

Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L. «ruda», en ratón (*Mus musculus*)

Embryotoxic and teratogenic effect of *Ruta chalepensis* L. «rue», in mouse (*Mus musculus*)

José Gonzales, Victor Benavides, Ruth Rojas y José Pino

Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi

José Gonzales: Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Casilla Postal 11-058. Lima 11. Lima, Perú. Email: ppgonda@gmail.com

Resumen

Ruta graveolens L. y *R. chalepensis* L. son plantas usadas en medicina folclórica como antiespasmódicos, antihelmínticos, antimicrobianos, emenagogos y abortivos. En el presente trabajo se evaluó el efecto del extracto acuoso liofilizado (EAL) de las hojas de *R. chalepensis* en embriones postimplantacionales de ratón. Ratonas albinas preñadas recibieron intraperitonealmente (ip) 10 mg de ruda liofilizada/kg de peso corporal (grupo tratado, n=12) durante el periodo post-implantacional (día 9 – día 17 post-cópula), y un grupo control(C), n=18, que recibió sólo agua destilada durante el mismo periodo. El EAL de ruda no afectó negativamente el peso de la madre pero sí del útero durante el tratamiento ($p<0,05$). En el grupo tratado la frecuencia de reabsorciones fetales fue mayor ($p<0,05$) y el peso fetal fue significativamente menor en comparación con el control ($p<0,01$). Además en el grupo tratado se evidenció la presencia de malformaciones esqueléticas. En conclusión, encontramos que el EAL de *R. chalepensis* muestra efectos embriotóxicos en ratones expuestos durante el periodo postimplantacional.

Palabras clave: *Ruta chalepensis*, embriotoxicidad, teratogenicidad, ratón, postimplantacional.

Abstract

Ruta graveolens L. and *R. chalepensis* L. are plants used in folkloric medicine as antispasmodics, antihelmintics, antimicrobials, emmenagoges and abortifacients. In this work we evaluated embryotoxic effect of liophilized aqueous extract (LAE) of leaves of *R. chalepensis* on postimplantational mouse embryos. Pregnant albino mice received intraperitoneally (ip) 10 mg of liophilized rue/kg of body weight (treated group, n=12) during post implantational period (day 9 - day 17 postcopula), and a control (C) group, n=18, received only distilled water during the same period of time. The LAE of *R. chalepensis* did not affect negatively the weight of mother but affected the weight of the uterus during the period of treatment ($p<0,05$). The frequency of fetal resorptions was greater ($p<0,05$) and a significant decrease of fetal weight ($p<0,01$) was evidenced in fetuses of the treated group in comparison with the C group. Also there was occurrence of skeletal malformations in the treated group. In conclusion, we found that LAE of *R. chalepensis* shows embryotoxic effects on mouse exposed during postimplantational period.

Keywords: *Ruta chalepensis*, embriotoxicity, teratogenicity, mouse, postimplantational.

Introducción

La exposición materna a xenobióticos durante el embarazo puede tener diversos efectos en el desarrollo del embrión dependiendo del periodo de la exposición (Lemonica, 1996). La sincronización de la exposición a una droga es crítica para sus posibles efectos teratogénicos sobre el feto; el periodo de mayor sensibilidad a compuestos teratogénicos es durante la organogénesis temprana (Stanley & Bower, 1986).

Ruta chalepensis L. (Rutaceae), «ruda», fue introducido en América después de la conquista española (Zeichen et al, 2000). Es frecuentemente usada por sus propiedades medicinales (Arenas & Savitry, 1994). Las hojas y yemas jóvenes contienen alcaloides, flavonoides, fenoles, aminoácidos, fucomarinas y saponinas (Hnatyszyn et al., 1974). La ruda también es conocida por tener actividad como emenagogo, antihelmíntico, espasmolítico, antirreumático (Fon Quer, 1962; Di Stasi et al., 1994; Chávez et al., 2003), antihipertensivo (Berdoncés, 1998), antiséptico para la piel y repelente (Guarrera, 1999; González, 1998), antifúngica e insecticida (Mancebo et al., 2002; Trovato et al., 2000; Ojala et al., 2000). Ruda puede causar también sangrado uterino en mujeres embarazadas, con posible muerte fetal (Camargo, 1985 citado

por Melito et al., 2003). Reportes de etnobotánica indican que es consumida por gente indígena para promover la menstruación, la expulsión fetal y como abortivo (Conway & Slocumb, 1979). Guerra & Andrade (1978) y Kong et al., (1989), encontraron efectos de la ruda en la implantación de embriones y un aumento de reabsorciones uterinas; mientras que estudios de Gonçalves et al. (2005) no confirmaron estos efectos. Algunos estudios sugieren un efecto negativos de *R. graveolens* sobre el desarrollo pre y postimplantacional en ratones (Benavides et al, 2000). En el presente trabajo se evaluó el efecto del extracto acuoso liofilizado (EAL) de las hojas de *R. chalepensis* sobre embriones postimplantacionales de ratón.

Materiales y métodos

R. chalepensis fue obtenido en comercios locales (Lima, Perú), e identificado en el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las hojas fueron secadas en una estufa a 55 °C por 24 horas luego pesadas y pulverizadas; el polvo fue dejado con agua destilada por 24 horas a 55 °C para obtener el extracto acuoso, el cual fue filtrado y liofilizado. Luego el extracto acuoso liofilizado de ruda fue resuspendido en agua destilada y guardada a -20 °C.

Tabla 1. Ganancia de peso materno en ratones hembra tratadas intraperitonealmente con extracto acuoso liofilizado de *R. chalepensis* (10 mg/kg) o agua destilada del día 9 al 17 del período de gestación.

	Control	10mg/kg
Hembras preñadas	18	12
Peso de útero con fetos (g)	9,43 ± 0,99	3,57 ± 1,22*
Peso materno		
Día 1	27,71 ± 1,00	26,95 ± 0,73
Día 9	30,06 ± 0,90	30,33 ± 0,71
Día 18	40,96 ± 1,64	34,49 ± 1,67*
Día 18 corregido (menos el peso del útero)	31,53 ± 1,07	30,92 ± 0,75
Ganancia de peso materno (g)		
Día 1-9	2,35 ± 0,41	3,40 ± 0,35
Día 9-18	10,93 ± 1,00	4,08 ± 1,42*
Día 1-18	12,70 ± 1,07	7,54 ± 1,61*
Día 1-18 corregido (menos el peso del útero)	3,84 ± 0,61	3,98 ± 0,89

Control vs. tratado *P<0,05 Datos paramétricos; ANOVA test y Bonferroni t-test. Datos no Paramétricos; Kruskal-Wallis y Mann-Whitney Utest SE. error estandar de la media

Se utilizaron ratones de 6 a 10 semanas de edad de la cepa albina Swiss Rockefeller. Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándar con 22-24 °C de temperatura; fotoperíodo (14h luz: 10h oscuridad) con libre acceso al alimento (Purina-Perú) y agua *ad libitum*.

Ratones hembra, en etapa de estro o proestro, fueron cruzadas con un macho semental toda la noche y la presencia del tapón vaginal al día siguiente fue señal de que ocurrió la cópula y fue tomado como día 1 (D1) de la preñez. Las ratonas preñadas fueron divididas en dos grupos; el grupo tratado (n=12) que recibió intraperitonealmente (ip) 10 mg de ruda liofilizada/kg de peso corporal durante el período post-implantacional (día 9 – día 17 post-cópula), y un grupo control (C) (n=18) que recibió sólo agua destilada ip durante el mismo período de tiempo.

El día 18 post-cópula, las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical. Cada útero con fetos fue pesado y evaluado a fin de determinar: número de sitios de implantación, fetos vivos, muertos y reabsorciones fetales; además se contaron el número de cuerpos lúteos en los ovarios. Las malformaciones externas fueron inmediatamente evaluados en los fetos vivos, los cuales luego fueron pesados y subsecuentemente aclarados con hidróxido de potasio 1% y coloreados con rojo de Alizarina y azul Alciano para la evaluación esquelética (Kimmel & Trammel, 1981; Narotsky & Rogers, 2000).

La unidad de comparación fue la ratona preñada o la camada (Narotsky & Rogers, 2000). Las hembras que murieron o tuvie-

ron sólo un sitio de implantación fueron excluidas del análisis estadístico. Los datos paramétricos fueron analizados por ANOVA y los no paramétricos por la prueba de Kruskal-Wallis y los resultados corroborados por Bonferroni t-test y Mann-Whitney U-test respectivamente. Un nivel de probabilidad menor del 5% fue considerado significativo.

Resultados

No hubo muerte materna en este trabajo. El peso del útero fue menor en el grupo tratado con ruda en comparación del grupo control (Tabla 1). Los parámetros reproductivos como fetos vivos y peso fetal fueron menores, mientras que el número de reabsorciones fetales se incrementó en el grupo tratado en comparación del grupo control (Tabla 2). Anomalías externas como exocefalia fueron observadas en ambos grupos mientras que la malformación de espina bífida solo se observó en el grupo tratado con ruda. Hubo ocurrencia de malformaciones esqueléticas como hemivértebra en los tratados con *R. chalepensis*.

Discusión

En trabajos con *R. graveolens*, Gonçalves et al., (2005) no encontró indicios de toxicidad materna en ratones, pero observó diferencias significativas en el peso del feto; en contraste con Melito et al., (2003) que no encontró ninguna diferencia en el peso fetal por camada; mientras que en nuestro trabajo el extracto acuoso liofilizado de *R. chalepensis* administrado ip no mostró toxicidad materna pero se evidenció diferencias significativas en el peso fetal. Almeida y Lemonica(2000) consideran que el peso fetal no es un

Tabla 2. Parámetros reproductivos en ratones hembra tratados con extracto acuoso liofilizado de *R. chalepensis* (10 mg/kg) o agua destilada del día 9 al 17 del período de gestación.

	Control	10mg/kg
Número de madres preñadas	18	12
Número de cuerpos lúteos	10,33 ± 0,59	10,42 ± 1,15
Sitios de implantación (mean ± S.E.)	7,89 ± 0,76	8,83 ± 0,88
Fetos vivos (mean ± S.E.)	6,11 ± 0,91	2,67 ± 1,05*
Reabsorciones (mean ± S.E.)	1,22 ± 0,33	4,25 ± 1,08*
Fetos muertos (mean ± S.E.)	0,56 ± 0,34	1,92 ± 0,90
Peso fetal (g) (mean ± S.E.)	0,93 ± 0,03	0,72 ± 0,06*
Peso total de la camada (mean ± S.E.)	5,81 ± 0,69	4,51 ± 0,53

Control vs. tratado *P<0,05 Datos paramétricos; ANOVA test y Bonferroni t-test. Datos no Paramétricos; Kruskal-Wallis y Mann-Whitney Utest SE. error estandar de la media

parámetro concluyente en los estudios de desarrollo debido a que esto puede variar dependiendo del número fetos de la camada. Con respecto a los parámetros reproductivos, los datos muestran que *R. chalepensis* provoca una variación negativa en el número de fetos vivos; además, se evidenció un incremento del número de reabsorciones fetales. Existen pocos reportes sobre toxicidad fetal provocado por esta especie de ruda, los trabajos existentes son en *R. graveolens* que utilizan extractos alcohólicos o con cloroformo, obteniendo diferentes resultados (Gonçalves et al., 2005; Melito et al., 2005).

Zeichen et al., (2000) reportó que *R. chalepensis*, tiene un efecto embriotóxico, realizó evaluaciones histopatológicas, hallando la inhibición del desarrollo del timo que alteraría la migración celular en el sistema nervioso central, provocando que los ratones disminuyan de peso.

En este trabajo la exposición a *R. chalepensis* fue durante el período organogénico, fase más sensible a xenobióticos, con la intención de evaluar el posible efecto embriotóxico y teratogénico de esta planta.

Sin embargo el alto índice de embriotoxicidad provocado por *R. chalepensis*, no hizo posible hacer conclusiones con respecto a su efecto teratogénico, ya que disminuyó el número de camadas con fetos; en los pocos fetos evaluados se evidenció malformaciones como hemivertebra, exocefalia y espina bifida, mas no es posible aseverar que estas ocurrencias sean debido al tratamiento; esto hace necesario la evaluación de un mayor número de camadas para poder determinar sus efectos teratogénicos.

En conclusión, encontramos que el extracto acuoso liofilizado de *R. chalepensis*, administrado durante el periodo de organogénesis muestra efectos embriotóxicos en ratones, por esa razón se sugiere no considerar su uso durante el periodo de preñez.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a la Bióloga Guadalupe D'Arrigo por su apoyo en la obtención del liofilizado del extracto acuoso de la planta

Literatura citada

Almeida F., I Lemonica. 2000. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *J Ethnopharmacol.* 73:53-60.
 Arenas P., G.P. Savitry. 1994 La ruda: *Ruta chalepensis* (L.) Rutaceae. *Dominguezia.* 11:7-25.
 Benavides V., G. Trujillo, G. D'Arrigo, U. Paredes, J. Pino. 2000. «Evaluación toxicológica preliminar de *Ruta graveolens*, *Origanum vulgare* y *Persea americana* sobre embriones preimplantacionales de ratón». *Rev Per Biol.* 7(1):86-88.

Berdoncés JL. 1998. Gran Enciclopedia de Las Plantas Medicinales. Barcelona: Tikal
 Chávez M., I. Franco, M. González, M. Tlatenco. 2003. Tradición Herbolaria y Remedios Caseros. México City: Ce-Ácatl, A.C. 80-81 pp.
 Conway G.A., J.C. Slocumb. 1979. Plants used as abortifacients and emmenagoges by Spanish New Mexicans. *J Ethnopharmacol.* 1:241-61.
 Di Stasi L.C., C.A. Hiruma, C.M. Guimaraes. 1994. Medicinal plants used in Brazilian Amazon. *Fitoterapia.* 65:529-540.
 Fon Quer P. 1962. Plantas Medicinales. Labor, Buenos Aires, 426 pp.
 Gonçalves T., P. Martins, T. Montanari. 2005. Effects of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. *Contraception.* 71:74-7.
 González M. 1998. Plantas Medicinales del Noreste de México. Monterrey, México: IMSS-Vitro.
 Guarrera P.M. 1999. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol.* 68(1-3):183-192.
 Guerra M.O., A.T. Andrade. 1978. Contraceptive effects of native plants in rats. *Contraception.* 18:191-9.
 Hnatyszyn O., P. Arenas, A. Moreno, R. Rondita, J.D. Coussio. 1974. Plantas reguladoras de la fecundidad según la medicina folklórica. *Rev Soc Cien.* 14:37 pp.
 Kimmel C.A., C. Trammel. 1981. A rapid procedure for routine staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technol.* 56:271-3.
 Kong Y.C., C.P. Lau, K.H. Wat, et al. 1989. Antifertility principle of *Ruta graveolens*. *Planta Med.* 55:176-8.
 Lemonica I.P. 1996. In: Oga, S. (Ed.), *Fundamentos de Toxicología.* Atheneu, Sao Paulo.
 Mancebo F., L. Hilje, G.A. Mora, et al. 2001. Biological activity of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) and *Sechium pittieri* (Cucurbitaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera :Pyralidae) larvae. *Rev Biol Trop.* 49(2):501-508.
 Melito A.L., M.M. Bernardi, J.C. Florio. 2003. Avaliação da embriofetotoxicidade do extrato bruto de *Ruta graveolens* L. Administrado a camundongos em diferentes períodos de gestação. *Rev Brasil Toxicol.* 16:63-70.
 Narotsky M., J. Rogers. 2000. Chapter 14. Examination of the axial skeleton of fetal rodents. En: Tuan R. & Lo C (Eds). *Methods in Molecular Biology Vol.135. Developmental Biology Protocols.* Vol. I. pp: 139-150. Humana Press. Totowa, NJ.
 Ojala T., S. Remes, P. Haansuu, et al. 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J Ethnopharmacol.* 73(1-2):299-305.
 Stanley F.J., C. Bower. 1986. «Teratogenic drugs in pregnancy». *Med J Australia.* 145:596-599
 Trovato A., M.T. Monforte, A.M. Forestieri, F. Pizzimenti. 2000. In vitro anti-mycotic activity of some medicinal plants containing flavonoids. *Boll Chim Farm.* 139(5):225-227.
 Zeichen de Sa R., A. Rey, E. Argañaraz, E. Bindstein. 2000. Perinatal toxicology of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) in mice. *J Ethnopharmacol.* 69:93-98

