

El Extracto Acuoso de *Ruta graveolens* del Norte de México Causa Apoptosis y Muestra Efecto Antiproliferativo sobre el Hígado de Rata Wistar: Evidencia Morfológica

Aqueous Extract of *Ruta Graveolens* From the North of Mexico Causes Apoptosis and Shows Antiproliferative Effect on the Liver of Wistar Rat: Morphological Evidence

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

SOTO-DOMÍNGUEZ, A.; SERRANO-GALLARDO, L. B.; GARCÍA-GARZA, R.; RUÍZ-FLORES, P.; MORÁN-MARTÍNEZ, J.; NAVA-HERNÁNDEZ, M. P. & MARTÍNEZ-PÉREZ, E. F. El extracto acuoso de *Ruta graveolens* del norte de México causa apoptosis y muestra efecto antiproliferativo sobre el hígado de rata Wistar: evidencia morfológica. *Int. J. Morphol.*, 31(4):1340-1348, 2013.

RESUMEN: *Ruta graveolens* es una planta nativa del Mediterráneo Oriental y del área Sur Occidental de Asia, de esta planta se han aislado más de 120 compuestos químicos. En un estudio previo en nuestro laboratorio se observó que un extracto acuoso de *R. graveolens* causó necrosis y alteraciones morfológicas sugestivas de apoptosis sobre el hígado de rata Wistar. El objetivo del presente estudio, fue evaluar la inducción de apoptosis y el posible efecto antiproliferativo *in vivo* de un extracto acuso de *R. graveolens* del norte de México, mediante métodos inmunohistoquímicos. 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*/kg/día respectivamente. Al grupo 5 se le administraron 100 mg de dexametasona/kg/día combinados 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, y se tomaron muestras de hígado que se fijaron en formalina, posteriormente se incluyeron en bloques de parafina. Se obtuvieron cortes histológicos que se tiñeron con el método tricrómico de Masson. También se realizaron pruebas inmunohistoquímicas de TUNEL, anti-bcl-2 y anti-PCNA; además de un estudio morfométrico. Los resultados demuestran por primera vez el potencial apoptótico y antiproliferativo del extracto acuoso de *R. graveolens* del norte de México, sobre el hígado de rata Wistar. Se sugiere la posibilidad de emplear dosis menores a las administradas en este estudio del extracto acuoso de *R. graveolens*, para investigar su potencial uso como agente antineoplásico en estudios *in vitro* con líneas celulares tumorales e/o implantadas en modelos murinos de cáncer.

PALABRAS CLAVE: *Ruta graveolens*; Apoptosis; Efecto antiproliferativo.

INTRODUCCIÓN

La muerte celular programada o apoptosis, presenta características bioquímicas y morfológicas opuestas a las que se observan en células y tejidos con necrosis (Kerr *et al.*, 1972; Wyllie *et al.*, 1980). La apoptosis se presenta de forma normal en los tejidos para mantener el balance entre proliferación y disminución del número de células (Erickson, 1997). Sin embargo, también puede ocurrir en respuesta a agentes tóxicos, quimioterapia o radiación (Eastman, 1990; Hickman, 1992).

Por otra parte, la necrosis puede ser inducida por químicos letales, eventos biológicos, físicos y mecánicos.

Se caracteriza por un daño directo que usualmente inicia en la superficie de la célula, ésta se hincha, y posteriormente ocurre lisis. Al liberar el contenido del citoplasma se puede promover la aparición de inflamación (Kerr *et al.*, 1995; Majno & Joris, 1995). Además, el núcleo de las células en necrosis muestra aumento de volumen y picnosis (Wyllie & Duvall, 1992).

En contraste, las células en apoptosis muestran encogimiento, formación de burbujas en la superficie celular, pérdida de microvellosidades, si la célula es secretora puede presentar una desgranulación previa al encogimiento,

^{*} Departamento de Histología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, N.L., México.

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

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

además de que el citoplasma se condensa. Simultáneamente, el núcleo también puede mostrar reducción, la cromatina se fragmenta al azar en las uniones internucleosomales, posteriormente se condensa y se deposita sobre la envoltura nuclear (Kerr *et al.*, 1994). En etapas finales, la célula se fragmenta y se forman cuerpos apoptóticos que contienen organelos bien preservados rodeados de membrana, esto evita la inflamación. Dentro de los tejidos, los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados por macrófagos residentes o por células vecinas (Kerr *et al.*, 1994).

El proceso de apoptosis puede ser inducido o inhibido en diferentes etapas, dentro de los reguladores se encuentran las proteínas caspasas (cisteín-aspartato proteasas) iniciadoras y efectoras que son responsables de cambios bioquímicos y morfológicos (Fraser & Evan, 1996; Hengartner, 2000). La activación o inhibición de estas proteínas u otros reguladores está estrechamente relacionada con la familia BCL-2 mitocondrial; entre los miembros de esta familia se encuentran proteínas pro-apoptóticas como bad, bak, bax, bcl-xs, bik y hrk, así como anti-apoptóticas como A1, bcl-2, bcl-w, bcl-xl, bfl-1, brag-1, mcl-1 y NR13 (Hockenberry *et al.*, 1990; Renvoize *et al.*, 1997; Mignote & Vayssiere, 1998).

Ruta graveolens, conocida con el nombre común de “ruda” es una planta nativa del Mediterráneo Oriental y del área Sur Occidental de Asia, es una planta perenne que ha sido empleada desde hace aproximadamente 1500 años en Europa y Asia (Tang & Ren, 2011); constituye una de las 565 especies de plantas utilizadas en medicina tradicional (Freire *et al.*, 2010). A la fecha se han descrito más de 120 compuestos aislados de *R. graveolens*, (Ratheesh *et al.*, 2009). En un estudio previo en nuestro laboratorio se observó que un extracto acuoso de *R. graveolens* induce necrosis y alteraciones morfológicas sugestivas de apoptosis sobre el hígado de ratas Wistar. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la inducción de apoptosis y el posible efecto antiproliferativo *in vivo* de un extracto acuoso de *R. graveolens* del norte de México mediante métodos inmunohistoquímicos.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención del extracto seco de *R. graveolens*. La recolección de *R. graveolens* se realizó antes de la floración en el Estado de Durango al Norte de México; con las coordenadas: Longitud (dec): -103.485833. Latitud (dec): -25.324444. Los especímenes se recolectaron del 13 al 17 de diciembre del 2010. Aproximadamente cinco kilogramos de material fresco recolectado se secó a la sombra

durante 10 días, después las hojas se molieron y el polvo fino se sometió a extracción acuosa a 100°C por una hora. Posteriormente la solución se filtró con papel Whatman N° 1 con bomba al vacío, 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 de estudio. Se emplearon 25 ratas Wistar macho, de 11 semanas de edad y con peso entre 200 y 300 g. Ningún animal fue reemplazado durante la fase experimental. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, temperatura de 24°C, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, humedad relativa de 47,5%, agua purificada *ad libitum* y con libre acceso a alimento para ratas en pellet marca Teklad® (18,0% mínimo de proteína, 5,0% mínimo de grasa, y 5,0% mínimo de fibra).

Los animales se distribuyeron en 5 grupos (n=5) asignados por aleatorización previo a la fase experimental. 1) Grupo 1 o control negativo, se le administró solución fisiológica, empleada como vehículo en los grupos experimentales, excepto en el grupo control positivo. 2) Grupo 2 o control positivo: recibió 100 mg de dexametasona/kg/día. 3) Grupo 3: se le administraron 30 mg del extracto acuoso de *R. graveolens*/kg/día. 4) Grupo 4: se le administraron 100 mg de extracto/kg/día, y 5) Grupo 5 que recibió una combinación de 100 mg del extracto/kg/día y 100 mg de dexametasona/kg/día. Las administraciones fueron vía i.p. por tres días consecutivos. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila, México.

Evaluación histológica. Los animales se mantuvieron en ayuno y 24 horas posteriores a la última administración se sacrificaron por dislocación cervical, posteriormente se colectaron muestras representativas de hígado para su análisis histológico e inmunohistoquímico. Las muestras se fijaron con una solución de formaldehído al 10%, y se procesaron por la técnica histológica convencional hasta su inclusión en bloques de parafina.

Posteriormente, mediante microtomía se obtuvieron cortes histológicos de 5 µm de grosor que se tiñeron con el método tricómico de Masson para la distinción entre los componentes mesenquimatosos y parenquimatosos. Los cortes se analizaron mediante microscopía de luz y se compararon los hallazgos de los grupos experimentales vs los grupos control.

Evaluación inmunohistoquímica. Se realizó la prueba de TUNEL (Tdt-mediated dUTP-biotin Nick-End

Labeling) para la detección de la fragmentación de la cromatina, uno de los eventos del fenómeno de apoptosis (Gavrieli *et al.*, 1992). La técnica se llevó a cabo utilizando el kit TACS™ 2 TdT *in situ* Apoptosis Detection de Trevigen® de acuerdo a las instrucciones del distribuidor, los núcleos se contrastaron con verde de metilo.

Por otra parte, se emplearon anticuerpos monoclonales específicos anti-PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (1:200, Dako Cytomation, Inc.) para identificar las células en proliferación (Matsumoto *et al.*, 1987; Zhang *et al.*, 1999). Además se identificó la proteína mitocondrial bcl-2 por su papel anti-apoptótico (Vaux *et al.*, 1988) (1:200, Dako Cytomation, Inc.). Como sistema de detección se empleó el sistema Envision® (Dako Cytomation, Inc.). La positividad se observó con el revelador 3-3'-diaminobencidina (DAB), los núcleos se contrastaron con hematoxilina de Mayer. Estas muestras se analizaron mediante microscopía de luz.

Análisis morfométrico. En este estudio se realizó un análisis morfométrico para cuantificar las células positivas para TUNEL y PCNA. Se analizaron 8 campos consecutivos con el objetivo seco fuerte (40X) y se distinguieron los núcleos positivos y negativos de los hepatocitos para cada uno de los marcadores empleados. Los valores se expresaron como número de células positivas/campo. Esto se realizó por triplicado y se obtuvieron también el valor promedio y la desviación estándar (DE). Los resultados se analizaron estadísticamente con la prueba de t-Student para un valor de significancia $p \leq 0,05$.

Por otra parte, se realizó un análisis por microdensitometría para cuantificar la positividad a bcl-2 en el citoplasma de los hepatocitos de los grupos de estudio, empleando el programa Image J, versión 1.44 y la metodología descrita previamente.

RESULTADOS

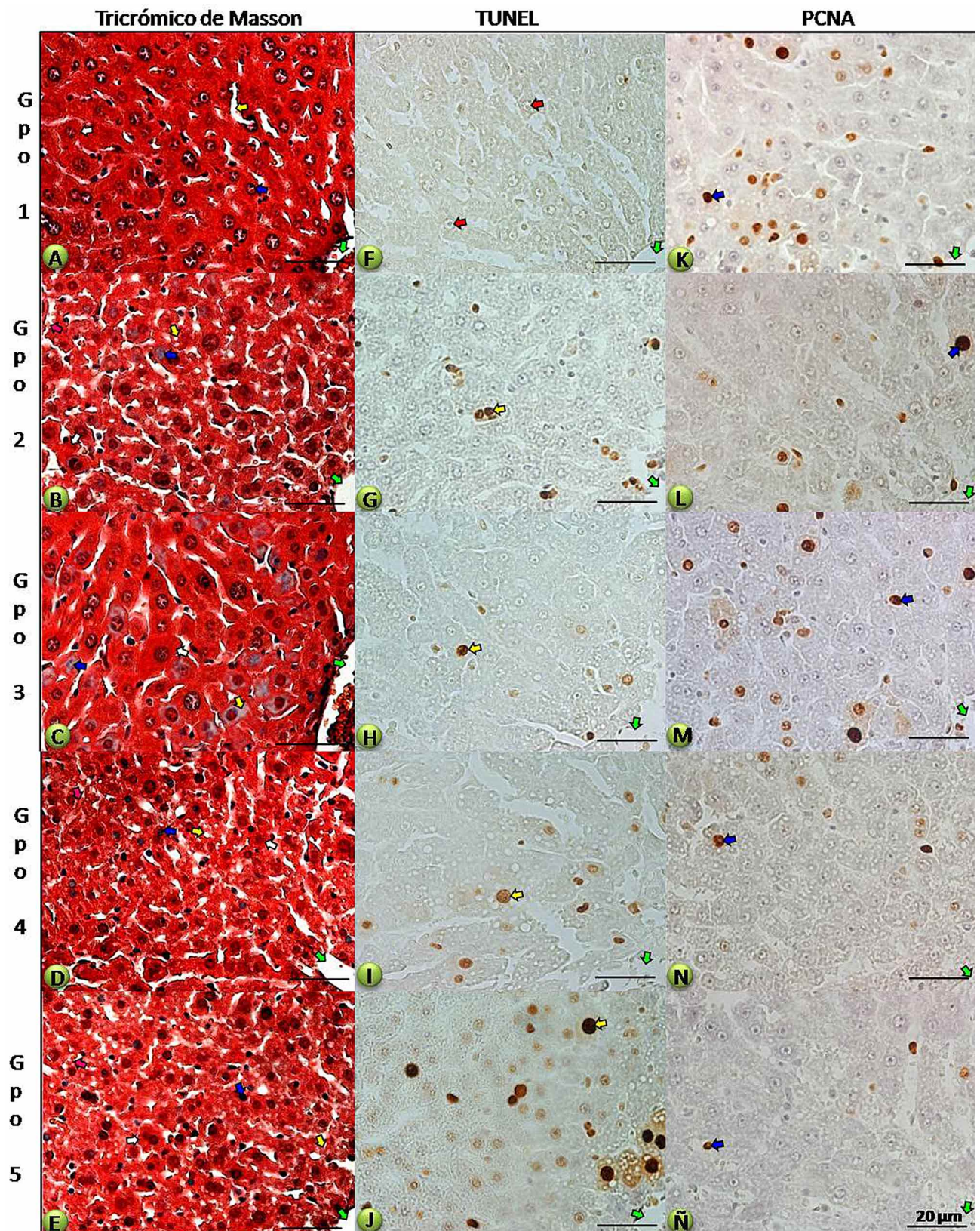
Evaluación histológica. Las muestras de hígado de las ratas del grupo 1 mostraron una histología normal: láminas de hepatocitos dispuestas de manera radial con respecto a la vena central. Los hepatocitos mostraron citoplasma homogéneo y núcleos eucromáticos. Entre las láminas se observaron capilares sinusoidales con eritrocitos en su interior, además de venas centrales y triadas portales de características histológicas normales (Fig. 1A).

En el grupo 2 se confirmaron los hallazgos encontrados en nuestro laboratorio: pérdida de la arquitectura normal de este órgano, signos de necrosis y esteatosis microvesicular en los hepatocitos, así como los signos sugestivos de apoptosis: núcleos con cromatina condensada y condensación del citoplasma. También se observó dilatación y congestión en los capilares sinusoidales (Fig. 1B).

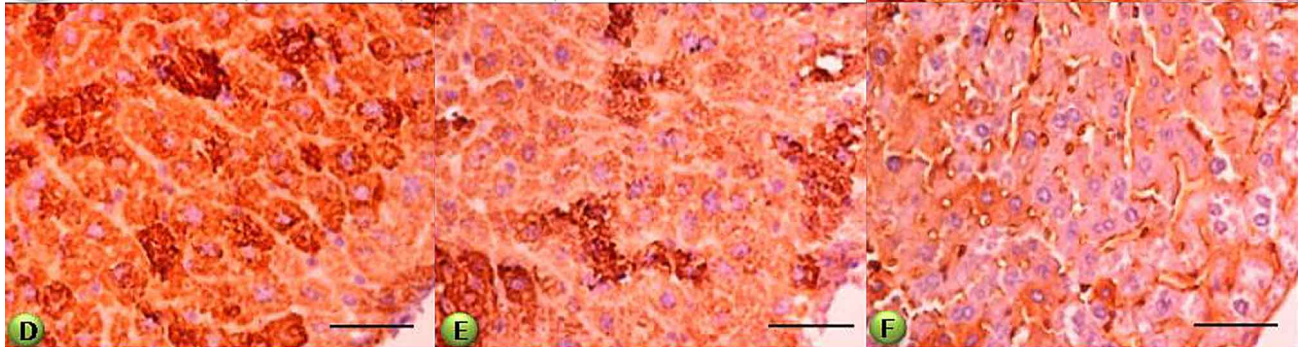
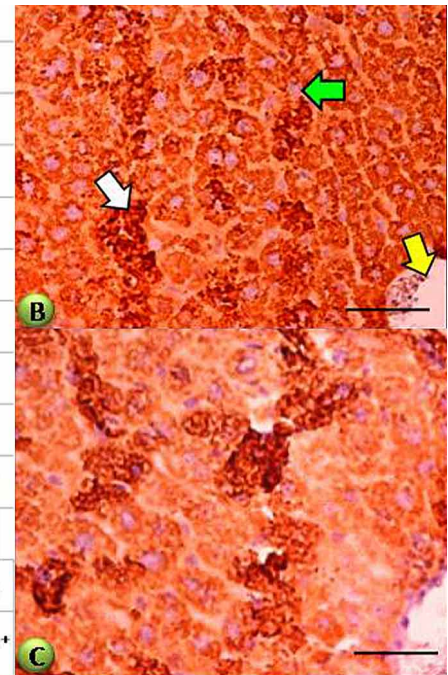
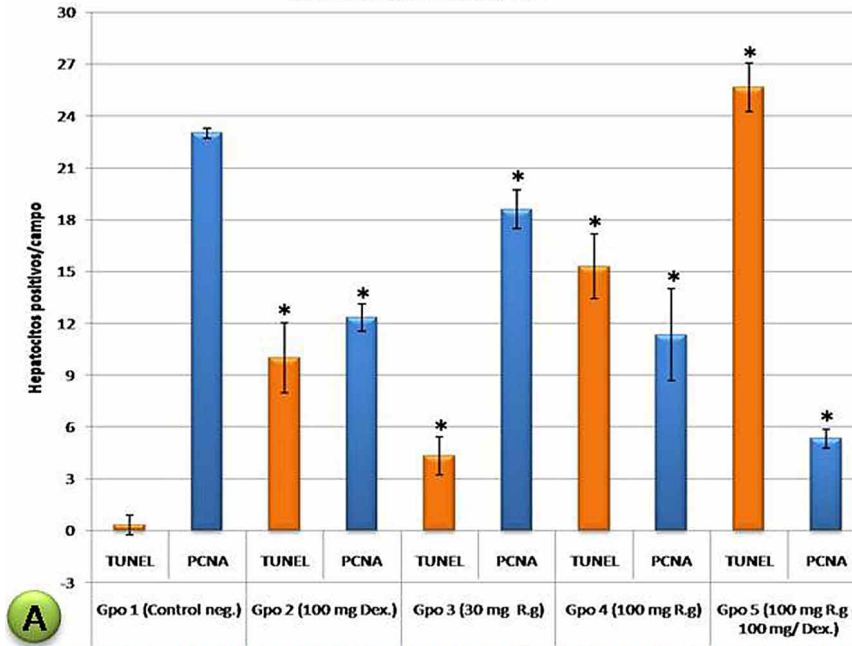
En el grupo 3 se observó ligera congestión vascular y signos leves de esteatosis, necrosis y apoptosis (Fig. 1C). Destaca que estas alteraciones se incrementaron en el grupo 4 (Fig. 1D), y se acentuaron en el grupo 5 (Fig. 1E).

Evaluación inmunohistoquímica. En el análisis inmunohistoquímico con la técnica de TUNEL se observaron resultados negativos en el grupo 1 (Fig. 1F). En los grupos 2 y 3 se identificaron escasos núcleos de células endoteliales y hepatocitos positivos a la fragmentación de la cromatina (Fig. 1 G y H). En el grupo 4 se observó una mayor cantidad de núcleos positivos (Fig. 1I). Sin embargo, es importante destacar que el mayor número de células positivas para esta prueba se observó en las muestras del grupo 5 (Fig. 1J).

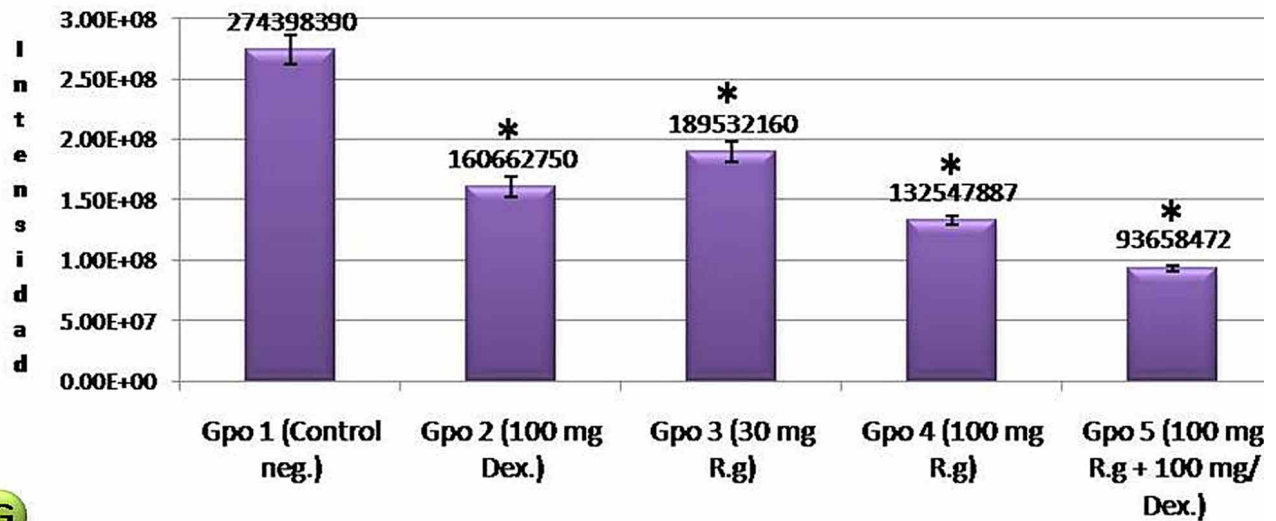
Fig. 1. A) Grupo 1 (Control negativo): Vena central (flecha verde), láminas de hepatocitos con núcleos eucromáticos (flecha azul) y separadas por capilares sinusoidales (flecha amarilla) de características histológicas normales. B) Grupo 2 (100 mg de dexametasona/kg/día): Vena central dilatada (flecha verde), hepatocitos con signos de apoptosis: condensación del citoplasma (flecha blanca) y de la cromatina nuclear (flecha azul), hepatocitos con signos de necrosis: núcleos picnóticos y extracción del citoplasma (flecha amarilla), congestión vascular (flecha rosa). C) Grupo 3 (30 mg *R. graveolens*/kg/día), D) Grupo 4 (100 mg *R. graveolens*/kg/día), E) Grupo 5 (100 mg *R. graveolens*/kg/día + 100 mg dexametasona/kg/día): Acentuación de las alteraciones descritas en el grupo 2. Hígado. Embebido en parafina, tricrómico de Masson. Micrografía de luz. Barra: 20 μ m. F) Grupo 1 (Control negativo): núcleos negativos a la fragmentación de la cromatina (flechas rojas), vena central (flecha verde). G) Grupo 2 (100 mg de dexametasona/kg/día): Se observan células con núcleos positivos (flechas amarillas), vena central (flecha verde). H) Grupo 3 (30 mg *R. graveolens*/kg/día), I) Grupo 4 (100 mg *R. graveolens*/kg/día), J) Grupo 5 (100 mg *R. graveolens*/kg/día + 100 mg dexametasona/kg/día): Destaca como se incrementa el número de células positivas. Hígado. Embebido en parafina, TUNEL. Micrografía de luz. Barra: 20 μ m. K) Grupo 1 (Control negativo): núcleos positivos a PCNA (flecha azul), vena central (flecha verde). L) Grupo 2 (100 mg de dexametasona/kg/día), M) Grupo 3 (30 mg *R. graveolens*/kg/día), N) Grupo 4 (100 mg *R. graveolens*/kg/día), Ñ) Grupo 5 (100 mg *R. graveolens*/kg/día + 100 mg dexametasona/kg/día): Destaca como disminuye el número de células positivas. Hígado. Embebido en parafina, inmunohistoquímica. Micrografía de luz. Barra: 20 μ m.



Análisis Morfométrico



Análisis Densitométrico



G

Por otra parte, empleando anticuerpos monoclonales específicos anti-PCNA se observó que en el grupo 1 se presentó la mayor cantidad de células positivas (Fig. 1K); seguido por los grupos 3 (Fig. 1M), 2 (Fig. 1L), y 4 (Fig. 1N). Llama la atención que el grupo 5 mostró el menor número de células positivas (Fig. 1Ñ).

Otro hallazgo importante en este estudio, fue la disminución en la positividad de bcl-2 en el citoplasma de los hepatocitos: en el grupo 1 se observó la mayor cantidad de hepatocitos positivos (Fig. 2B), seguido de los grupos 3 (Fig. 2D), 2 (Fig. 2C), 4 (Fig. 2E) y finalmente el grupo 5 que mostró la menor positividad (Fig. 2F).

Análisis morfométrico. Los resultados observados en la evaluación inmunohistoquímica se corroboraron en el análisis morfométrico. Para la prueba de TUNEL se observó que el mayor número de células positivas correspondió al grupo 5: $25,670 \pm 1,404$, seguido de los grupos 4 y 2: $15,290 \pm 1,888$ y $10 \pm 2,032$, respectivamente. Los grupos 3 y 1 mostraron menor número de células positivas: $4,333 \pm 1,092$ y $0,333 \pm 0,223$ respectivamente. Al comparar estadísticamente los resultados obtenidos de los grupos de estudio se encontró diferencia estadística significativa para un valor de $p \leq 0,05$ (Fig. 2A).

Por otra parte, en la cuantificación de PCNA se observó que el grupo 1 presentó la mayor cantidad de células positivas: $23,220 \pm 0,288$, el grupo 3: $18,58 \pm 1,134$, posteriormente los grupos 2 y 4: $12,333 \pm 0,795$ y $11,333 \pm 2,666$ respectivamente. Destaca que el grupo que mostró la menor cantidad de células positivas fue el grupo 5: $5,320 \pm 0,544$. Al contrastar los resultados de los grupos experimentales *versus* el grupo control negativo se observó diferencia estadística significativa para un valor de $p \leq 0,05$ (Fig. 2A).

Finalmente en el análisis densitométrico de la positividad de bcl-2 se corroboraron los resultados observados en el análisis inmunohistoquímico, en donde destaca que el grupo 5 mostró el menor valor de positividad en contraste con el grupo 1 que mostró el mayor valor para este marcador. Al contrastar los resultados de los grupos experimentales *versus* el grupo control negativo se observó diferencia estadística significativa para un valor de $p \leq 0,05$ (Fig. 2G).

DISCUSION

En la literatura existen numerosos estudios que describen el empleo de *R. graveolens* en la medicina tradicional (Oliva *et al.*, 2003; González-Trujano *et al.*, 2006; Seak & Lin, 2007; Ratheesh *et al.*; Varamini *et al.*, 2009; Freire *et al.*, 2010). Sin embargo, a la fecha no se describe desde el punto de vista morfológico la inducción de apoptosis y el efecto antiproliferativo del extracto acuoso de esta planta, sobre el hígado de ratas Wistar. Los resultados de nuestro estudio demuestran por primera vez que la exposición a concentraciones de 30 y 100 mg de un extracto acuoso de *R. graveolens*/kg/día inducen alteraciones morfológicas en el hígado de ratas Wistar. Este efecto se incrementó cuando se utilizó una combinación de 100 mg del extracto/kg/día y 100 mg de dexametasona/kg/día.

En la evaluación histológica del grupo 2 se confirmaron los hallazgos de pérdida de la arquitectura normal de este órgano, signos de necrosis, esteatosis microvesicular en los hepatocitos, así como los signos sugestivos de apoptosis. Estos resultados se correlacionan con lo descrito por Roma *et al.* (2009) que describen que la dexametasona es capaz de inducir apoptosis.

En el grupo 3 se observó congestión vascular y hemorragia en los capilares sinusoidales, además de signos leves de esteatosis, necrosis y apoptosis. Destaca que estas alteraciones se incrementaron en el grupo 4, y se acentuaron en el grupo 5. Estos resultados sugieren un posible efecto aditivo o sinergista entre los compuestos presentes en el extracto y la dexametasona (Han *et al.*, 2011).

La presencia de hemorragia observada en los grupos 3, 4 y 5 podría estar asociada a la presencia de cumarinas y sus compuestos derivados en *R. graveolens* (Orlita *et al.*, 2008; Ratheesh *et al.*). Estos compuestos tienen como órganos blanco de toxicidad 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 (Bye & King, 1970, Pineda-Ruiz, 2009).

Fig. 2. A). Gráfica que muestra los resultados del análisis morfométrico para TUNEL y PCNA 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. * = $p \leq 0,05$. K) Grupo 1 (Control negativo): nótese la intensa positividad para bcl-2 en el citoplasma de los hepatocitos (flecha blanca), núcleos (flecha verde), vena central (flecha amarilla). L) Grupo 2 (100 mg de dexametasona/kg/día), M) Grupo 3 (30 mg *R. graveolens*/kg/día), N) Grupo 4 (100 mg *R. graveolens*/kg/día), Ñ) Grupo 5 (100 mg *R. graveolens*/kg/día + 100 mg dexametasona/kg/día): Destaca como disminuye la positividad para este marcador en el citoplasma de los hepatocitos. Hígado. Embebido en parafina, inmunohistoquímica. Micrografía de luz. Barra: 20 μ m. G). Gráfica que muestra los resultados del análisis densitométrico de la positividad de bcl-2 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. * = $p \leq 0,05$.

Un hallazgo importante de este trabajo fue la observación de manera simultánea de necrosis y apoptosis, que aunque son dos tipos diferentes de muerte celular pueden tener traslapes en una respuesta celular ante un compuesto tóxico a la misma dosis administrada; 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 muestran que ambos tipos de muerte celular pueden ser inducidos por el extracto de *R. graveolens*. La presencia simultánea de necrosis y apoptosis *in vivo* ha sido descrito también por Soto-Domínguez *et al.* (2005) en el riñón de ratones CD-1 intoxicados con Peroxisomicina A1, un compuesto aislado de la planta *Karwinsia parvifolia*.

En el análisis inmunohistoquímico con la técnica de TUNEL se observaron resultados negativos en el grupo 1. En los grupos 2 y 3 se identificaron escasos núcleos de células endoteliales y hepatocitos positivos a la fragmentación de la cromatina. La fragmentación de la cromatina es uno de los eventos de la cascada de apoptosis por la activación de endonucleasas endógenas (Schmitz *et al.*, 1991; Compton, 1992; Gavrieli *et al.*). Además en el grupo 4 se observó una mayor cantidad de núcleos positivos. Destaca que el mayor número de células positivas para esta prueba se observó en las muestras del grupo 5. Estos resultados se correlacionan con los reportados en un estudio *in vitro*, que demuestra la inducción de apoptosis por extractos de *R. graveolens* sobre líneas celulares cancerosas de glioma humano MGR1, leucemia promielomonocítica HL-60 y melanoma metastático murino K1735 (Pathak *et al.*, 2003). En este mismo estudio se describe que pacientes con gliomas y tratados con un extracto etanólico de *R. graveolens* mostraron disminución de los tumores, y se sugiere que el mecanismo de acción es por la inducción de apoptosis por el extracto (Pathak *et al.*). Otro estudio *in vitro* describe daño en el DNA y disminución de la viabilidad de líneas celulares tumorales de próstata, mama y colon por un extracto metanólico de *R. graveolens* (Fadlalla *et al.*, 2011).

Por otra parte, al emplear anticuerpos monoclonales específicos anti-PCNA se observó que en el grupo 1 se presentó la mayor cantidad de células positivas, seguido de los grupos 3, 2, 4 y finalmente el grupo 5 que mostró un menor número de células positivas a este marcador. Esta proteína se sintetiza en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular, y favorece la síntesis de ADN (Matsumoto *et al.*; Zhang *et al.*). Por lo que el efecto antiproliferativo observado en este estudio, pudiera estar asociado con lo observado en un estudio *in vitro* con un extracto metanólico de *R. graveolens*, sobre líneas celulares tumorales de próstata, mama y colon. En este se describe que el extracto indujo arresto en G2/M, bloqueo de la vía de señalización de Akt y disminución de la

ciclina B1 (Fadlalla *et al.*), esto resulta en disminución de la proliferación y supervivencia celular.

Otro hallazgo importante en este estudio fue que se observó disminución en la positividad de bcl-2 en el citoplasma de los hepatocitos. En el grupo 1 se observó la mayor cantidad de hepatocitos positivos, seguido de los grupos 3, 2, 4 y finalmente el grupo 5 que mostró la menor positividad. La inhibición del proceso de apoptosis está estrechamente relacionada con la proteína mitocondrial bcl-2 (Vaux *et al.*; Hockenberry *et al.*; Renvoize *et al.*; Mignote & Vayssiere). Por lo que nuestros resultados sugieren que la disminución de bcl-2 (con función anti-apoptósica), permite la activación de la cascada de apoptosis dependiente de caspasas, como ha sido descrito *in vitro* con líneas celulares tumorales de próstata, mama y colon, en donde se describe que un extracto metanólico de *R. graveolens* indujo la activación de caspasa-3 (Fadlalla *et al.*). Los resultados cualitativos observados en la evaluación inmunohistoquímica se corroboraron en los análisis morfométrico y densitométrico, en donde llama la atención la inducción de apoptosis dosis-dependiente, así como el efecto antiproliferativo por *R. graveolens*. Estos resultados se correlacionan con los efectos citotóxicos y antiproliferativos citados anteriormente, así como con lo observado en un estudio utilizando con un extracto metanólico de *R. graveolens* sobre líneas celulares tumorales *in vitro*, y en ratones BALB/c con las células tumorales implantadas y tratados con el extracto (Preethi *et al.*, 2006).

En la actualidad, la inducción de apoptosis por un fármaco contra el cáncer se ha convertido en un factor de importancia en el tratamiento de esta enfermedad. En este trabajo se describe el potencial apoptótico y antiproliferativo del extracto acuoso de *R. graveolens* del norte de México sobre el hígado de rata Wistar. Se sugiere el empleo de dosis menores del extracto, con el fin de investigar su posible utilidad como agente antineoplásico, en estudios *in vitro* con líneas celulares tumorales e/o implantadas en modelos murinos de cáncer.

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

AGRADECIMIENTOS. Agradecemos el valioso apoyo en el manejo de animales a la MVZ Katty González Pineda. A CONACYT, por la beca económica para la realización de los estudios de maestría de Edith F. Martínez-Pérez. También se agradece a QCB Silvia M. García y QFB Adriana I. Gallardo-Gómez por el apoyo técnico en la inmunohistoquímica.

SOTO-DOMÍNGUEZ, A.; SERRANO-GALLARDO, L. B.; GARCÍA-GARZA, R.; RUÍZ-FLORES, P.; MORÁN-MARTÍNEZ, J.; NAVA-HERNÁNDEZ, M. P. & MARTÍNEZ-PÉREZ, E. F. Aqueous extract of *Ruta graveolens* from the north of Mexico causes apoptosis and shows antiproliferative effect on the liver of Wistar rat: morphological evidence. *Int. J. Morphol.*, 31(4):1340-1348, 2013.

SUMMARY: *Ruta graveolens*, is a native plant of the Eastern Mediterranean and the South Western area of Asia. From this plant, more than 120 chemical compounds have been isolated. In a previous study in our laboratory, we observed that an aqueous extract of *R. graveolens*, caused necrosis and morphological alterations suggestive of apoptosis on the liver of Wistar rats. The objective of this study, was to evaluate the induction of apoptosis and a possible antiproliferative effect *in vivo* of an aqueous extract of *R. graveolens* from the north of Mexico, by immunohistochemical methods. 25 Wistar rats were used and divided into 5 groups (n= 5). Group 1 corresponded to 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*/kg/day respectively. Group 5 received the administration of 100 mg of dexamethasone/kg/day combined with 100 mg of extract of *R. graveolens*/kg/day. The administrations were by intraperitoneal via for three days. The animals were sacrificed by cervical dislocation, liver samples were taken, fixed in formalin and then samples were embedded in paraffin blocks. Histological sections were obtained and stained with Masson trichrome method. Immunohistochemical assays of TUNEL, anti-bcl-2, and anti-PCNA were performed. Also a morphometric study was carried out. Results show for the first time the potential apoptotic and antiproliferative effect of an aqueous extract of *R. graveolens* from the north of Mexico on the liver of Wistar rats. This suggests the use of lower doses of the extract of *R. graveolens*, to investigate its potential use as an antineoplastic agent, in studies *in vitro* with tumor cell lines and/or implanted in murine models of cancer.

KEY WORDS: *Ruta graveolens*; Apoptosis; Antiproliferative effect.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bye, A. & King, H. K. The biosynthesis of 4-hydroxycoumarin and dicoumarol by *Aspergillus fumigatus Fresenius*. *Biochem. J.*, 117(2):237-45, 1970.
- Compton, M. M. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev.*, 11(2):105-19, 1992.
- Erickson, G. F. Defining apoptosis: players and systems. *J. Soc. Gynecol. Investig.*, 4(5):219-28, 1997.
- Eastman, A. Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells*, 2(8-9):275-80, 1990.
- Fadlalla, K.; Watson, A.; Yehualaeshet, T.; Turner, T. & Samuel, T. *Ruta graveolens* extract induces DNA damage pathways and blocks Akt activation to inhibit cancer cell proliferation and survival. *Anticancer Res.*, 31(1):233-41, 2011.
- Fraser, A. & Evan, G. A license to kill. *Cell*, 85(6):781-4, 1996.
- 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.
- Gavrieli, Y.; Sherman, Y. & Ben-Sasson, S. A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119(3):493-501, 1992.
- Gonzalez-Trujano, M. E.; Carrera, D.; Ventura-Martinez, 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.
- Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770-6, 2000.
- Hickman, J. A. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer Metastasis Rev.*, 11(2):121-39, 1992.
- Hockenbery, D.; Nuñez, G.; Millman, C.; Schreiber, R. D. & Korsmeyer, S. J. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature*, 348(6299):334-6, 1990.
- 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.
- Kerr, J. F. R.; Winterford, C. M. & Harmon, B. V. *Morphological Criteria for Identifying Apoptosis*. In: Celis, J. E. (Ed.). *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. London, Academic Press Inc., 1994. pp.319-29.
- Kerr, J. F.; Gobé, G. C.; Winterford, C. M. & Harmon, B. V. Anatomical methods in cell death. *Methods Cell Biol.*, 46:1-27, 1995.
- Lake, B. G. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.*, 37(4):423-53, 1999.
- Majno, G. & Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, 146(1):3-15, 1995.

- Matsumoto, K.; Moriuchi, T.; Koji, T. & Nakane, P. K. Molecular cloning of cDNA coding for rat proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin. *EMBO J.*, 6(3):637-42, 1987.
- Mignotte, B. & Vayssiere, J. L. Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.*, 252(1):1-15, 1998.
- 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.; Lojkowska, E. & Stepnowski, P. Effective biotic elicitation of *Ruta graveolens* L. shoot cultures by lysates from *Pectobacterium atrosepticum* and *Bacillus sp.* *Biotechnol. Lett.*, 30(3):541-5, 2008.
- Pathak, S.; Multani, A. S.; Banerji, P. & Banerji, P. Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for human brain cancer. *Int. J. Oncol.*, 23(4):975-82, 2003.
- Pathak, S.; Multani, A. S.; Banerji, P. & Banerji, P. Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for human brain cancer. *Int. J. Oncol.*, 23(4):975-82, 2003.
- Pineda-Ruiz, J. C. Sobreanticoagulación con warfarina. *Arch. Med.*, 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.
- Preethi, K. C.; Kuttan, G. & Kuttan, R. Anti-Tumour Activity of *Ruta graveolens* Extract. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 7(3):439-43, 2006.
- 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.
- Renvoize, C.; Roger, R.; Moulian, N.; Bertoglio, J. & Bréard, J. Bcl-2 expression in target cells leads to functional inhibition of caspase-3 protease family in human NK and lymphokine-activation killer cell granule-mediated apoptosis. *J. Immunol.*, 159(1):126-34, 1997.
- 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.
- Schmitz, G. G.; Walter, T.; Seibl, R. & Kessler, C. Nonradioactive labeling of oligonucleotides *in vitro* with the haptin digoxigenin by tailing with terminal transferase. *Anal. Biochem.*, 192(1):222-31, 1991.
- Seak, C. J. & Lin, C. C. *Ruta graveolens* intoxication. *Clin. Toxicol. (Phila.)*, 45(2):173-5, 2007.
- Soto-Domínguez, A.; Ballesteros-Elizondo, R. G.; Saucedo-Cárdenas, O.; Piñeyro-López, A. & Sepúlveda-Saavedra, J. Peroxisomicine A1 causes apoptosis in liver, kidney and lung: biochemical and morphological evidence. *Mol. Biol. Cell*, 16(12):5465-901, 2005.
- Tang, J. Y. & Ren, M. X. Sex allocation and functional bias of quaternary and quinary flowers on same inflorescence in the hermaphrodite *Ruta graveolens*. *Acta Oecol.*, 37(5):449-54, 2011.
- 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.
- Vaux, D. L.; Cory, S. & Adams, J. M. Bcl-2 gen promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*, 335(6189):440-2, 1988.
- Willye, A. H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756):555-6, 1980.
- Wyllie, A. H. & Duvall, E. *Cell injury and death*. In: McGee, J. O. D.; Isaacson, P. G. & Wright, N. A. (Eds.). Oxford Textbook of Pathology. Oxford, Oxford University Press, 1992. pp.141-57.
- Zhang, G.; Gibbs, E.; Kelman, Z.; O'Donnell, M. & Hurwitz, J. Studies on the interactions between human replication factor C and human proliferating cell nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96(5):1869-74, 1999.

Correspondence to:

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 : 22-01-2013

Aceptado: 10-08-2013