermedades.⁽²⁴⁾ Las hojas, semillas, flores y

aceites del árbol poseen efectos analgésicos, antihelmínticos, antipiréticos, antisépticos, antisifilíticos, astringentes, demulcentes, diuréticos, emenagogos, emolientes y purgantes. Se ha demostrado que los extractos de Neem poseen propiedades antibacterianas, antidiabética, antifúngicos y antiviral.⁽²⁴⁾

El Neem tiene miles de compuestos químicos de especial interés son terpenoides o más específicamente limonoides, estos compuestos están primordialmente formados por C, H y O; la presencia del oxígeno hace estos compuestos más solubles en agua, metanol o etanol que en hexano. Los limonoides son producidos por especies de las familias Meliaceae, Rutaceae y Simaroubacea. Son compuestos homogéneos estereo químicamente con una estructura típica derivada de un esqueleto 4,4,8-trimetil-17-furanilesteroides como precursor. Los limonoides cítricos, por ejemplo, contienen un anillo furano unido al anillo D en C-17.⁽²⁴⁾ No existen muchas investigaciones sobre el fruto; se determina el efecto sobre la glicemia en diabetes experimental inducida por Estreptozotocina en *Rattus rattus* Var *Albinus* del extracto acuoso liofilizado del fruto *Azadirachta Indica* a diferentes dosis ⁽¹³⁾ para así contribuir con una alternativa eficaz y de fácil acceso.

Métodos

El diseño metodológico fue de tipo experimental a estímulo creciente.^(25, 26, 27) Se consideraron los siguientes grupos de tratamiento: grupo tratamiento I: Dosis de 200 mg/kg PA (peso del animal); grupo tratamiento II: Dosis de 400 mg/kg PA; grupo tratamiento III: Dosis de 800 mg/kg PA; y un grupo Tratamiento C o Testigo: Dosis placebo de agua destilada; donde según el diseño de investigación (figura 1) evaluándose en los días 0, 1, 7, 14, 21, 28 para los grupos tratamiento y el grupo control esos días también y el día 35, estas tomas de muestra y evaluaciones fueron a las 8 de la mañana.

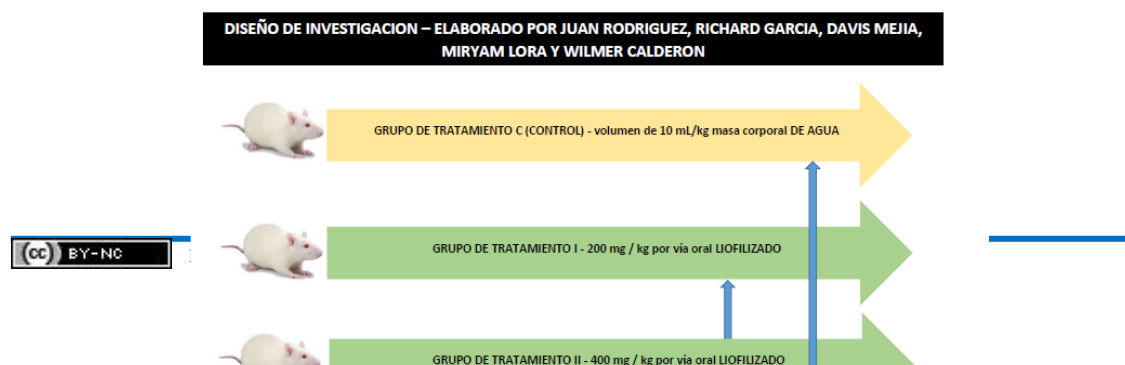


Fig. 1. Diseño de investigación propuesto, el Grupo tratamiento I, el Grupo tratamiento II, y el grupo de tratamiento C; según dosis de tratamiento y días de recojo de muestra.

Población – muestra

Se empleó material de estudio botánico que consistió en frutos de Neem los cuales fueron sometidos a proceso de liofilización, resuspendió el liofilizado en proporción 1 en 1 con agua destilada para las respectivas dosis; y material de estudio zoológico que consistió en 20 *Rattus norvegicus*, machos, de 2 meses, con peso corporal entre 150 a 200 gramos, adquiridos del Instituto Nacional de Salud, Chorrillos, Lima, que se alojaron en un bioterio, con alimentación balanceada y agua ad libitum. Estos especímenes fueron agrupados muestralmente según el método de Mead.⁽¹⁴⁾

Procedimiento

Método de obtención de extractos acuosos liofilizados

Se utilizó el método descrito por Lecca y colaboradores ⁽¹⁴⁾ según el cual se seleccionaron los frutos de acuerdo a su buen estado de conservación, esta parte vegetal se sometió a la acción de un chorro continuo de agua para descontaminarlo, luego el producto se sometió a cocción en una proporción de 870 g. del fruto en 16 L. de agua, luego fue filtrado en algodón y en papel, y posteriormente fue congelado a -20 °C por 24 horas pasándolo a estado sólido. Se utilizó un liofilizador de 4.5 L, donde se deshidrató el extracto acuoso congelado, a una temperatura y presión de vapor bajo (-40° C y 1.33x 10⁻³ MBARR) por sublimación durante

72 horas. El producto fue pesado con una balanza analítica y almacenándose en un ambiente seco a temperatura controlada menor de 25°C, en frasco con cierre hermético, color ámbar y alejado de la luz

Método de evaluación de actividad hipoglucemiante

A. Etapa de acondicionamiento y aclimatación de los animales de ensayo

Los animales de experimentación fueron sometidos a condiciones de aclimatación y acondicionamiento por 14 días, con la finalidad de que se adapten al entorno de bioterio, y adquirir el peso ideal; todos los sujetos eran fisiológicamente normales luego se marcó con Violeta de genciana, sobre determinadas áreas del cuerpo, posteriormente se procedió al pesado en una balanza digital, obteniéndose un peso promedio de 280 g por rata, anotándose en las fichas de identificación.

B. Inducción experimental de hiperglucemia

La inducción de hiperglucemia en los grupos experimentales se efectivizó posterior a un ayuno de 12 horas, el día 15 del experimento obteniéndose una muestra de sangre de la vena caudal, en capilares heparinizados de 75 µl de volumen, los que fueron procesados por el método de Glucosa oxidasa; con la primera muestra de sangre se determinó el valor de glucemia basal de todas las ratas; luego se les inoculó vía intraperitoneal una solución de Estreptozotocina a 0.01M disuelto en Buffer Citrato a un pH 4.5, en dosis de 40 mg/kg/pc, para inducirles hiperglicemia experimental; en la mañana a las 8 am, una vez por semana durante 35 días con un valor mínimo 200 mg/dl

C. Tratamiento de los grupos experimentales

Después del 35avo día se administró por vía oral el extracto acuoso liofilizado del fruto *Azadirachta indica* A. Juss “Neem”, a dosis de 200 y 400 mg/kg, mediante cánula intragástrica 16G durante 28 días, cada 24 horas.

D. Evaluación

Se realizó posteriormente el periodo de evaluación para la inducción de la hiperglicemia, mediante la toma de muestras sanguíneas los días 0,1, 7, 14, 21, 28 y 35; y luego en los grupos de tratamiento se evaluó la glucemia los días 1, 7, 14, 21,28 respectivamente cuantificándolos por el método de glucosa oxidasa.

Análisis estadístico

Se utilizó estadística descriptiva para obtener, graficar y comparar los respectivos índices de aprendizaje utilizando el programa Microsoft Excel 2019; una vez registradas las medias y error estándar de tiempo (minutos) gastados, todos los valores se representaron estadísticamente como “medias \pm desviación estándar” y al tener diferentes entre grupos pareados, se aplicó una prueba ANOVA (Analysis of Variance) expresada como la descomposición de la varianza entre-grupos, intra-grupos y total, siendo el valor obtenido superior a 1 en F.

Aspectos éticos

Para el presente trabajo se tomó como norma las tres “R” de Russel, procurando la instrucción y capacitación del personal técnico que apoye en la realización de la presente investigación, además se tuvo en cuenta de modo permanente el estado sanitario de los animales que, al estar ligado a su capacidad de respuesta, fue cuidado permanentemente teniendo en cuenta la carga animal de 10 ratas por ambiente para reducir el estrés. Asimismo, se consideró la Ley 30407 “Ley de protección y bienestar animal”, también los criterios elementales de la American Veterinary Association “AVA” para el tratamiento de mamíferos pequeños en experimento ^(27, 28, 29, 30), además, se emplearon las normas éticas de la experimentación animal de la Guía de Manejo y Cuidado de los Animales propuesta por el Ministerio de Salud del Perú para la optimización de un medio adecuado y libre de peligros; así como una adecuada calidad de vida ^(27, 28, 29, 30).

Resultados

La tabla 1 muestra que el día 1 día se tuvo una concentración de glucosa promedio de $290,2 \pm 4,9$ mg/dl; para el 7 día se apreció una concentración de $250,1 \pm 7,4$ mg/dl; para el 14 día la concentración promedio de glucosa fue de $110 \pm 9,5$ mg/dl; y para el día 21 se obtuvo una concentración de glucosa promedio de $96,4 \pm 3,77$ mg/dl, finalmente una concentración para el día 28 la glucosa promedio de $80,3 \pm 9,0$ mg/dl, presentando una disminución de la hiperglicemia experimental.

Tabla 1. Concentración de glucosa sanguínea (mg/dl) de las ratas hiperglicémicas tratadas con extracto acuoso liofilizado del fruto de *Azadirachta indica* A. Juss “Neem”, a dosis de 200 mg (n = 10) (Basal $\chi = 300$ mg/dl ± 2.1)

Parámetros	1 día	7 día	14 día	21 día	28 día
χ	290,2	250,1	110	96,4	80,3
DE	4,93963561	7,44535649	9,51022841	3,77712413	9,09273214

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Bioterio.

Elaboración: los autores

La tabla 2 evidencia que el día 1 día se tuvo una concentración de glucosa promedio de 283,7 $\pm 7,7$ mg/dl; para el 7 día se apreció una concentración de 179,5 $\pm 6,4$ mg/dl; para el 14 día la concentración promedio de glucosa fue de 91,1 $\pm 9,1$ mg/dl; y para el día 21 se obtuvo una concentración de glucosa promedio de 84,4 $\pm 11,6$ mg/dl, finalmente una concentración para el día 28 la glucosa promedio de 60,2 $\pm 4,9$ mg/dl, mostrando un efecto hipoglucemiante más agresivo a esta concentración de tratamiento.

Tabla 2. Concentración de glucosa sanguínea (mg/dl) de las ratas tratadas con extracto acuoso liofilizado del fruto de *Azadirachta indica* A. Juss “Neem”, a dosis de 400 mg (n = 10) (Basal $\chi = 304$ mg/dl ± 4.0)

Parámetros	1 día	7 día	14 día	21 día	28 día
χ	283.7	179.5	91.1	84.4	60.2
DE	7.7895942	6.4678693	9.1948053	11.673331	4.9844202

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Bioterio.

Elaboración: los autores

En la tabla 3 se constata que la prueba de hipótesis el estadístico de contraste obtenido (F) se distribuye según la distribución de Fischer-Snedecor con $\alpha(k-1, (n-1)*k)$ grados de libertad. Dando como resultado a nivel tabular un valor de F es mayor a 1 (8,85) con un p-valor asociado menor a 0,05, siendo el resultado de F calculado 570,14 y en este sentido la variabilidad entre grupos fue mayor a la aportada por todas las observaciones individuales, por lo que el factor analizado (extracto liofilizado) explica parte de la variabilidad detectada entre los sujetos.

Tabla 3. ANOVA del promedio de la concentración de glucosa en las ratas según grupo y tratamiento

Origen de las variaciones	gl (grados de libertad)	Suma de los cuadrados	Cuadrado medio	F _o	F _t
Entre tratamiento	3 - 1 = 2	426,9	426,9/2 = 213,45	213,8/0,375 570,14	8,85
Dentro de grupos (error)	15 - 3 = 12	4,5	4,5/12 = 0,375		
Total	12 - 2 = 10	580,12	-----		

p<0,05

En la figura 2, se puede apreciar en qué medida la concentración de glucosa en la sangre de las ratas evaluadas de acuerdo a los tratamientos de carácter experimental va cambiando en su concentración lo que permite inferir el efecto hipoglicemiante del extracto del neem; siendo mas considerable el efecto decremental del tratamiento II a los 28 días de evaluación.

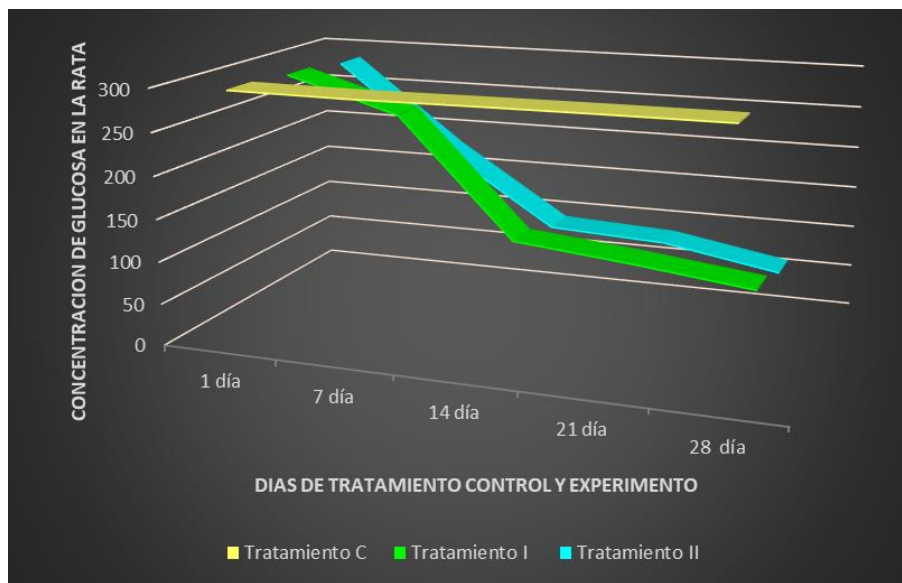


Fig. 2. Concentración de glucosa sanguínea (mg/dl) según tiempo (días) de las ratas tratadas con agua destilada y con extracto acuoso liofilizado del fruto *Azadirachta indica* a. Juss “neem” a dosis 200 mg y 400 mg.

Discusión

El extracto acuoso liofilizado del fruto *Azadirachta indica* A. juss “Neem” por vía oral a dosis de 200 mg / kg y de 400 mg / kg presento un evidente efecto hipoglucemiante en sangre con respecto al control negativo ($p < 0.001$), lo cual coincide con un estudio donde empleando un extracto de extracto de hoja de Neem a dosis 500 mg / kg por vía oral por 28 días se reducía significativamente los niveles de glucosa en sangre en ratas, ⁽¹⁹⁾ y donde al tender una dosis más alta y sostenible en el tiempo el efecto podría deberse a los sitios de acción extra pancreáticos, como el aumento de la utilización de glucosa periférica o por efecto metabólico directo en tejido hepático; lo cual obviamente nos permite inferir que en la regulación de la glucemia es importante la interacción de la insulina, el glucagón (función de islote pancreático), y la capacidad de las células de los tejidos muscular, adiposo y hepático para captar la glucosa (sensibilidad a la insulina) empleando incretinas y factores estimulantes e inhibidores de la función del páncreas endocrino. ^(20,21) El tratamiento continuo con extracto acuoso liofilizado del fruto de Neem produjo una reducción significativa del nivel de glucosa en sangre en ratas con hiperglucemia experimental inducida por estreptozotocina a medida que avanzaba el tiempo de tratamiento cabe destacar que podría haberse inducido la actividad de incretinas más importantes como el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) y el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1, por acción de los flavonoides (un tipo de polifenoles) presentes en el Neem que lógicamente restituyen las capacidades funcionales del tejido dañado por el estrés generado por la estreptozotocina inductora de hiperglicemia.

La secreción de incretinas empieza a los 15 minutos después de la ingesta y alcanza su máximo a los 30 a 45 minutos, retornando a valores basales 2 a 3 horas posteriores, una vez en la sangre, la vida media de las incretinas es muy corta, porque son rápidamente degradadas por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP4). ⁽²²⁾ La principal acción de GIP y GLP-1, es estimular la secreción de insulina a través de la unión a sus receptores localizados en la superficie de la célula β del páncreas. La unión de estos a sus receptores causa una activación

de la adenilciclasa a través de la proteína G, produciendo un incremento intracelular del AMP cíclico lo cual activa a la proteína quinasa-A (PKA) y al factor tipo II de intercambio del nucleótido de guanina regulado por AMPc. Ambas proteínas desarrollan una cascada de eventos intracelulares que involucran el cierre de los canales de potasio sensibles a ATP (k-ATP), despolarización de la célula β con elevación del calcio intracelular e inhibición de los canales de potasio dependientes de voltaje y exocitosis de los gránulos de insulina,⁽²³⁾ lo cual contribuye aún más al hecho de que el Neem presenta propiedades hipoglucemiantes causados por los principios activos polifenoles en las hojas y frutos

Conclusiones

Se preparó el extracto acuoso liofilizado de fruto Neem, y se indujo el estado de hiperglicemia en las ratas con tratamiento I y II empleando la estreptozotocina.

Al aplicar una dosis de 200 mg de extracto acuoso liofilizado de fruto Neem se redujo la hiperglicemia inducida experimentalmente a partir del 7 día hasta llegar a valores de 100 en el día 14; y ante dosis de 400 mg del extracto en mención se redujo la hiperglicemia en una forma más marcada a partir el día 7 hasta llegar a valores decrementales de 84 mg/dl y 60 mg/dl.

La dosis de 400 mg de extracto acuoso liofilizado de fruto Neem presenta mayor efectividad que la dosis de 200 mg del extracto acuoso para recuperar a las ratas con hiperglicemia inducida por estreptozotocina.

Se concluye que el tratamiento “in vivo” con Spirulina máxima a dosis de 200, 400 y 800 mg/kg PA presentó un efecto potenciador a largo plazo en el sujeto experimental a nivel de la memoria espacial en el laberinto acuático de Morris.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional de Trujillo y la Escuela de Postgrado por las facilidades brindadas para la implementación del presente trabajo; esfuerzo conjunto de

docentes y estudiantes del Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Promoción Claude Bernard 2019 – 2021

Referencias bibliográficas

1. Diabetes Mellitus: Definición y Etiopatogenia. Escuela de medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile. 2012 [acceso: 30/03/2021]. Disponible en: <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/tercero/IntegradoTercero/ApFisiopSist/nutricion/NutricionPDF/DiabetesMellitus.pdf>
2. Ministerio de Salud. Guía de práctica clínica para el diagnóstico, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Perú. 2015[acceso: 30 de marzo del 2021]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3466.pdf>
3. Guyton A, Hall J. Tratado de fisiología médica. 13 ed. España: Elsevier. 2011.
4. Inzucchi S. Texto de Endocrinología. 12º ed. Philadelphia: Elsevier 2010 .pp: 87-96.
5. Avello M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección 2010 [acceso: 11/01/2018]. Disponible en : https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0718-04622006000200010&lng=es&nrm=iso
6. Baynes J. Bioquímica Médica. 2º ed. España: Elsevier. 2007 .pp:278-285.
7. Malanco H. Inflamación y resistencia a la insulina: Mecanismos para el desarrollo de la disfunción endotelial y aterosclerosis. 2º ed. México: Elsevier .2010. pp: 71-82.
8. Guzmán J. Documento de posición de asociación latinoamericana de diabetes [acceso: 10/06/2020]. Disponible en: <http://alad-americalatina.org/wp-content/uploads/2016/10/PREDIABETES.pdf>
9. Infantes A. Guía de Práctica Clínica sobre Diabetes en el SNS. Madrid. 2010. [acceso: 10/01/2021]. Disponible en: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/prevention/diabetes-risk-test>
10. Villarreal R. Hormonas reguladoras de energía metabólica. Variables Findrisk. Rev. Clínica Médica Familiar. 2010 [acceso: 12/01/2021]; 6. Disponible en: <http://www.fundaciondiabetes.org/findrisk/FactoresRiesgo.asp>

11. Ramos H, Méndez J. Diabetes mellitus Experimental. Ciencia Veterinaria.1994. [acceso: 04/04/2021]; 6. Disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol6/CVv6c12.pdf>
12. Paulina M. Desarrollo de micro-albumina en la diabetes experimental Inducida por estreptozotocina. 2012. [acceso: 11/01/2021]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fcr173d/doc/fcr173d.pdf>
13. Halim E. Lowering of blood sugar by water extract of Azadirachta indica and Abroma augusta in diabetes rats. J Exp Biol. 2004 [acceso: 3/08/2020];41(6):636-40. Disponible: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15266913>
14. Lecca N. Efecto hipoglucemiante del extracto acuoso liofilizado de Abutas rufescens A. en ratas con diabetes mellitus inducidas con estreptozotocina. ESSALUD. 2004 [acceso: 31/03/2021]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/54210806.pdf>
15. Omina M. Molecular and Biochemical Effect of Neem Extract On Experimental Diabetes STZ .Rev. Española.2012. [acceso: 04/04/2021];7(7) : 23-35. Disponible en: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jac/papers/vol7-issue7/Version-2/E07722429.pdf>
16. Salomón A. Manual de bioquímica. Editorial de la Universidad nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Trujillo. Perú. 2018.
17. Álvarez R. Estadística aplicada a las Ciencias de Salud. España: Díaz de Santos. 2007.
18. Principios éticos de la investigación con animales. CCPA, Manual 2º edición .1998 [acceso: 04/04/2021]. Disponible en: <http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Spanish/ANEX15A.pdf>
19. Khosla P. A study of hypoglycemic effect of Azairachta indica in normal and alloxan diabetic rabbits. Indian J Pharmacol. 2000. [acceso: 04/04/2021];4(1):69-74. Disponible en: http://ijpp.com/IJPP%20archives/2000_44_1/69-74.pdf
20. Mostofa L. la eficacia comparativa del extracto de Neem y clorhidrato de metformina con respecto a su actividad hipoglucémica en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ). Rev. Española. 2004 [acceso: 04/04/2021];15(2). Disponible en la web: <https://www.banglajol.info/index.php/BJVM/article/view/8353/6190>
21. Quintanilla G. El efecto incretina y su participación en la diabetes mellitus tipo 2. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 1998 [acceso: 04/04/2021];48(5). Disponible en la web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2010/im105h.pdf>

22. Gritsanapan W. Free Radical Scavenging Activity and Total Flavonoid Content of Siamese Neem Tree Leaf Aqueous Extract from Different Locations. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy. Rev. Española [en línea]. 2005 [acceso: 04/04/2021];32(1):23-24. Disponible: https://www.researchgate.net/publication/267549366_Free_Radical_Scavenging_Activity_and_Total_Flavonoid_Content_of_Siamese_Neem_Tree_Leaf_Aqueous_Extract_from_Different_Locations
23. Liu I. Myricetin, a naturally occurring flavonol, ameliorates insulin resistance induced by a high-fructose diet in rats. Life Sciences. 2007 [acceso: 04/04/2021]; 81(2). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17976658>
24. López Gomar MM. Caracterización de la fracción lipídica extractable de la semilla del árbol de neem (Azadirachtin Indica A. Juss) obtenida a nivel laboratorio por lixiviación. [Tesis]. Universidad San Carlos de Guatemala; 2012
25. Sánchez H, Reyes C. Metodología y diseños en la investigación científica. Lima. Perú. 1988. Editorial Mantaro. p 14 – 16; 77.
26. Soto V. Bases para la investigación científica y tesis universitaria. Colegio Médico del Perú. CR VIII. 1989. Chiclayo. Perú. p. 25.
27. Falcón P, Zabaleta V. Metodología de la investigación científica. CEPEUNT. Universidad Nacional de Trujillo. 1978. Trujillo. Perú. pp 40 – 79.
28. Manson W, Lott D. Ethology and comparative psychology. Annual Review of Psychology. 1987 [acceso: 04/04/2021]; 27:129-154. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/805/80519205.pdf>
29. Redollar D, Ferran B, Cristina M, Roser N, Jordi S. Farmacología y Endocrinología del comportamiento. Editorial UOC. Barcelona. España. 2012. pp 193 – 19.
30. Ley 30407 “Ley de protección y bienestar animal”. El Peruano. Normas legales. Disponible en: <https://busquedas.elperuano.pe/normaslegales/ley-de-proteccion-y-bienestar-animal-ley-n-30407-1331474-1/>

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Contribuciones de los autores

Juan Luis Rodríguez Vega: conceptualización, análisis formal, metodología.

Richard Fredy García Ishimine: análisis formal, curaduría de datos, metodología.

Davis Alberto Mejía Pinedo: metodología, revisión.

Miryam Griselda Lora Loza: metodología, revisión.

Wilmer Leoncio Calderón Mundaca: investigación, metodología.

Financiamiento

El presente trabajo fue autofinanciado por los autores.