

Efecto Tóxico del Extracto Acuoso de *Ruta graveolens* del Norte de México sobre el Hígado de Rata Wistar

Toxic Effect of Aqueous Extract of *Ruta graveolens* from the North of Mexico on the Liver of Wistar Rat

Luis B. Serrano-Gallardo*; Adolfo Soto-Domínguez**; Pablo Ruiz-Flores*; Martha P. Nava-Hernández*; Javier Morán-Martínez***; Rubén García-Garza** & Edith F. Martínez-Pérez*

SERRANO-GALLARDO, L. B.; SOTO-DOMÍNGUEZ, A.; RUIZ-FLORES, P.; NAVA-HERNÁNDEZ, M. P.; MORÁN-MARTÍNEZ, J.; GARCÍA-GARZA, R. & MARTÍNEZ-PÉREZ, E. F. Efecto tóxico del extracto acuoso de *Ruta graveolens* del Norte de México sobre el hígado de rata wistar. *Int. J. Morphol.*, 31(3):1041-1048, 2013.

RESUMEN: A *Ruta graveolens* se le atribuyen propiedades benéficas en medicina tradicional, sin embargo se ha demostrado que también puede producir efectos adversos. A la fecha no existe evidencia que ratifique que *R. graveolens* es totalmente inofensiva, por este motivo el objetivo de este estudio fue determinar el efecto tóxico del extracto acuoso de las hojas de esta especie vegetal en hígado de rata. Se utilizaron 25 ratas Wistar y se dividieron en 5 grupos (n=5). El grupo 1 correspondió al grupo control negativo, el grupo 2 o control positivo se trató con 100 mg de dexametasona/kg/día. Los grupos 3 y 4 se trataron con 30 y 100 mg de extracto de *R. graveolens* respectivamente. Al grupo 5 se le administraron 100 mg de dexametasona/kg/día combinado con 100 mg de extracto de *R. graveolens*/kg/día. Las administraciones se realizaron vía intraperitoneal por tres días. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Las muestras de hígado se fijaron en formalina y posteriormente se incluyeron en parafina. Se obtuvieron cortes histológicos de 5 micras de grosor que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para la evaluación histológica con microscopía de luz. Los resultados demuestran por primera vez que la exposición al extracto acuoso de *R. graveolens* induce alteraciones morfológicas en el hígado de ratas Wistar. Estas alteraciones se observaron de manera leve en el grupo 3 y se incrementaron en el grupo 4. Destacó que el mayor daño se observó en el grupo 5. Se concluye que el extracto acuoso de *R. graveolens* resultó tóxico, sin embargo es necesario realizar estudios adicionales con el fin de caracterizar otros efectos toxicológicos que soporten el riesgo del uso de *R. graveolens* en medicina tradicional a largo plazo.

PALABRAS CLAVE: *Ruta graveolens*; Extracto acuoso; Toxicidad hepática; Ratas Wistar.

INTRODUCCIÓN

El uso de la medicina herbolaria está creciendo de manera progresiva como alternativa a la práctica terapéutica actual (Agbonon *et al.*, 2010). Cuando menos en alguna ocasión las plantas medicinales se han utilizado por el 70-80% de la población a nivel mundial como aditivo alimenticio o para el tratamiento de diversas enfermedades (Libman *et al.*, 2006; Shanmugan *et al.*, 2012). Las plantas se han empleado para el tratamiento de las enfermedades infecciosas bacterianas, virales, parasitarias, fúngicas, inflamatorias, espasmos entre muchos otros padecimientos. Actualmente cerca del 25% de los fármacos prescritos por los médicos, tuvieron su origen en las plantas (Alonso-Castro *et al.*, 2012).

Ruta graveolens es una planta nativa de Europa, pero actualmente se encuentra distribuida en todo el mundo (Raghav *et al.*, 2006). Es un arbusto conocido popularmente como ruda, crece aproximadamente un metro de altura, posee un tallo muy ramificado y hojas verdes grisáceas (Harat *et al.*, 2008). Se le reconocen propiedades farmacológicas como antinociceptivo, antiinflamatorio, fungicida, herbicida y citotóxico (Oliva *et al.*, 2003; González-Trujano *et al.*, 2006; Ratheesh *et al.*, 2009; Varamini *et al.*, 2009). Su efecto abortivo ha sido reportado en diferentes países como Brasil, la India y México (Rahim *et al.*, 2010). La aplicación principal en infusión de té es el alivio de los cólicos menstruales por sus propiedades antiespasmódicos (Seak & Lin, 2007).

* Departamento de Bioquímica y Farmacología. Centro de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón, Coahuila, México.

** Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México.

*** Departamento de Biología Celular y Ultraestructura. Centro de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Coahuila, Torreón, Coahuila, México.

De *R. graveolens* se han aislado más de 120 compuestos entre los que se encuentran el aceite volátil 2-undecanona como su mayor componente (50-90%), 2-hepatonol, 2-nonanona, limoneno, pineno, ácido anísico, fenol, guiacol y otros. Rutina y otros flavonoides como quercetina; cumarinas como bergapteno, dafnoretina, isoimperatorina, naftoherniarina, psoraleno, pangelina, rutamarina, rutarina, escopoletina y umbeliferona; alcaloides como arborinina, fagarina, graveolina, cocusaginina, rutacridina, 1-hidroxi-3-metoxi-N-metilacridona; lignanos en la raíz como savinina y helioxantina (Ratheesh *et al.*).

Los compuestos derivados de las cumarinas se han utilizado en neurología para el tratamiento sintomático de enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple (Orlita *et al.*, 2008). La rutina se vende en farmacias como constituyente medicinal contra la fragilidad capilar, vermífugo intestinal y como antídoto para las toxinas de serpiente y escorpión (Freire *et al.*, 2010), además se ha utilizado para la psoriasis leucodérmica, linfomas cutáneos, artritis reumática y contra el cáncer (Diwan & Malpathak, 2009). Las furanocumarinas se han empleado para tratar la leucoderma, vitíligo, linfomas cutáneos y como agente anti-HIV (Diwan & Malpathak, 2010).

Existe la creencia de que las plantas medicinales son inocuas, pero estudios previos han demostrado los efectos tóxicos que muestran algunas especies utilizadas en medicina tradicional (Inamul, 2004). Estudios farmacológicos han confirmado los efectos adversos de la *R. graveolens*, como por ejemplo: fototoxicidad, genotoxicidad y mutagenicidad (Freire *et al.*). El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto tóxico del extracto acuoso de *R. graveolens* del norte de México sobre el hígado de ratas Wistar.

MATERIAL Y MÉTODO

Preparación del extracto acuoso de *R. graveolens*. Se colectaron aproximadamente 5 kg de planta fresca de *R. graveolens* en el Norte de México en las coordenadas 25.53607 N y 103.52117 O. El material vegetal se secó durante 10 días a temperatura ambiente, posteriormente las partes aéreas se molieron hasta obtener un polvo fino. De este polvo se pesaron 100 g y se le agregaron 1000 mL de agua destilada, la mezcla se calentó a 100°C y se agitó por una hora. Luego se filtró con papel Whatman N° 1 con bomba al vacío. Finalmente el filtrado se llevó a

sequedad en estufa a 40°C para obtener el extracto seco que se almacenó a 5°C hasta su utilización.

Animales de experimentación y grupos del estudio *in vivo*. En este estudio se emplearon 25 ratas Wistar machos de 11 semanas de edad y peso de 250-300 g. Siete días previos al tratamiento se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio, temperatura 24°C, ciclos luz/oscuridad de 12 horas, humedad relativa de 45% con libre acceso al pellet Teklad® (18% proteína) y agua *ad libitum*. Ningún animal fue reemplazado durante el estudio. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila.

Las ratas se dividieron en cinco grupos (n=5). El grupo 1 correspondió al control negativo, al grupo 2 se le administraron 100 mg de dexametasona disuelta en aceite de maíz/kg/día vía intraperitoneal (i.p.), este grupo se consideró como control positivo. Los grupos 3 y 4 se trataron con 30 y 100 mg de extracto de *R. graveolens* disuelto en solución fisiológica 0.9%/kg/día vía i.p. respectivamente. Finalmente al grupo 5 se le administraron 100 mg de dexametasona/kg/día combinado con 100 mg de extracto de *R. graveolens*/kg/día.

Las administraciones de dexametasona o del extracto de *R. graveolens* se realizaron por tres días consecutivos. Después de la última administración los animales se mantuvieron en ayuno durante 24 horas, y se sacrificaron por dislocación cervical. De cada animal se diseccionó el hígado, y se tomaron muestras representativas que se fijaron en formalina al 10%.

Análisis Histológico. Las muestras de hígado colectadas se procesaron por la técnica histológica convencional hasta su inclusión en bloques de parafina. En el micrótopo se obtuvieron cortes histológicos de 5 micras de grosor que se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para la evaluación histológica con microscopio de luz.

Análisis morfométrico. En este estudio también se realizó un análisis cuantitativo dividiendo el parénquima del hígado en acinos hepáticos o de Rappaport. Se analizaron 8 campos consecutivos con el objetivo de inmersión en aceite (100X), posteriormente se cuantificaron los hepatocitos normales diferenciándolos de los que mostraron alteraciones en las 3 zonas descritas para el acino hepático, esto se realizó por triplicado. De los valores obtenidos se obtuvieron valor promedio y desviación estándar (DE) y se analizaron estadísticamente con la prueba de t de student para un valor de significancia $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Cambio del peso corporal durante el tratamiento. Durante el tratamiento se evaluó el cambio del peso de los animales para relacionarlo con el peso del hígado al final del experimento. No hubo cambio del peso corporal entre los grupos. En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos con la prueba de ANOVA para peso corporal y del hígado, encontrando diferencia significativa.

Tabla I. Resultados obtenidos de la prueba de ANOVA para peso corporal e hígado (n = 5).

	Valor de p
Peso del Hígado	0,003*
Peso Corporal	0,714&

* Diferencia significativa respecto al control (p < 0,05). & Análisis mediante Kruskal Wallis.

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos mediante la prueba post hoc de Tukey determinando que existe diferencia significativa del grupo control positivo con dexametasona (p=0,014; IC 95%: -5,45, -0,51) y este último con el grupo tratado en dosis de 30 mg/Kg/día de extracto acuoso de *R. graveolens* (p=0,02; IC 95%: 1,25 – 6,19).

Análisis histológico. En todos los grupos de estudio, macroscópicamente el hígado no mostró presencia de hemorragia o cambio en la coloración. En el análisis histológico de las muestras del grupo 1 (control negativo) se observó una histología normal para este órgano: láminas de hepatocitos mononucleados o binucleados, con núcleos eucromáticos, citoplasma homogéneo y límites celulares bien definidos. Las láminas se observaron dispuestas de manera radial con respecto a la vena central, separadas por capilares sinusoidales con eritrocitos en su interior de características normales. Los espacios porta no mostraron alteraciones (Fig. 1A).

El grupo 2, mostró daño generalizado, caracterizado por pérdida de la arquitectura normal de los lobulillos hepáticos con desorganización de las láminas de hepatocitos. En los hepatocitos se observó aumento del tamaño celular, abundantes vacuolas en

el citoplasma por la aparente extracción de lípidos o esteatosis microvesicular, y signos francos de necrosis, también se observó dilatación de los capilares sinusoidales (Fig. 1B).

En el grupo 3 se observó ligera congestión vascular y hepatocitos con aumento de tamaño. Destaca que en este grupo algunos hepatocitos mostraron signos de necrosis: extracción total o parcial del citoplasma y núcleos picnóticos, así como sugestivos de apoptosis como condensación de la cromatina alrededor de la envoltura nuclear, y condensación del citoplasma (Fig. 1C).

En el grupo 4, se observó aumento del daño observado en el grupo 3, con un mayor número de hepatocitos con signos de necrosis y apoptosis. En este grupo también se observaron focos de hepatocitos con abundantes vacuolas en su citoplasma por la extracción de lípidos, focos de hemorragia y congestión sinusoidal, así como zonas con infiltrado de células mononucleares (Fig. 1D).

En el grupo 5 se observó acentuación de las alteraciones descritas en los grupos 2, 3 y 4 (Fig. 1E).

Análisis morfométrico. En el análisis morfométrico de los acinos hepáticos en el grupo 1 se observaron escasos hepatocitos dañados por campo (zona 1: 0,333 ± 0,577, zona 2: 0,166 ± 0,288 y zona 3: 0,1 ± 0,173). En el grupo 2 se observó una mayor cantidad de hepatocitos alterados por campo en las 3 zonas de estudio (zona 1: 21,437 ± 2,032, zona 2: 15,562 ± 0,795 y zona 3: 15,875 ± 1,237).

En el grupo 3, solo se observó un número pequeño de hepatocitos dañados (zona 1: 1,333 ± 1,092, zona 2: 1,583 ± 1,134 y zona 3: 0,708 ± 0,144).

Sin embargo, en el grupo 4 se observó un daño acentuado en los hepatocitos (zona 1: 15,291 ± 2,943, zona 2: 14,333 ± 4,889 y zona 3: 14,583 ± 5,789), similar al observado en el grupo 2. Destaca que en el grupo 5, el daño es aún mayor (zona 1: 27,666 ± 1,404, zona 2: 24,375 ± 0,544 y zona 3: 21,5 ± 3,727). Tanto en los grupos 2, 3, 4 y 5 se observó diferencia estadística significativa comparados con el grupo 1 (Fig. 2).

Tabla II. Efecto producido en el peso del hígado mediante la administración i.p. de extracto acuoso de *R. graveolens* (n = 5) a.

Tratamiento	Peso corporal (g)	Peso del hígado (g)
Grupo 1 (control negativo)	271,6 ± 30,66	8,30 ± 0,71*
Grupo 2 (100 mg de Dex./kg/día)	277,2 ± 36,72	11,28 ± 2,27*+
Grupo 3 (30 mg de <i>R. graveolens</i> /Kg/día)	299,6 ± 10,69	7,56 ± 0,86+
Grupo 4 (100 mg de <i>R. graveolens</i> /Kg/día)	280,8 ± 22,99	8,92 ± 0,72
Grupo 5 (100 mg de <i>R. graveolens</i> 100 mg de Dex./Kg/día)	274,6 ± 46,49	9,60 ± 1,26

a Los resultados son expresados como la media ± DE

*Diferencia significativa respecto al grupo A con la prueba de Tukey Post Hoc (p<0,05).

+Diferencia significativa respecto al grupo B con la prueba de Tukey Post Hoc (p<0,05).

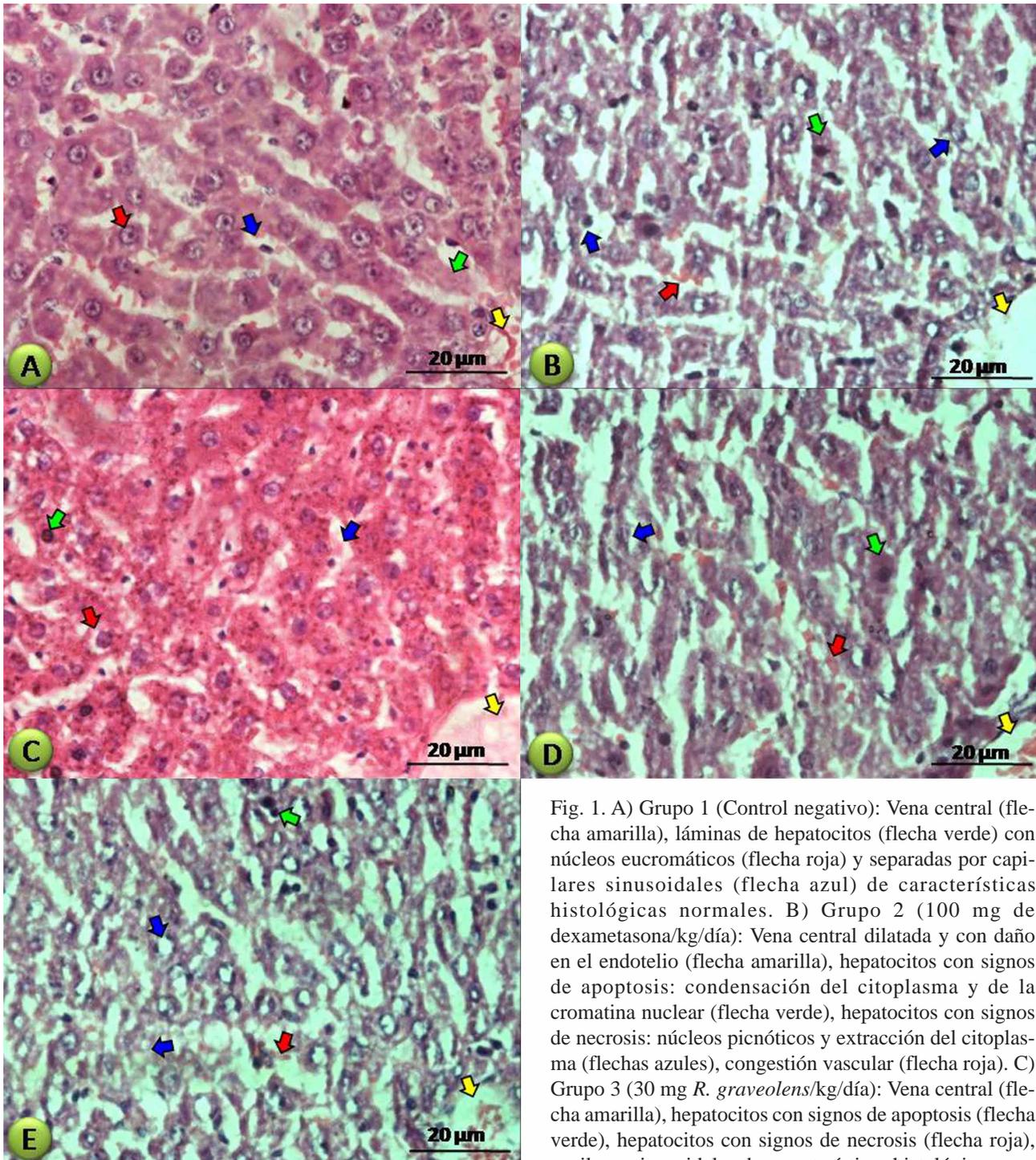


Fig. 1. A) Grupo 1 (Control negativo): Vena central (flecha amarilla), láminas de hepatocitos (flecha verde) con núcleos eucromáticos (flecha roja) y separadas por capilares sinusoidales (flecha azul) de características histológicas normales. B) Grupo 2 (100 mg de dexametasona/kg/día): Vena central dilatada y con daño en el endotelio (flecha amarilla), hepatocitos con signos de apoptosis: condensación del citoplasma y de la cromatina nuclear (flecha verde), hepatocitos con signos de necrosis: núcleos picnóticos y extracción del citoplasma (flechas azules), congestión vascular (flecha roja). C) Grupo 3 (30 mg *R. graveolens*/kg/día): Vena central (flecha amarilla), hepatocitos con signos de apoptosis (flecha verde), hepatocitos con signos de necrosis (flecha roja), capilares sinusoidales de características histológicas normales (flecha azul). D) Grupo 4 (100 mg *R. graveolens*/kg/día): Congestión vascular en vena central (flecha amarilla), y sinusoides (flecha roja), hepatocitos con signos de apoptosis (flecha verde) y necrosis (flecha azul). Destaca la pérdida de la arquitectura normal y la presencia de daño generalizado. E) Grupo 5 (100 mg *R. graveolens*/kg/día + 100 mg dexametasona/kg/día): Acentuación de las alteraciones descritas en los grupos 2, 3 y 4: congestión vascular en vena central y el daño en las células endoteliales (flecha amarilla), dilatación de los sinusoides con daño en el endotelio (flecha roja), necrosis generalizada en hepatocitos (flechas azules), hepatocitos con signos de apoptosis (flecha verde). Hígado. Embebido en parafina, H-E. Micrografía de luz. Barra 20 µm.

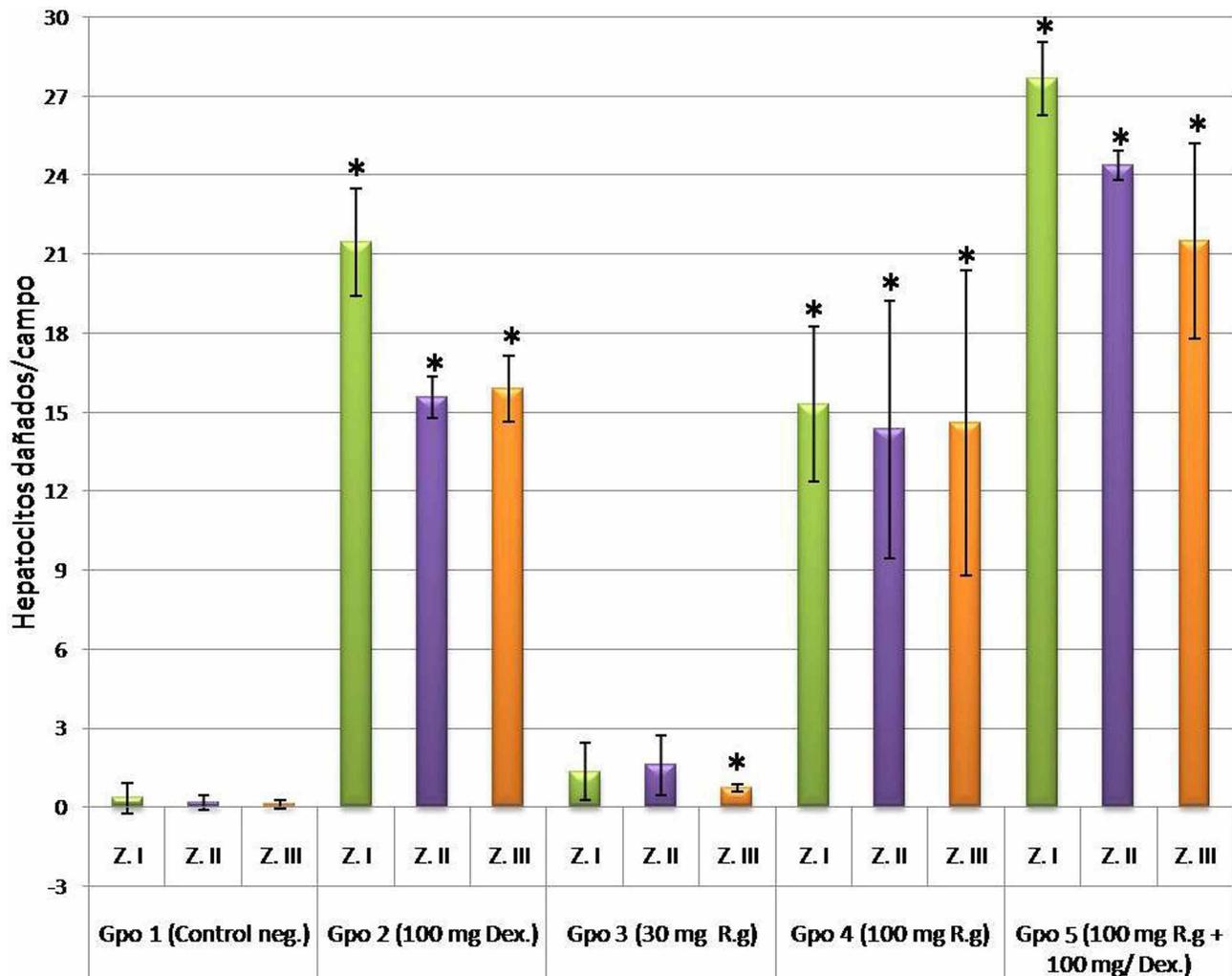


Fig. 2. Gráfica que muestra los resultados del análisis morfométrico en cada uno de los grupos de estudio. El análisis estadístico muestra que hay diferencia significativa entre los grupos 2, 3, 4 y 5 vs. el grupo 1.* $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran por primera vez que la exposición aguda al extracto acuoso de *R. graveolens* del norte de México induce alteraciones morfológicas en el hígado de ratas Wistar. Estas alteraciones se observaron de manera leve al administrar una concentración de 30 mg del extracto de *R. graveolens*/kg/día en tres días consecutivos. Las alteraciones se incrementaron con la administración de 100 mg del extracto de *R. graveolens* /kg/día, y fueron aun mayores cuando se usó una combinación de 100 mg del extracto de *R. graveolens* /kg/día y 100 mg del dexametasona/kg/día.

En el grupo 2 se observó daño generalizado caracterizado por pérdida de la arquitectura normal del lobulillo

hepático, congestión vascular y necrosis en los hepatocitos, así como signos sugestivos de apoptosis. Estos resultados se correlacionan con lo observado en un estudio previo de Roma *et al.* (2009), que describe que la dexametasona es capaz de inducir apoptosis. Sin embargo, otros estudios *in vivo* no reportan cambios morfológicos en hígado producidos por la administración de dexametasona (Kishida *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).

En este trabajo se observó que las ratas tratadas con 30 y 100 mg/kg de peso corporal con el extracto acuoso de *R. graveolens* ganaron el mismo peso que las del grupo control negativo. de Freitas *et al.* (2005), evaluaron el efecto producido por un extracto metanólico de *R. graveolens* administrado por 15 días vía oral en dosis de 1000 mg/kg en ratones, y al igual que en este estudio no se encontró variación significativa respecto al peso corporal.

Por otra parte la relación peso corporal/peso de hígado se modificó con el tratamiento del extracto, este aumento en el peso puede ser atribuido a la esteatosis generalizada y/o a la presencia de inflamación causada por la liberación de componentes citoplásmicos de las células en necrosis en los grupos expuestos (Searle *et al.*, 1982; Kerr *et al.*, 1995).

Un hallazgo importante en el análisis histológico de los grupos 3, 4 y 5 fue la observación dosis-dependiente de signos de necrosis, tales como: extracción total o parcial del citoplasma y núcleos picnóticos en los hepatocitos. En estos grupos también se observaron signos sugestivos de apoptosis como condensación del citoplasma y de la cromatina sobre la envoltura nuclear (Kerr *et al.*, 1972; Majno & Joris, 1995; Erickson, 1997).

Es conveniente destacar que la observación de manera simultánea de necrosis, así como signos sugestivos de apoptosis, aunque son esencialmente dos tipos diferentes de muerte celular pueden tener traslapes en una respuesta celular ante un compuesto tóxico a la misma dosis administrada; y que la amplitud del daño que finalmente activará ambos tipos de muerte celular depende de factores toxicocinéticos, bioactivación y lesión específica (Raffray & Cohen, 1997). Por lo que nuestros resultados sugieren que ambos tipos de muerte celular podrían ser inducidos por el extracto de *R. graveolens*, o bien por compuestos derivados de su metabolismo y que tengan como blanco al hígado por su actividad detoxificante (Al-Ali *et al.*, 2005).

Las plantas medicinales son potencialmente hepatotóxicas como *Larrea tridentata* (Stickel *et al.*, 2000) tal y como se reporta en este estudio. El efecto hepatotóxico observado en este trabajo, es distinto a lo descrito en un estudio previo en nuestro laboratorio; en donde no se observó daño morfológico en hígado por la exposición a 160 mg de un extracto acuoso de plantas de la especie *Lippia graveolens* (Soto-Domínguez *et al.*, 2012). Cabe destacar que las especies *L. graveolens* y *R. graveolens* empleadas en ambos estudios se colectaron en la misma región del Norte de México, aunque en distintas épocas del año. Por lo que los diferentes resultados observados en estos estudios pueden además ser debido a que las plantas de esta especie muestran variaciones en la composición y cantidad de los metabolitos secundarios dependiendo de los factores climáticos, época de cosecha y el estado de crecimiento (Cimanga *et al.*, 2002; Lecona-Uribe *et al.*, 2003; Salgueiro *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2009).

Por otra parte, las alteraciones histológicas en hígado se acentuaron en el grupo 4. En este grupo se observaron focos de infiltrados de células mononucleares, que pueden ser resultado de la liberación de factores quimioatrayentes que se liberan en las células necróticas (Searle *et al.*; Kerr *et al.*, 1995).

Destaca además que en este grupo se observó un daño severo en los hepatocitos. Estas alteraciones pueden ser debido a múltiples constituyentes que produce la especie vegetal, entre los que se encuentran cumarinas y sus compuestos derivados (Orlita *et al.*; Ratheesh *et al.*). Se ha descrito que las cumarinas tienen como órganos blanco para su toxicidad y carcinogenicidad a hígado y pulmón en ratón y rata (Lake, 1999). También se han relacionado con afectación a la síntesis de los factores de coagulación en el hígado, además de ser causantes de hemorragias (Bye & King, 1970, Pineda-Ruiz, 2009). Por lo que la presencia de cumarinas y otros compuestos aislados de *R. graveolens* podrían estar induciendo un efecto tóxico en los hepatocitos, congestión vascular, e infiltrados de células mononucleares observados en los grupos expuestos a distintas concentraciones del extracto de *R. graveolens*.

Las alteraciones observadas en los grupos 2, 3 y 4, fueron aun mayores en el grupo 5, posiblemente como resultado de un efecto aditivo o sinergista entre ambos (Han *et al.*, 2011).

Los efectos tóxicos del extracto acuoso de *R. graveolens* sobre el hígado descrito previamente en el análisis histológico, se corroboraron en el análisis morfométrico, en donde se observó diferencia estadística significativa en los grupos 2, 3, 4 y 5, comparados con el grupo 1.

Actualmente en nuestro laboratorio se llevan a cabo estudios para identificar los compuestos químicos presentes en el extracto acuoso evaluado en este trabajo, así como la evaluación in vitro e in vivo de extractos metanólicos y aceites esenciales obtenidos de *R. graveolens* del norte de México.

CONCLUSIONES

Los hallazgos descritos en la presente investigación, demuestran que la exposición al extracto acuoso de *R. graveolens*, usada ampliamente en la medicina tradicional en México y diversos países, producen alteraciones histológicas severas en el hígado de ratas Wistar. Los productos a base de plantas son potencialmente dañinos, sobre todo cuando se desconoce la composición de los constituyentes tóxicos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el valioso apoyo en el manejo de animales a la MVZ Katty González Pineda y al CONACyT.

SERRANO-GALLARDO, L. B.; SOTO-DOMÍNGUEZ, A.; RUIZ-FLORES, P.; NAVA-HERNÁNDEZ, M. P.; MORÁN-MARTÍNEZ, J.; GARCÍA-GARZA, R. & MARTÍNEZ-PÉREZ, E. F. Toxic effect of aqueous extract of *Ruta graveolens* from the North of Mexico on the liver of Wistar rat. *Int. J. Morphol.*, 31(3):1041-1048, 2013.

SUMMARY: In traditional medicine, beneficial properties are attributed to *Ruta graveolens*, but it has been shown that it can also cause side effects. Because there is no evidence that ratifies that *R. graveolens* is totally harmless. The aim of this study was to determine the toxic effect of aqueous extract of the leaves of this plant in rat liver. 25 Wistar rats were used and divided into 5 groups (n = 5). Group 1 corresponded to the negative control group; group 2 or positive control was treated with 100 mg of dexamethasone/kg/day. Groups 3 and 4 were treated with 30 and 100 mg of extract of *R. graveolens* respectively. Group 5 was treated with 100 mg dexamethasone/kg/day in combination with 100 mg of extract of *R. graveolens*/kg/day. Administrations were performed intraperitoneally for three days. All animals were sacrificed by cervical dislocation. Liver samples were fixed in formalin and then embedded in paraffin. Histological sections were obtained from 5 microns thick and stained with hematoxylin-eosin for histological evaluation by light microscopy. The results demonstrate for the first time that exposure to aqueous extract of *R. graveolens* induces morphological changes in the liver of Wistar rats. These alterations were observed slightly in group 3. Alterations increased in group 4. Highest damage was observed in group 5. The aqueous extract of *R. graveolens* was toxic; furthermore additional studies are needed to characterize other toxicological effects that support the risk of use of *R. graveolens* in traditional medicine in a long term.

KEY WORDS: *Ruta graveolens*; Aqueous extract; Liver toxicity; Wistar rats

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agbonon, A.; Ekl-Gadegbeku, K.; Aklikokou, K.; Gbeassor, M.; Akpagana, K.; Tam, T. W.; Arnason, J. T. & Foster, B. C. In vitro inhibitory effect of West African medicinal and food plants on human cytochrome P450 3A subfamily. *J. Ethnopharmacol.*, 128(2):390-4, 2010.
- Al-Ali, S. Y.; Hassan, I. M. & Sadek, S. Ultrastructural changes in rat livers perfused *in vitro* and *in vivo* with a high dose of methotrexate. *Histol. Histopathol.*, 20(4):1131-45, 2005.
- Alonso-Castro, A. J.; Maldonado-Miranda, J. J.; Zarate-Martínez, A.; Jacobo-Salcedo, M. R.; Fernández-Galicia, C.; Figueroa-Zúñiga, L. A.; Ríos-Reyes, N. A.; de León-Rubio, M. A.; Medellín-Castillo, N. A.; Reyes-Munguía, A.; Méndez-Martínez, R. & Carranza-Álvarez, C. Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *J. Ethnopharmacol.*, 143(1):292-8, 2012.
- Bye, A. & King, H. K. The biosynthesis of 4-Hydroxycoumarin and dicoumarol by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biochem. J.*, 117(2):237-45, 1970.
- Cimanga, K.; Kambu, K.; Tona, L.; Apers, S.; De Bruyne, T.; Hermans, N.; Totté, J.; Pieters, L. & Vlietinck, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J. Ethnopharmacol.*, 79(2):213-20, 2002.
- de Freitas, T. G.; Augusto, P. M. & Montanari, T. Effect of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. *Contraception*, 71(1):74-7, 2005.
- Diwan, R. & Malpathak, N. Furanocoumarins: novel topoisomerase I inhibitors from *Ruta graveolens* L. *Bioorg. Med. Chem.*, 17(19):7052-5, 2009.
- Diwan, R. & Malpathak, N. Histochemical localization in *Ruta graveolens* cell cultures: elucidating the relationship between cellular differentiation and furanocoumarin production. *Vitro. Cell Dev. Biol. Plant.*, 46(1):108-16, 2010.
- Erickson, G. F. Defining apoptosis: players and systems. *J. Soc. Gynecol. Invest.* 4(5):219-28, 1997.
- Freire, R. B.; Borba, H. R. & Coelho, C. D. *Ruta graveolens* L. toxicity in *Vampirolepis nana* infected mice. *Indian J. Pharmacol.*, 42(6):345-50, 2010.
- González-Trujano, M. E.; Carrera, D.; Ventura-Martínez, R.; Cedillo-Portugal, E. & Navarrete, A. Neuropharmacological profile of an ethanol extract of *Ruta chalepensis* L. in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 106(1):129-35, 2006.
- Han, Y. L.; Yu, H. L.; Li, D.; Meng, X. L.; Zhou, Z. Y.; Yu, Q.; Zhang, X. Y.; Wang, F. J. & Guo, C. Inhibitory effects of limonin on six human cytochrome P450 enzymes and P-glycoprotein *in vitro*. *Toxicol. In Vitro*, 25(8):1828-33, 2011.
- Harat, Z. N.; Sadeghi, M. R.; Sadeghipour, H. R.; Kamalinejad, M. & Eshraghian, M. R. Immobilization effect of *Ruta graveolens* L. on human sperm: a new hope for male contraception. *J. Ethnopharmacol.*, 115(1):36-41, 2008.
- Hernández, T.; Canales, M.; Ávila, J. G.; Garcia, A. M.; Meraz, S.; Caballero, J. & Lira, R. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.*, 8(4):295-300, 2009.
- Inamul, H. Safety of medicinal plants. *Pakistan J. Med. Res.*, 43(4), 2004.

- Kerr, J. F.; Gobé, G. C.; Winterfold, C. M. & Harmon, B. V. Anatomical method in cell death. *Methods Cell Biol.*, 46:1-27, 1995.
- Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide –ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26(4):239-57, 1972.
- Kishida, T.; Muto, S.; Hayashi, M.; Tsutsui, M.; Tanaka, S.; Murakami, M. & Kuroda, J. Strain differences in hepatic cytochrome P450 1A and 3A expression between Sprague-Dawley and Wistar rats. *J. Toxicol. Sci.*, 33(4):447-57, 2008.
- Lake, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.*, 37(4):423-53, 1999.
- Lecona-Urbe, S.; Loarca-Piña, F. G.; Arcila-Lozano, C.; Díaz-Moscoso, C. & Ocampo, R. Nutraceutical potential of Mexican oregano (*Lippia graveolens* K). *IFT Annual Meeting*, 14E-28, 2003.
- Libman, A.; Bouamanivong, S.; Southavong, B.; Sydara, K. & Soejarto, D. D. Medicinal plants: an important asset to health care in a region of Central Laos. *J. Ethnopharmacol.*, 106(3):303-11, 2006.
- Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146(1):3-15, 1995.
- Oliva, A.; Meepagala, K. M.; Wedge, D. E.; Harries, D.; Hale, A. L.; Aliotta, G. & Duke, S. O. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J. Agric. Food Chem.*, 51(4):890-6, 2003.
- Orlita, A.; Sidwa-Gorycka, M.; Malinski, E.; Czerwicka, M.; Kumirska, J.; Golebiowski, M.; Loikowska, E. & Stepnowski, P. Effective biotic elicitation of *Ruta graveolens* L. shoot cultures by lysates from *Pectobacteriumatrosepticum* and *Bacillus sp.* *Biotechnol. Lett.*, 30(3):541-5, 2008.
- Pineda-Ruiz, J. C. Sobreanticoagulación con warfarina. *Arch. Med. (Manizales)*, 9(2):174-82, 2009.
- Raffray, M. & Cohen, G. M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol. Ther.*, 75(3):153-77, 1997.
- Raghav, S. K.; Gupta, B.; Agrawal, C.; Goswami, K. & Das, H. Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens* L. in murine macrophage cells. *J. Ethnopharmacol.*, 104(1-2):234-9, 2006.
- Rahim, F.; Saki, G. & Bazrafkan, M. Effect of alcohol extracts of the *Ruta graveolens* L. on the count, motility and *in Vitro* fertilization capacity of rats's sperm. *Asian J. Plant. Sci.*, 9(1):63-6, 2010.
- Ratheesh, M.; Shyni, G. L. & Helen, A. Methanolic extract of *Ruta graveolens* L. inhibits inflammation and oxidative stress in adjuvant induced model of arthritis in rats. *Inflammopharmacology*, 17(2):100-5, 2009.
- Roma, L. P.; Bosqueiro, J. R.; Cunha, D. A.; Carneiro, E. M.; Gurgul-Convey, E.; Lenzen, S.; Boschero, A. C. & Souza, K. L. Protection of insulin-producing cells against toxicity of dexamethasone by catalase over expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 47(10):1386-93, 2009.
- Salgueiro, L. R.; Cavaleiro, C.;Goncalves, M. J. & Proenca da Cunha, A. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Med.*, 69(1):80-3, 2003.
- Seak, C. J. & Lin, C. C. *Ruta graveolens* intoxication. *Clin. Toxicol. (Phila.)*, 45(2):173-5, 2007.
- Searle, J.; Kerr, J. F. & Bishop, C. J. Necrosis and Apoptosis:Distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol. Annu.*, 17(Pt. 2):229-59, 1982.
- Shanmugan, S.; Rajendran, K. & Suresh, K. Traditional uses of medicinal plants among the rural people in Sivagangai district of Tamil Nadu, Southern India. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, 2(1):429-34, 2012.
- Soto-Domínguez, A.; García-Garza, R.; Ramírez-Casas, Y.; Morán-Martínez, J. & Serrano-Gallardo, L. B. El extracto acuoso de orégano (*Lippia graveolens* HBK) del norte de México tiene actividad antioxidante sin mostrar un efecto toxico *in vitro* e *in vivo*. *Int. J. Morphol.*, 30(3):937-44, 2012.
- Stickel, F.; Egerer, G. & Seitz, H. K. Hepatotoxicity of botanicals. *Public Health Nutr.*, 3(2):113-24, 2000.
- Varamini, P.; Soltani, M. & Ghaderi, A. Cell cycle analysis and cytotoxic potential of *Ruta graveolens* against human tumor cell lines. *Neoplasma*, 56(6):490-3, 2009.
- Wang, X. & Yeung, J. H. Inhibitory effect of tanshinones on rat CYP3A2 and CYP2C11 activity and its structure-activity relationship. *Fitoterapia*, 82(4):539-45, 2011.

Dirección para Correspondencia:
M.C. Edith Fabiola Martínez-Pérez
Departamento de Bioquímica y Farmacología
Centro de Investigación Biomédica
UA de C., Unidad Torreón
Av. Gregorio A. García 198 Sur
Torreón, Coah. C.P. 27000
MÉXICO

Email: edith_fabiolamartinez@hotmail.com

Recibido : 12-01-2013
Aceptado: 19-05-2013