



Evaluación *in vivo* e *in vitro* de parámetros toxicológicos de la cloroquina y el extracto acuoso de *Azadirachta indica* A. Juss

In vivo and *in vitro* evaluation of toxicological parameters of chloroquine and the aqueous extract of *Azadirachta indica* A. Juss

MARÍA E ACOSTA^{*1}, NEIRA GAMBOA DE DOMÍNGUEZ^{**2}, MARÍA A OSUNA^{**3}

Resumen

El uso de combinaciones de fármacos con plantas medicinales es recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas la malaria, por sus efectos terapéuticos. En virtud de tal contexto, en este trabajo, se propone evaluar los parámetros toxicológicos de las combinaciones de Cloroquina (CQ), quinolina usada ampliamente para el tratamiento de la malaria y otras patologías con el extracto acuoso de la hoja de la planta *Azadirachta indica* A. Juss, conocida popularmente como Neem (EAN), tanto en estudios *in vivo*, utilizando ratones sanos, como en ensayos *in vitro* usando células Vero, una línea celular continua de mamíferos, derivada del riñón del mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*), con la finalidad de determinar los efectos tóxicos intrínsecos de estos compuestos evaluados solos o combinados. Para ello, se estudiaron los parámetros toxicológicos de los tratamientos con CQ, EAN o combinaciones de CQ+EAN en ratones, a las siguientes concentraciones: CQ20mg/Kg (CQ20); EAN10mg/Kg (EAN10); EAN20mg/Kg (EAN20); CQ20mg/Kg+EAN10mg/Kg (CQ20+EAN10) y CQ20mg/Kg+EAN20mg/Kg (CQ20+EAN20). Los resultados demostraron que el EAN revierte el aumento de los niveles de las enzimas marcadoras de daño hepático (ALT, AST y GGT) producido por la CQ. Aunado a este efecto, el EAN revierte la disminución del porcentaje de viabilidad celular generado por la CQ en las células Vero a concentraciones de 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y disminuye el porcentaje de hemólisis inducido por la CQ. Esto sugiere que el EAN es hepatoprotector, hemoprotector y nefroprotector, por lo que se podría ser utilizada como coadyuvante para reducir la toxicidad generada por el tratamiento con CQ.

Palabras clave: Cloroquina, Extracto acuoso, *Azadirachta indica* A. Juss, Neem, Parámetros Toxicológicos

Abstract

Due to their therapeutic effects, the use of combinations of drugs with medicinal plants is recommended by the World Health Organization (WHO) for the treatment of various diseases, such as malaria. In this context, in this work, it is proposed to evaluate the toxicological parameters of the combinations of Chloroquine (CQ), quinoline widely used for the treatment of malaria and other pathologies, with the aqueous extract of the leaf of the plant *Azadirachta indica* A. Juss, popularly known as Neem (EAN), both *in vivo* studies using healthy mice, and *in vitro* assays, using Vero cells, a continuous mammalian cell line, derived from the kidney of the African green monkey (*Chlorocebus aethiops*), to determine the intrinsic toxic effects of these compounds evaluated alone or in combination. To this end, the toxicological parameters of CQ, EAN and the combinations of CQ+EAN in mice were studied, at the following concentrations: CQ20mg/Kg (CQ20); EAN10mg/kg (EAN10); EAN20mg/kg (EAN20); CQ20mg/Kg+EAN10mg/Kg (CQ20+EAN10) and CQ20mg/Kg+EAN20mg/Kg (CQ20+EAN20). The results demonstrated that EAN restores the increased levels of liver damage marker enzymes (ALT, AST and GGT) produced by CQ. In addition to this effect, EAN reversed the decrease in the percentage of cell viability generated by CQ in Vero cells at concentrations of 0.01; 0.1; 1; 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and decreased the percentage of hemolysis of CQ. This suggests that the EAN is hepatoprotective, hemoprotective, and nephroprotective; therefore, it could be used as an adjuvant to reduce the toxicity generated by treatment with CQ.

Keywords: Chloroquine, Aqueous extract, *Azadirachta indica* A. Juss, Neem, Toxicological parameters

*Unidad de Bioquímica. Facultad de Farmacia. UCV; **Escuela José María Vargas Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela, Caracas. Venezuela. Correspondencia: mariuacosta0103@gmail.com

Orcid: [0000-0003-0721-0046](https://orcid.org/0000-0003-0721-0046)

²[0000-0002-9918-0413](https://orcid.org/0000-0002-9918-0413)

³[0009-0007-7077-7658](https://orcid.org/0009-0007-7077-7658)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2025.88.1-2.8](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2025.88.1-2.8)

Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff

Recepción: 14/04/2025

Aprobación: 22/04/2025

Rev. Fac. Farmacia 88(1): 71-86. 2025

Introducción

La cloroquina (CQ) es utilizada en diversas patologías, principalmente como tratamiento de la malaria, en cuya infección descansa fundamentalmente un uso de un número limitado de fármacos; que presentan en su mayoría restricciones desde el punto de vista farmacológico, toxicológico y a los cuales el *Plasmodium* ha desarrollado resistencia (Acosta y Gamboa, 2017). Entre los fármacos más utilizados están las 4-amino-quinolinas (quinina, cloroquina (CQ), amodiaquina, tafenoquina) (Oghenesuwe y col., 2021), siendo la CQ más usada, representando el fármaco de cuyo núcleo farmacofórico se tienen referencias que datan desde hace más de dos siglos.

Existe evidencia de varios efectos adversos asociados con la CQ, incluyendo molestias gastrointestinales, reacciones alérgicas, miocardiopatía, defectos de la conducción cardíaca, neuromiototoxicidad, citopenias e hiperpigmentación cutánea.

Igualmente se ha reportado toxicidad de la CQ, en órganos blancos como cerebro, corazón, riñones, e hígado (Kumar y col., 2013), que en muchos casos es debido a su potencial oxidativo. Estos efectos, en cierta medida, nocivos para el paciente, han despertado el interés por el estudio del efecto antioxidante (u otros) de muchas sustancias naturales o sintéticas, para ser administradas en conjunto con la CQ, con la finalidad de controlar los efectos tóxicos intrínsecos del mismo, así como por la propia enfermedad.

Entre las sustancias naturales, la planta *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) posee una serie de efectos pleiotrópicos, entre los que destacan en enfermedades de la piel, úlceras gástricas y duodenales, constipación,

reumatismo, antiinflamatorios, antimalárico, hipolipemiente, anticancerígeno, antiviral, antibacteriano, antiparasitario, antifúngico, nefroprotector y hepatoprotector (Alzohairy y col., 2016; Deshpande y col., 2014, Islas y col., 2020; Sarkar y col., 2022). Los estudios *in vitro* e *in vivo* indican que los extractos acuosos, metanólicos o etanólicos de tallos, hojas o cortezas de Neem producen una disminución de los efectos tóxicos producidos por la infección malárica (Tepongning y col., 2018).

Dentro de este contexto, el trabajo de investigación que se presenta a continuación se enfocó en la evaluación de los parámetros toxicológicos de las combinaciones del extracto acuoso de las hojas de la planta *Azadirachta indica* A. Juss (EAN) con el fármaco cloroquina (CQ). La selección de EAN se basó en sus efectos antimaláricos, antimicrobianos, antioxidantes, inmunomoduladores, antipiréticos, analgésicos, antiinflamatorios, antidiabéticos, estimulador del apetito y diurético (Iwalewa y col., 1999; Sujarwo y col., 2016; Rathod y col., 2022), así como a su uso frecuente en poblaciones como tratamiento de diversas enfermedades. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el uso de plantas medicinales a nivel mundial supera dos veces al de los medicamentos convencionales, es decir, más del 40 % de la población utilizan plantas medicinales como tratamientos en la atención primaria de la salud, principalmente, en países subdesarrollados, debido a sus bajos costos; a la creencia de que su consumo es inocuo; a su accesibilidad y a que presentan menores efectos adversos (OMS, 2023; Gupta y col., 2001).

La planta *Azadirachta indica* A. Juss, es un árbol tropical de hoja perenne originario

del subcontinente indio, cultivado en varias partes del mundo, como Asia, África, América Central y América del Sur. Perteneció a la familia Meliaceae, del género *Azadirachta*, de la especie *Azadirachta indica* (Biswas y col., 2002). En algunas partes del mundo esta planta es conocida como la "Farmacia del Pueblo" (Alzohairy y col., 2016). La planta *Azadirachta indica* (NEEM) se utiliza como medicina herbaria tradicional. Estudios señalan que posee componentes terapéuticos potenciales en sus hojas, corteza, raíz y flores (Udeiya y col., 2008).

La Academia Nacional de Ciencia de los Estados Unidos (NAS) en un reporte publicado en 1992, señala al Neem como la planta utilizada para resolver problemas de salud global y diez años más tarde las Naciones Unidas la declaran como el "Árbol del siglo XXI" (NAS, 1992; UNEP, 2012). Las investigaciones químicas determinan el aislamiento de 135 componentes terapéuticos extraídos de las diferentes partes de la planta (Biswas y col., 2002).

Los compuestos derivados del Neem se han clasificado en dos clases principales: Isoprenoides y los no isoprenoides. Entre los isoprenoides se encuentran los diterpenoides y triterpenoides que contienen a su vez, limonoides, azadirona, protomeliacinas y sus derivados, vilasinina, gedunina, salanina, nimbina y azadirachtina y los esteroides. Los no isoprenoides incluyen carbohidratos (polisacáridos), proteínas, cumarinas, compuestos sulfurosos, polifenoles (β -sitosterol y la quercetina), flavonoides, dihidrochalconas, taninos, margalona, margalona e isomargalona, ácidos grasos y ésteres (Dkhil y col., 2021, Latify col., 2020; Moin y col., 2020). La concentración de fitocomponentes puede variar según el modo de cosecha, almacenamiento,

contenido de humedad, luz, temperatura y variaciones de pH (Rolim Baby y col., 2022).

En estudios realizados se pudo determinar que en los extractos acuosos se encuentran altos niveles de saponina, taninos y glucósidos. Mientras que, en los extractos metanólicos hay un aumento de alcaloides, taninos y flavonoides (Dash y col., 2017). El compuesto Azadiradiona que presenta propiedades antiinflamatorias muestra también su potencial citotóxico al servir como modulador del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF), que es una citocina proinflamatoria que se une a su receptor CD74 en la superficie de las células y activa vías de señalización que influyen en la inflamación, la respuesta inmune y la función celular. El MIF puede inhibir la migración de macrófagos y, a su vez, promover la infiltración y proliferación de estos en los sitios de inflamación. El MIF es responsable del desarrollo de las reacciones proinflamatorias de varias enfermedades, inhibiendo su actividad tautomérica y la capacidad de NF κ B para translocar, impidiendo la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Alam y col., 2012).

Al proporcionar datos adicionales convincentes para la investigación de productos de Neem como terapéuticos, Somsak y col. (2015) utilizaron el modelo de ratón de infección por *Plasmodium* para demostrar que un extracto acuoso de hoja de Neem puede reducir los marcadores sanguíneos relacionados a una lesión renal inducida por malaria a niveles normales sin ser tóxico para los animales. En conjunto, los datos disponibles *in vitro* e *in vivo* sugieren que las plantas utilizadas en la medicina tradicional (por ejemplo, Neem) deberían explorarse más a fondo en ensayos clínicos.

En este trabajo se seleccionó la CQ, por ser el *gold standard* tanto para el tratamiento de la malaria, como para las enfermedades autoinmunes. Su uso combinado con el EAN podría reducir la toxicidad inducida tanto por la malaria *per se*, como por la utilización de CQ como tratamiento antimalárico.

El uso de la CQ en malaria data de más de 60 años y ejerce su acción en la vacuola digestiva inhibiendo la formación de la hemozoína en los estadios eritrocíticos de anillo y trofozoítos. La CQ entra en la vacuola digestiva del parásito por difusión simple, pero el pH ácido de la vacuola (pH ~ 5,2) conduce a su diprotonación, lo que impide su salida por difusión a través de la membrana. La CQ diprotonada atrapada en el interior de la vacuola inhibe la transformación del hemo (Ferroprotoporfirina IX, FP IX) en hemozoína (Acosta y Gamboa, 2017). Esto conlleva a la acumulación del hemo dentro de la vacuola digestiva generando la muerte del parásito. Las quinolinas incrementan el grupo hemo e induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el eritrocito, lo que induce la peroxidación lipídica y la hemólisis. Por su parte, la artemisinina induce la producción de hemo libre y ERO que origina una rápida despolarización del potencial de membrana y la destrucción e inhibición de la mitocondria del parásito (Pereira y col., 2020).

En la presente investigación se plantea la evaluación de la combinación del antimalárico CQ con el EAN, ampliamente usado para diversas enfermedades y con una amplia variedad de efectos pleiotrópicos. Siempre es de gran interés estudiar el extracto acuoso de hojas, por ser lo más parecido al consumo de infusiones que son preparados con aplicación de calor por la

población, donde se extraen los principios activos más polares y por ende, los tóxicos que presente, necesarios para el estudio farmacológico y toxicológico.

El objetivo principal de este trabajo se fundamentó en la posibilidad de evaluar los parámetros toxicológicos del EAN cuando se administra solo o en combinación con la CQ. Dichos parámetros consisten en determinar las modificaciones de los niveles de enzimas marcadores de daño hepático en suero de ratones tratados con las combinaciones de CQ y EAN, determinar a DL_{50} en ratones tratados con estas combinaciones, determinar la lisis eritrocitaria de CQ con EAN y evaluar *in vitro* la viabilidad celular en células Vero tratadas con las combinaciones de CQ con EAN.

Materiales y Métodos

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones macho de la cepa INH, con pesos comprendidos entre 18-20 g, provenientes del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (MPPS, Caracas). Los animales fueron mantenidos en cajas plexiglás en ciclos de 12 horas luz / oscuridad, con agua y alimento (Ratarina[®]) *ad libitum*. La investigación cumplió con las normas de bioética contenidas en la Guía "*Principles of laboratory animal care*" (Principios de cuidados de animales de laboratorio) (Anónimo, 1985).

Se utilizaron reactivos de alta calidad analítica, obtenidos localmente o de SIGMA-Aldrich Chemical Co y STANBIO Laboratory. La Cloroquina (CQ) fue adquirida de la casa comercial SIGMA-Aldrich Chemical Co., Lote 109H1097. La dosis de CQ se seleccionó en base a un estudio *in vivo* en

ratones (Acosta y col., 2022), en el cual la CQ posee efectos antimaláricos a la dosis terapéutica de 20 mg/Kg de peso corporal, por vía i.p.

RECOLECCIÓN DE PLANTAS NEEM Y LIOFILIZADO DE LA HOJA DE *AZADIRACHTA INDICA* A. JUSS

Las muestras de las plantas *Azadirachta indica* A. Juss "NEEM" fueron recolectadas en la comunidad Provincial, localidad de Puerto Ayacucho, estado Amazonas. Un espécimen testigo reposa en el Herbario Víctor Manuel Ovalles, de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Central de Venezuela, bajo el número MYF 29534.

Las hojas frescas (30 g) fueron cortadas en trozos pequeños y sometidas a decocción en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, utilizando 50 mL de agua destilada, durante 15 minutos. La solución fue filtrada, enfriada y sometida a un proceso de liofilización para obtener un sólido marrón claro (95 g) que fue reconstituido en agua destilada al momento del experimento. Este extracto fue denominado extracto acuoso de *Azadirachta indica* A. Juss (EAN).

La dosis del EAN se seleccionó en base a la determinación de la DL_{50} calculada por el Método Spermar-Karber (Hamilton, 1978) por vía i.p., resultando la misma en 45,32 mg/Kg en ratones. Se seleccionaron las dosis de 10 y 20 mg/Kg porque está por debajo de la DL_{50} calculada y porque coincide con estudios *in vivo* en ratones a esas dosis por vía i.p (Akin-Osanaiyay col., 2013). Se utilizó CQ a 20mg/Kg; EAN a 10 y 20mg/Kg, que se prepararon diluyendo apropiadamente al 2% en solución NaCl 0,9%. Ambos compuestos fueron administrados a los animales por vía i.p. de forma separada.

Los grupos experimentales fueron;

1. Grupo control sano: Animales sanos que recibieron 0,1 mL de solución fisiológica (NaCl 0,9%) por vía i.p, durante 5 días.
2. Grupos sanos con tratamiento.

Los tratamientos administrados a los ratones fueron los siguientes:

No.	Sub-GRUPO	TRATAMIENTO (i.p / día)
1	CQ20	CQ 20 mg/Kg
2	EAN 20	EAN 20 mg/Kg
3	EAN 10	EAN 10 mg/Kg
4	CQ20 + EAN 20	CQ 20 mg/Kg + EAN 20mg/Kg
5	CQ 20 + EAN 10	CQ 20 mg/Kg + EAN 10 mg/Kg

Cada ratón fue tratado con 0,1 mL del tratamiento indicado, una vez al día, durante 5 días consecutivos. En el día 5° de tratamiento, se tomaron al azar 5 ratones de cada uno de los grupos experimentales establecidos, fueron anestesiados con éter. Posteriormente, se realizó un corte a nivel braquial. Una vez separada la piel, se expuso la vena braquial, y se le practicó una incisión con tijeras. La sangre expelida se recolectó por aspiración con pipetas plexiglás y se colocó en tubos Eppendorf. Una vez formado el coágulo, los tubos se centrifugaron a 700 rpm por 10 minutos, en una microcentrífuga y el suero obtenido fue separado y almacenado en otro tubo Eppendorf, hasta la realización de la determinación de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y la gamma-glutamyl transferasa (GGT).

Parámetros Toxicológicos

DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE HEPATOTOXICIDAD Y CITOTOXICIDAD EN SUERO

Como medida de la hepatotoxicidad se determinó en suero la actividad de algunas isoenzimas marcadoras específicas hepáticas como la Aspartato aminotransferasa (AST) y la Alanina aminotransferasa (ALT). Se determinó la lactato deshidrogenasa (LDH) y la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) como marcadores de citotoxicidad.

ALANINA AMINOTRANSFERASA (ALT/ SGPT)

La alanina aminotransferasa cataliza la transaminación reversible de un grupo amino de la L-alanina al α -cetoglutarato con formación de piruvato y L-glutamato. Para esta determinación se utilizó el método descrito por Wroblewski y La Due (1956), empleando un kit comercial de STANBIO Laboratory. Brevemente, 1 mL de la mezcla de reacción (67 mM Tris pH 7,5, 200 mM L-alanina, 0,5 U LDH, 10 mM α -cetoglutarato y 0,15 mM NADH (sal disódica) fue incubada durante 3 minutos a 37°C, se le agregó 0,1 mL de suero (muestra problema). El cambio de absorbancia se registró a intervalos de 1 minuto, durante 3 minutos, en un espectrofotómetro (STAT FAX) a 340 nm.

ASPARTATO AMINOTRANSFERASA (AST/ SGOT)

La aspartato aminotransferasa (AST o GOT) cataliza la transaminación reversible del grupo amino entre el aspartato y el α -cetoglutarato, produciendo oxaloacetato y glutamato. Para esta determinación se utilizó método descrito por Wroblewski y La Due (1956), empleando un kit comercial de STANBIO Laboratory. Brevemente, 1 mL

de la mezcla de reacción (67 mM Tris pH 7,5, 200 mM L-aspartato, 0,5 U MDH, 10 mM α -cetoglutarato y 0,15 mM NADH (sal disódica), fue incubada durante 3 minutos a 37°C, se le agregó 0,1 mL de suero (muestra problema). El cambio de absorbancia se registró a intervalos de 1 minuto, durante 3 minutos, en un espectrofotómetro (STAT FAX) a 405 nm.

DETERMINACIÓN DE LA γ -GLUTAMIL TRANSFERASA (GGT)

Se emplea el método descrito por Tietz de 1976 (Rogić, 2008), adaptado a microplacas, que se fundamenta en la capacidad de la GGT presente en la muestra de catalizar la transferencia de un grupo gamma-glutamil desde el sustrato incoloro gamma-glutamil-p-nitroanilina, al aceptor, glicilglicina. La concentración del producto coloreado formado, p-nitroanilina, se cuantifica espectrofotométricamente a 405 nm. Para esta determinación se utilizó el kit comercial de STANBIO Laboratory. Brevemente, 200 μ L de la mezcla de reacción (0,032 mM L- γ -glutamil-3 carboxi-4 nitroanilina, 4 mM Tris pH 8,5 y 4 mM glicilglicina), fue incubada durante 3 minutos a 37°C, luego se le agregó 20 μ L de suero (muestra problema). El cambio de absorbancia registró a intervalos de 1 minuto durante 3 minutos, en un lector de placas, a 405 nm.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL CINCUENTA (DL_{50}) Y SINTOMATOLOGÍA

La Dosis Letal 50 (DL_{50}) o LD_{50} (Lethal Dose 50) es una medida de toxicidad aguda que indica la cantidad de una sustancia que, al ser administrada de una sola vez, causa la muerte al 50% de un grupo de

animales de prueba. En otras palabras, es la dosis que produce la muerte en la mitad de los individuos de un grupo experimental animales ensayados. La DL_{50} se determinó mediante el método de Spermar – Karber (Hamilton y col., 1978), inyectando por vía i.p un volumen de 0,1 mL diluciones seriadas de CQ con EAN: CQ (1600, 800, 400, 200 y 100 mg/Kg) EAN (600, 300, 200, 100 y 50 mg/Kg); y CQ/EAN (1600/600; 800/300; 400/200; 200/100 y 100/50 mg/Kg) en ratones macho de peso entre 18-20g. Se emplearon 4 ratones por dosis para un total de cinco dosis a ensayar, los animales se observaron por un período de 48 horas, anotando los signos clínicos observados durante 90 minutos (Campbell y Ritcher, 1967). Los animales de grupo control fueron inyectados con solución fisiológica (NaCl 0,9%).

Determinación *in vitro* de la viabilidad celular en células Vero tratadas con las combinaciones de CQ con EAN

LÍNEAS CELULARES

Para los experimentos *in vitro* fueron empleadas las células Vero en cultivo, una línea celular de epitelio renal de mono verde africano (*Chlorocebus aethiops*), que fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Las células se cultivaron hasta confluencia en condiciones de 5% de CO_2 a 37 °C en medio completo que contiene: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), 10% de suero fetal de bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. Luego se lavaron 2 veces con PBS (buffer salino-fosfato) y se lisaron con tripsina 0,025 M en EDTA dejando incubar a 37°C por 5 minutos para luego centrifugar por 10 minutos a 2200 rpm. El sedimento se trató con solución salina

tamponada con fosfato (PBS) para formar una suspensión de células, la cual se utilizó para realizar los ensayos correspondientes. Para ello, se incubaron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con medio completo (5% CO_2 a 37°C), bajo un ambiente de 8 mM de glucosa durante 24 horas. El medio se removió y se reemplazó por medio completo fresco con el siguiente esquema de tratamientos: pozos controles, CQ y EAN solos o combinados a concentraciones de 0,01; 0,1; 1; 10 y 100 $\mu g/mL$. Bajo estas condiciones las células se cultivaron (5% CO_2 a 37°C) durante 96 horas, reemplazando con medio nuevo sobre el mismo esquema cada 24 horas. Al término de este tiempo el medio fue nuevamente reemplazado, pero solo con medio completo. Se preparó una solución de bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (2,5 mg/mL) y se añadió 100 μL de ésta a cada pozo de la placa. Las placas se incubaron por 3h (5% de CO_2 a 37°C). Posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada pozo y la monocapa fue disuelta con la incorporación de 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). La placa se dejó reposar por 30 minutos para que se desarrollara el color del MTT-formazan formado y luego se leyó a 570 nm en un espectrofotómetro de placa (BioRad, modelo Berchmark). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad con respecto al control.

El MTT es un ensayo basado en el metabolismo celular y la habilidad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial es convertir el compuesto amarillo del MTT en un compuesto azul denominado formazán. La cantidad de azul formazán formado es proporcional al número de células metabólicamente activas (vivas) (Mosman, 1983).

ENSAYO DE LISIS ERITROCITARIA

Se evaluó la capacidad de la CQ y EAN, solos o combinados de inducir lisis de glóbulos rojos como marcador de toxicidad sanguínea (Mehta y col., 1984). La lisis de los eritrocitos por extractos de plantas o compuestos se considera un protocolo estándar para evaluar la toxicidad *in vitro* de nuevas sustancias y se determina por medio de la medición de la hemoglobina liberada a 550nm. Brevemente, la muestra de sangre de ratón heparinizada se centrifugó a 800 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el paquete eritrocitario se lavó tres veces con solución salina (800 rpm por 5 minutos), finalmente se obtuvo una suspensión de glóbulos rojos al 100%. A partir de esta suspensión se tomó una suspensión de eritrocitos (2%) y se incubó a las concentraciones de los compuestos a ensayar (0,1, 1 y 10mM) a 37°C por 45 minutos.

La liberación de la hemoglobina por lisis hipotónica de un número igual de glóbulos rojos con 20% de agua se tomó como 100% control positivo de lisis mientras que los glóbulos rojos tratados con solución salina sirvieron como control negativo. Los resultados fueron expresados como porcentaje de hemólisis de cada concentración de los compuestos ensayados.

La actividad hemolítica fue evaluada utilizando los siguientes rangos: 0%-9% = No tóxico; 10 % - 49%= levemente tóxico; 50 - 89%= Tóxico y 90 % a 100%= altamente tóxico.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (E.E.M), y analizados mediante

la Prueba t de *Student* de datos no apareada, seguida de un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas para un valor de $p \leq 0,05$. Los datos fueron analizados y graficados mediante el programa GraphPad Prism versión 9.0 y el programa Excel 2010.

Resultados

Parámetros Toxicológicos

DETERMINACIÓN DE AST, ALT y GGT

Para evaluar los efectos hepatotóxicos de los diferentes tratamientos incluidos en nuestro diseño experimental y especialmente el efecto de las combinaciones de CQ con EAN evaluamos los niveles de las enzimas marcadoras de daño hepático (AST, ALT y GGT) en el suero de los animales tratados. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla I.

La Tabla I muestra que la CQ20 produce un incremento significativo de los niveles de AST, ALT y GGT sérico, por lo que es evidente la afectación del tejido hepático durante el tratamiento con este fármaco. EAN solo no alteró los niveles de las enzimas evaluadas. Sin embargo, al combinarla con CQ en las combinaciones de CQ20+ EAN10 y CQ20 +EAN20, redujo los niveles de ALT, AST y GGT en ratones tratados, si se compara con los niveles observados inducidos por la CQ20.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD POR EL MÉTODO MTT

Los sistemas *in vitro*, tanto de células animales como vegetales, son descritos como cultivos primarios o cultivos de líneas celulares, representan una herramienta de

Tabla I.
Niveles de ALT, AST y GGT sérica de ratones sanos tratados con las combinaciones de CQ con EAN

Tratamientos	ALT (U/l) ± E.E.M.	AST (U/l) ± E.E.M.	GGT(U/l) ± E.E.M.
Control Sano	103,50 ± 0,43	40,10 ± 0,23	78,97 ± 0,25
CQ20	182,14 ± 0,15**	77,40 ± 0,69**	130,44 ± 1,15**
EAN10	108,40 ± 0,23	38,15 ± 0,23	79,40 ± 0,35
EAN20	118,20 ± 0,13	42,15 ± 0,65	82,35 ± 0,76
CQ20+EAN10	143 ± 0,32**	43,40 ± 0,15**	114,50 ± 0,55**
CQ20+EAN20	154 ± 0,15**	54,30 ± 0,28**	117,43 ± 0,10**

Los resultados se expresan como la media ± E.E.M, **p<0,05, ***p<0,001 comparado con el control sano. CQ20=Cloroquina20 mg/Kg, EAN20=Extracto acuoso Neem 20mg/Kg, EAN10=Extracto acuoso Neem 10mg/Kg

estudio de diversos mecanismos celulares y la acción de distintos xenobióticos sobre su función, en un período corto. Además, es justificado su uso por el creciente interés de la comunidad científica en reducir el uso de animales de experimentación.

En este estudio se determinó la citotoxicidad de la CQ combinada con EAN. Los resultados sugieren que todos los compuestos produjeron una reducción de la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración, especialmente la CQ (Figura 1).

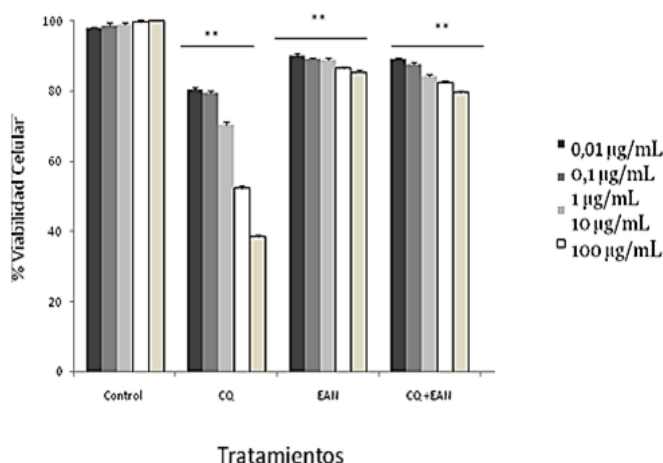


Figura 1. Efectos de las diferentes concentraciones de CQ, EAN y CQ+EAN sobre la viabilidad celular en células Vero. Los resultados expresan el porcentaje promedio ± E.E.M, **p<0,05 comparado con el control

Cuando se trató con la CQ en forma combinada con EAN (100µg/mL) se observa una tendencia del EAN a revertir el efecto tóxico de la CQ (Figura 1). De igual forma los valores obtenidos de CT₅₀ para la combinación indican que los mismos se incrementan, sugiriendo una reducción de la toxicidad intrínseca de los compuestos (Tabla II).

Los resultados sugieren que las células Vero son susceptibles a estos compuestos, particularmente la CQ a concentraciones de 10 y 100 µg/mL y sus combinaciones, con respecto al control p<0,05 (Figura 1). Sin embargo, EAN tiende a revertir la citotoxicidad generada por la CQ.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL₅₀) Y SINTOMATOLOGÍA

En la Tabla III se muestran los resultados obtenidos después del ensayo de la determinación de la DL₅₀ en el que se inyectó a ratones macho con peso entre 18-20g, por vía i.p un volumen de 0,1 mL diluciones seriadas de CQ: CQ (1600, 800, 400, 200 y 100 mg/Kg); EAN (400, 200, 100, 50 y 20 mg/Kg) y CQ/EAN (1600/400; 800/200; 400/100; 200/50 y 100/20 mg/

Tabla II.

Citotoxicidad cincuenta (CT_{50}) de los compuestos CQ, EAN y la combinación CQ+EAN en células Vero

Compuestos	CT_{50}
CQ	2,43
EAN	5,60
CQ + EAN	4,15

CT_{50} determinada mediante el Programa GraphPadPrisma9.0

Tabla III.

Determinación de la dosis letal media (DL_{50})

Compuestos	DL_{50} (mg/Kg)	Referencias
EAN	390 mg/Kg i.p. (ratones) 450,32 mg/Kg (i.p.) ratones	United States patent 4515785. (Akin-Osanaiya y col., 2013) Presente ensayo
CQ	302,80 mg/Kg (i.p.) 330 mg/Kg (i.p.)	Presente ensayo Lewis R. Sax's dangerous properties of Industrial materials. 11 th 2004.
CQ/EAN	480,24 mg/Kg (i.p.)	Presente ensayo

Kg). Los animales del grupo control fueron inyectados con solución fisiológica (NaCl 0,9%). Los resultados fueron comparados con lo reportado en la literatura.

Utilizando el Método de Campbell y Ritcher (1967), el cual da prioridad a efectos neurotóxicos, se observó la siguiente sintomatología (Tablas IV y V).

Al observar la sintomatología, se puede inferir que CQ sola ejerce una acción tóxica (Tabla IV). El EAN presenta neurotoxicidad

a concentraciones mayores de 200 mg/Kg, esto coincide con la DL_{50} reportada en este ensayo que es de 450,32 mg/Kg (i.p) (Tabla III). Sin embargo, llama la atención que cuando se combinan ambos compuestos, la presencia del EAN produce la desaparición de los síntomas: midriasis, respiración acelerada, actividad exploratoria, estereotipia y sedación a concentraciones menores a 400/ 100 mg/Kg (Tabla V).

ENSAYO DE HEMÓLISIS *IN VITRO*

Para determinar el potencial hematotóxico de los compuestos se realizó el ensayo de lisis eritrocitaria *in vitro*, a tres concentraciones (0,1; 1 y 10 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 2).

Los resultados muestran que el EAN y la combinación EAN + CQ producen un porcentaje de hemólisis de 11,11 y 28,7, respectivamente, a la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, siendo estos inferiores a la actividad hemolítica de la CQ (31,17%), reflejando que el EAN disminuye la lisis eritrocitaria inducida por la CQ cuando es ensayada de forma individual.

Cabe destacar que todos los compuestos ensayados solos o combinados producen un porcentaje de hemólisis menor a 50%, lo que indica que todos los compuestos producen una lisis eritrocitaria discreta.

Discusión

Las terapias combinadas consisten en mejorar el efecto terapéutico y restablecer las alteraciones producidas por el uso de fármacos, como una estrategia de combinar diferentes tratamientos para lograr mejores

Tabla IV.
Sintomatología observada en ratones de la cepa INH tratados con CQ y EAN

Sintomatologías	Dosis (i.p.)								
	CQ (mg/Kg)					EAN (mg/Kg)			
	1600	800	400	200	100	400	200	100	50
Movilidad Reducida	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Piloerección	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Midriasis	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Respiración acelerada	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Actividad Exploratoria	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Estereotipia	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Incoordinación motora	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Parálisis espática	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Ptosisparpebral	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Sedación	+	+	+	-	-	+	+	-	-

(+) Presente; (-) ausente

Tabla V.
Sintomatología observada en ratones de cepa INH tratados con las combinaciones de CQ con EAN

Sintomatologías	Dosis (i.p.)				
	CQ / EAN (mg/Kg)				
	1600/400	800/200	400/100	200/50	100/20
Movilidad Reducida	+	+	+	-	-
Piloerección	+	+	+	-	-
Midriasis	+	+	-	-	-
Respiración acelerada	+	+	+	-	-
Actividad Exploratoria	+	+	+	-	-
Estereotipia	+	+	+	-	-
Incoordinación motora	+	+	-	-	-
Parálisis espática	+	+	-	-	-
Ptosisparpebral	+	+	-	-	-
Sedación	+	+	-	-	-

(+) Presente; (-) ausente

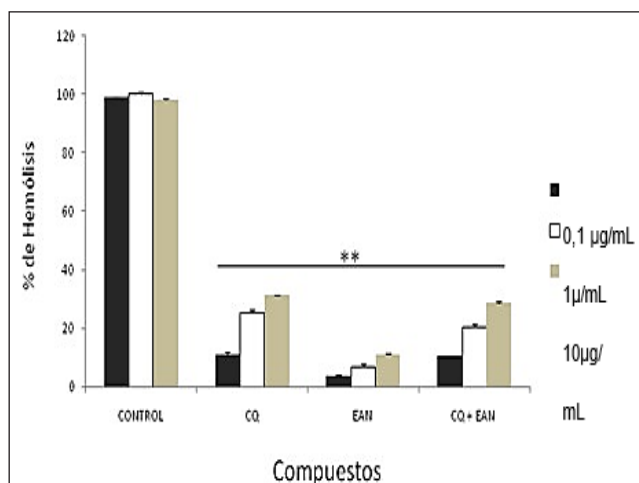


Figura 2. Porcentaje de hemólisis a diferentes concentraciones de CQ, EAN y CQ+EAN. CQ=Cloroquina; EAN=Extracto Acuoso Neem. Los resultados expresan el porcentaje promedio \pm E.E.M, $p < 0,05$ comparado con el control

resultados y compensar los efectos secundarios de los medicamentos. En otras palabras, las terapias combinadas buscan optimizar la eficacia de un tratamiento al complementar o reforzar la acción de un fármaco con otros abordajes, y al mismo tiempo, mitigar o revertir las alteraciones que el uso de fármacos puede generar en el organismo. En el presente estudio se evaluó el efecto tóxico o adverso del tratamiento con CQ en ratones y la combinación con EAN.

Con el fin de evaluar los posibles efectos hepatotóxicos, hemotóxicos y nefrotóxicos, se estudió el uso del extracto acuoso de *Azadirachta indica* A. Juss (EAN) como coadyuvante para reducir la toxicidad generada por el tratamiento con CQ, mediante la determinación de marcadores específicos de toxicidad. Como marcadoras de daño hepático se determinó las enzimas (ALT; AST y GGT).

Nuestros hallazgos muestran que la CQ20 ocasiona elevación de las transaminasas y GGT en ratones. Sin embargo, los

compuestos solos y/o combinados produjeron disminución de estos niveles, principalmente, las combinaciones CQ20+EAN20 y CQ10+EAN10 en los ratones, durante 5 días de tratamiento, restaurando las anomalías bioquímicas presentadas. Estos resultados están en línea con lo reportado sobre la reducción de parámetros renales como urea, creatinina y ácido úrico, estableciendo de esta manera una integridad hepato-renal (Anigboro, 2018; Adetutu y col., 2016). Adicionalmente, el EAN actúa tanto como hepatoprotector al disminuir los niveles de ALT, AST, fosfatasa alcalina y bilirrubina, así como, hipolipemiente al disminuir el colesterol, en ratones infectados con *Plasmodium berghei*, por lo que podría ser usado como tratamiento para la hepatotoxicidad generada, además de ser utilizado como antioxidante y en enfermedades cardiovasculares (Igwenyi y col., 2017).

Al evaluar la citotoxicidad de la CQ, EAN y las combinaciones CQ+EAN, se observó que todos los compuestos presentaron una reducción del porcentaje de supervivencia celular de células Vero, de manera dependiente de la concentración. Sin embargo, cuando se trató la CQ de forma individual a una concentración de $100\mu\text{g/mL}$, se observó un aumento de la citotoxicidad, condición que mejoró cuando se combinó esta dosis de CQ con EAN a $100\mu\text{g/mL}$, aumentando el porcentaje de supervivencia celular, lo que sugiere que el EAN revierte el efecto citotóxico de la CQ. La CT_{50} evaluadas, se incrementan con las combinaciones, indicando que el EAN reduce la toxicidad intrínseca de la CQ. Efectos similares se reportan en estudios realizados en células de cáncer de pulmón (A549) y en células Vero tratadas con extracto etanólico y acuoso de hojas de la planta Neem a $500\mu\text{g/mL}$,

respectivamente, a través de MTT (Azhagu, 2021; Sanpinit y col., 2023). Esto sugiere que el EAN actúa como anticancerígeno en cáncer de próstata, de mama y de colon (Ibrahim y col., 2022) y como un promisorio nefroprotector (Gupta y col., 2019).

Otro ensayo utilizado como parámetro toxicológico es el ensayo hemolítico, el cual es fácil de realizar (Crupi y col., 2019). Los eritrocitos son las principales células en circulación y se encargan de transportar oxígeno; de hecho, cualquier alteración de este proceso podría ser letal. La membrana plasmática de los glóbulos rojos es una estructura multicomponente que confiere a estas células su forma bicóncava característica, su alta flexibilidad, elasticidad y deformabilidad. Sin embargo, existen claros signos de sufrimiento celular si se produce alguna alteración en esta estructura. Las pruebas de citotoxicidad *in vitro*, realizadas en glóbulos rojos, se utilizan con frecuencia para detectar y determinar la toxicidad de diversos xenobióticos y compuestos. Por lo tanto, los eritrocitos podrían servir como célula modelo para estudiar los mecanismos celulares y moleculares de muchos tratamientos (Pagano y col., 2015).

Los investigadores se centran en estas células debido a tres aspectos importantes: 1) Las propiedades mecánicas de los glóbulos rojos gobiernan el comportamiento reológico macroscópico de la sangre humana; 2) Determinadas enfermedades se asocian con cambios esenciales en las características mecánicas de las células y 3) La hemólisis, que se caracteriza por daño celular y fuga de hemoglobina debido a factores externos que incluyen carga mecánica, cambios en el equilibrio ácido/base y presión osmótica a xenobióticos, siendo un factor limitante para una terapia

farmacológica exitosa. La facilidad con la que se pueden aislar y manipular los glóbulos rojos hace que estas células sean un buen modelo para muchos ensayos y propósitos biológicos (Podsiedlik y col., 2020). Además, la membrana de los eritrocitos se considera un valioso modelo de membrana biológica porque contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados. Aunado a que la presencia de hemoglobina y numerosos sistemas antioxidantes los convierte en un estándar adecuado para probar las condiciones de estrés oxidativo inducidas por xenobióticos (Pagano y col., 2015).

Al respecto, nuestros hallazgos indican que todos los tratamientos ensayados producen un porcentaje de hemólisis menor a 50%, especialmente, las combinaciones de CQ+EAN, sugiriendo que el EAN disminuye la hemotoxicidad discreta ocasionada por la CQ (31,17%). Esto concuerda con lo reportado en la literatura (Acosta y col., 2022). El porcentaje de hemólisis de las combinaciones estudiadas no han sido reportadas hasta el presente. Por lo tanto, estos datos representan un parámetro de toxicidad relevante.

En relación con la determinación de la DL_{50} de los compuestos ensayados vía i.p., se obtuvo los siguientes valores: CQ= 302,80mg/Kg; EAN = 450,32 mg/Kg y CQ + EAN= 480,24 mg/Kg. La CQ mostró una DL_{50} similar a la reportada en la literatura (Lewis, 2004.) y la DL_{50} del EAN en este ensayo fue mayor con respecto a la declarada (Akin-Osanaiya y col., 2013). La determinación de la DL_{50} de la combinación fue superior, en efecto 480,24mg/Kg, lo que sugiere que el EAN disminuye la toxicidad intrínseca de la CQ administrada de forma individual. La DL_{50} de la combinación estudiada y la sintomatología no ha sido reportada

hasta el presente. Por lo tanto, este dato nos permite definir si los compuestos combinados presentan mayores efectos tóxicos en relación a su forma individual.

En cuanto a los síntomas presentados por los animales tratados con las dosis seriadas de CQ sola o combinada con EAN en estudio, se observó que existe una relación entre la dosis y la aparición de los diversos síntomas. Los ratones tratados con CQ a las distintas dosis ensayadas presentan síntomas comunes, desde el punto de vista neurológico, caracterizados por movilidad reducida, aumento de la actividad exploratoria y sedación. Así como también aumento de la respiración acelerada. Por su parte, el EAN, produce respiración acelerada, estereotipia y aumento de la actividad exploratoria a 200 mg/Kg, efectos que se correlacionan con el estudio de la actividad depresora del SNC por parte del EAN, además de su propiedad ansiolítica (Ucheya y col., 2011).

Los síntomas reportados que caracterizan los efectos tóxicos de las combinaciones no han sido reportados hasta el presente en la literatura. Los resultados que establecen el posible efecto protector del EAN son descriptivos observacionales, por lo que no permite realizar inferencias de acuerdo al mecanismo de toxicidad de los compuestos.

Este estudio preliminar, representa una alternativa que debe ser profundizada con la finalidad contribuir a la prolongación de la vida útil de los recursos farmacoterapéuticos disponibles, retardar la expansión de la resistencia, y/o reducir la toxicidad generada por los mismos.

Conclusiones

Los resultados obtenidos nos permiten formular las siguientes conclusiones:

1. Los tratamientos CQ20+EAN20 y CQ20 + EAN 10 mostraron tendencia a restaurar las alteraciones bioquímicas presentadas, como el aumento de los niveles de ALT, AST y GGT inducidas por CQ.
2. Los compuestos CQ y EAN solos, produjeron disminución del porcentaje de supervivencia de las células Vero, de manera concentración dependiente, siendo mayor con la CQ. Sin embargo, cuando se combina CQ con EAN, disminuyó la citotoxicidad, reflejada por un aumento de los niveles de CT_{50} obtenidos cuando se combinan, sugiriendo, que el EAN disminuye la citotoxicidad inducida por los fármacos antimaláricos.
3. El valor de la DL_{50} obtenido de la combinación de CQ con EAN aumentó en relación a las obtenidas de manera individual, lo que indica, que el EAN disminuye la toxicidad de la CQ.
4. Los compuestos CQ y EAN solos y combinados, produjeron un aumento discreto del porcentaje de hemólisis (<50%), lo que indica que no son hemotóxicos.
5. La sintomatología de los animales tratados con CQ son similares a los reportados en la literatura. Sin embargo, las combinaciones con EAN, a dosis equivalentes, mostraron desaparición de los síntomas neurológicos.

El diseño experimental utilizado en esta investigación permitió realizar un balance riesgo-beneficio de la CQ20 de forma individual combinada con EAN 20 y EAN10.

Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINTYT) por el financiamiento del Proyecto 2024PGP117.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Acosta ME, Gamboa de Domínguez N. 2017. Potenciación del efecto antimalárico de combinaciones de cloroquina y mefloquina con acetaminofeno *in vivo* y niveles de glutatión total hepático. *Revista de La Facultad de Farmacia* 80 (1 y 2): 68-82.
- Acosta ME, Gotopo L, Gamboa N, Rodrigues JR, Henriques GC, Cabrera G, Romero AH. 2022. Antimalarial activity of highly coordinative fused heterocycles targeting β -hematin crystallization. *ACS Omega* 7(9):7499-7514.
- Adetutu A, Olubukola O, Abiodun O, Taiwo B. 2016. Antiplasmodial and Hepatoprotective Potentials of Certain Traditional Antimalarial Remedies Used in Nigeria. *Nature and Science* 14(9):76-86.
- Akin-Osanaiya BC, Nok AJ, Ibrahim S, Inuwa HM, Onyike E, Amlabu E, Haruna E. 2013. Antimalarial effect of neem leaf and neem stem bark extracts on *Plasmodium berghei* infected in the pathology and treatment of malaria. *International Journal of Research in Biochemistry and Biophysics* 3(1):7-14.
- Alam A, Haldar S, Thulasiram HV, Kumar R, Goyal M, Iqbal S, Bandyopadhyay U. 2012. Novel anti-inflammatory activity of epoxy azadiradione against macrophage migration inhibitory factor: Inhibition of tautomerase and proinflammatory activities of macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Biological Chemistry* 287(29):24844-24861.
- Alzohairy M. 2016. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 7382506-06.
- Anigboro AA. 2018. Synergistic Trial Model of Four Coadministration of Medicinal Herbs on Malaria infected Mice. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 22(7):1135-1140.
- Azhagu Madhavan S. 2021. Phytochemical Analysis and Anticancer Activity of *Azadirachta indica* Ethanolic Extract against A549 human lung cancer. *Cell Line* 2766:2276.
- Biswas K, Chattopadhyay I, Banerjee RK, Bandyopadhyay U. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science* 1336-1345.
- Campbell D, Richter W. 1967. An observational method estimating toxicity and drug actions in mice applied to 68 reference drugs. *Acta Pharmacol et Toxicol* 25: 345-363.
- Crupi R, Morabito R, Remigante A, Gugliandolo E, Britti D, Cuzzocrea S, Marino A. 2019. Susceptibility of erythrocytes from different sources to xenobiotics-induced lysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 221, 68-72.
- Das SP, Dixit S, Sahoo S. 2017. Phytochemical and biochemical characterizations from leaf extracts from *Azadirachta indica*: An important medicinal plant. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 6: 323.
- Deshpande PK, Gothwal R, Pathak AK. 2014. Phytochemical analysis and evaluation of antimalarial activity of *Azadirachta indica*. *The Pharma Innovation* 3(9, Part A), 12.
- Dkhil MA, Al-Quraishy S, Al-Shaebi EM, Abdel-Gaber R, Thagfan FA, Qasem MA. 2021. Medicinal plants as a fight against murine blood-stage malaria. *Saudi Journal of Biological Sciences* 28(3):1723-1738.
- Gupta A, Ansari S, Gupta S, Narwani M, Gupta M, Singh M. 2019. Therapeutics role of Neem and its bioactive constituents in disease prevention and treatment. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(3):680-691.
- Habluetzel A, Pinto B, Tapanelli S, Nkouangang J, Saviozzi M, Chianese G, Bruschi F. 2019. Effects of *Azadirachta indica* seed kernel extracts on early erythrocytic schizogony of *Plasmodium berghei* and pro-inflammatory response in inbred mice. *Malaria Journal* 18:1-9.

- Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology* 11(7):714-719.
- Ibrahim OH, Mousa MA, Asiry KA, Alhakamy NA, Abo-Elyousr KA. 2022. *Azadirachta indica* A. juss fruit mesocarp and epicarp extracts induce antimicrobial and antiproliferative effects against prostate (PC-3), Breast (MCF-7), and colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cancer cell lines through upregulation of proapoptotic genes. *Plants* 11(15):1990.
- Iwalewa EO, Mohammed K, Omotola OO. 1999. Contributor Pharmacological Effects of *Azadirachta indica* leaf in the treatment of malaria. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine* 3:42-46.
- Islas JF, Acosta E, Zuca G, Delgado-Gallegos JL, Moreno-Treviño MG, Escalante B, Moreno-Cuevas JE. 2020. An overview of Neem (*Azadirachta indica*) and its potential impact on health. *Journal of Functional Foods* 74:104171.
- Igwenyi I, Eze A, Aja P, Elom S, Uraku A, Awoke J, Obasi NA. 2017. Cholesterol-lowering and hepatoprotective effect of fruit juice extract of *Azadirachta indica* on *Plasmodium berghei*-infected mice. *Int J Curr Microbiol App Sci* 6(9), 3367-3375.
- Kumar VS, Navaratnam V. 2013. Neem (*Azadirachta indica*): Prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3(7):505-514.
- Latif MJ, Hassan SM, Mughal SS, Aslam A, Munir M, Shabbir N, Mushtaq M, Pervez S. 2020. Therapeutic potential of *Azadirachta indica* (neem) and their active phytoconstituents against diseases prevention. *J Chem Chem Sci* 10(3):98-110.
- Rolim Baby A, Batello Freire T, Arrollo Marques G, Rijo P, Vieira Lima F, Monteiro de Carvalho JC, Rojas J, Vidal Magalhães W, Robles Velasco MV, Morocho-Jácome AL. 2022. *Azadirachta indica* (Neem) as a potential natural active for dermocosmetic and topical products: A narrative review. *Cosmetics* 9(3):58.