



Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en células Vero sometidas a alta glucosa

Protective effect of the root of *Ruellia tuberosa* L. on antioxidant enzymes activity in Vero cells subjected to high glucose

CARLOS CIANGHEROTTI^{1*}, GIOVANNINA ORSINI^{2**}, MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN^{3***}, MARÍA RODRÍGUEZ⁴, JAIRO BERMÚDEZ⁴, ANITA ISRAEL^{1****}

Resumen

El estrés oxidativo es el resultado de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en el contexto de mecanismos antioxidantes insuficientes. El estrés oxidativo intrarrenal juega un papel fundamental en el inicio y la progresión del daño renal en la diabetes. La evidencia indica que en los riñones, la sobreproducción de EROs es el denominador común que vincula a la alteración de las vías metabólicas con alteración de la hemodinamia renal asociada con la nefropatía diabética. Existen varios mediadores celulares de la nefropatía diabética, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otras. En la búsqueda de fármacos capaces de abolir, disminuir o prevenir la nefropatía diabética se han descrito nuevas especies, fitofármacos y productos naturales para el tratamiento no sólo de la diabetes, sino también de sus complicaciones. La *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) es una de estas plantas de uso etnomédico, cuyas partes aéreas presentan actividad: antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria y analgésica. Sin embargo, su raíz ha sido menos estudiada. Nosotros hemos reportado la actividad analgésica, antiinflamatoria, antidiabética, del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) en animales de experimentación. Con el fin de profundizar en los mecanismos moleculares de la acción de la RT, se evaluó su capacidad protectora *in vitro* en células de epitelio renal (Vero) en cultivo, sometidas a altas concentraciones de glucosa. Los resultados muestran que la RT protegió a las células Vero del estrés oxidativo y del estrés nitrosativo, inducido por la alta glucosa, por el peróxido de hidrógeno y por el nitroprusiato de sodio, respectivamente. Igualmente, la RT contrarrestó el decremento de la actividad enzimática de la CAT, SOD total, CuZn-SOD, GPx y GR inducida por la glucosa *in vitro*. Estos resultados establecen a la RT como un antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes *in vitro*, a través de un mecanismo que involucra la disminución del estrés oxidativo y nitrosativo. Estos hallazgos contribuyen a la validación del uso tradicional de la RT, así como a la caracterización farmacológica de su género.

Palabras clave: *Ruellia tuberosa* L., estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno, especies reactivas de nitrógeno, enzimas antioxidantes, glucotoxicidad

Abstract

Oxidative stress results from the overproduction of reactive oxygen species (ROS) in the context of concomitant insufficient antioxidant pathways. Intrarenal oxidative stress plays a critical role in the initiation and progression of diabetic kidney disease. Evidence indicates that in the kidneys ROS overproduction is the common denominator linking altered metabolic pathways with impaired renal hemodynamics known to be associated with diabetic nephropathy. Various cellular mediators of diabetic nephropathy, reactive oxygen, and nitrogen species, among others, are known. In the search for drugs that are capable of abolishing, reducing, or preventing diabetic nephropathy, new species, phytopharmaceuticals, and natural products have been described for the treatment not only of diabetes but also of its complications. *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) is one of these plants for ethnomedical use, whose aerial parts have been extensively studied, finding antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activity. However, its root has been less studied. We have reported the analgesic, anti-inflammatory, and antidiabetic activity of the aqueous extract of the root of *R. tuberosa* (RT) in experimental animals. To get insight into the molecular mechanisms of RT action, its *in vitro* protective capacity was studied in renal epithelial cells (Vero) in culture, subjected to high concentrations of glucose. The results show that RT protected Vero cells from oxidative stress and nitrosative stress induced by high glucose, hydrogen peroxide, and sodium nitroprusside, respectively. Similarly, RT counteracted the decrease in enzymatic activity of CAT, total SOD, CuZn-SOD, GPx, and GR induced by glucose *in vitro*. These findings establish RT as an antioxidant with a protective effect on renal damage in diabetes *in vitro*, through a mechanism that involves the reduction of oxidative and nitrosative stress. These findings contribute to the validation of the RT's traditional use and the pharmacological characterization of its genus.

Keywords: *Ruellia tuberosa* L., oxidative stress, reactive oxygen species, reactive nitrogen species, antioxidant enzymes, glucotoxicity

1. Unidad de Neuropéptidos, 2. Herbario "Victor Manuel Ovalles", 3. Laboratorio de Farmacología, Facultad de Farmacia y 4. Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. ¹Correspondencia: carlosciangherotti@yahoo.com ; astern88@gmail.com

Orcid: [0000-0003-3760-8645](https://orcid.org/0000-0003-3760-8645)*

Orcid: [0000-0001-8932-9942](https://orcid.org/0000-0001-8932-9942)**

Orcid: [0000-0002-4439-9856](https://orcid.org/0000-0002-4439-9856)***

Orcid: [0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)****

DOI: [10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.11](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2022.85.1-2.11)

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

Recepción: 01/04/2022

Aprobación: 15/05/2022

Rev. Fac. Farmacia 85(1y2): 111-127. 2022

Introducción

En condiciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígenos (EROs) ejercen un papel importante en la señalización celular involucrada en la proliferación, diferenciación, apoptosis y defensa inmunitaria en varias líneas celulares, incluidas las células renales (Ozbek, 2012). Sin embargo, en situaciones patológicas, como la diabetes, la sobreproducción de EROs en el riñón está implicada en la inflamación renal, lo que afecta la estructura y función renal y posteriormente conduce al daño renal. La hiperglicemia induce la producción de EROs, estimula el reclutamiento de numerosas células inflamatorias y la producción de citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y factores de transcripción implicados en los procesos patológicos de la nefropatía diabética. El estrés oxidativo renal es a menudo la consecuencia de la regulación hacia arriba de la producción de las EROs inducida por enzimas prooxidantes y la depleción concomitante de antioxidantes (Jha y col., 2016). Dentro de estas especies se encuentran: el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 , el radical hidroxilo (OH \cdot) y el producto de la conjugación del $O_2^{\cdot-}$ con el óxido nítrico (NO), el peroxinitrito (ONOO $^-$). El $O_2^{\cdot-}$ es el producto de la reducción parcial del O_2 llevado a cabo principalmente en la mitocondria a través de la cadena de transporte de electrones, en los peroxisomas (ricos en oxidasas) y en la membrana plasmática por la acción de la NAD(P)H oxidasa (Bergendi y col., 1999; Dröge, 2002). Lee y col. (2003) observaron que tanto la inhibición del complejo I mitocondrial por la rotenona, como la inhibición de la NAD(P)H oxidasa por la apocinina, bloqueaban la producción de las EROs inducida por la glucosa en las células mesangiales y la secreción de

fibronectina en las células del epitelio tubular, sugiriendo la participación de los dos sistemas generadores de $O_2^{\cdot-}$ en el daño renal. Más aún, se ha reportado la sobreexpresión de algunas de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa, como la NOX-4 y la p22phox en los riñones de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) (Etoh y col., 2003), así como también en las células mesangiales sometidas a una alta concentración de glucosa *in vitro* (Xia y col., 2006).

Por su parte, el óxido nítrico (ON) es producto de la conversión de la L-arginina a citrulina mediante la acción de la sintasa del óxido nítrico (NOS), de la cual existen varias isoformas: la endotelial (eNOS), la neuronal (nNOS) y la inducible (iNOS). Adicionalmente, en la mitocondria se encuentra una variante de la nNOS con modificación postraduccional, denominada mNOS (Finocchietto y col., 2009; Stefano y Kream, 2011). El NO también se forma a partir otras fuentes, tal como es el caso de los nitritos citosólicos y mitocondriales a través de la acción de la nitrito reductasas (Stefano y Kream, 2011). Basu y col. (2008), demostraron que el citocromo C mitocondrial es capaz de catalizar la conversión de nitrito en NO, estableciéndose de esta manera una actividad nitrito reductasa de esta proteína clave en la vida y muerte de la célula. Recientemente, se identificó el gen mAtNOS1 que codifica para la proteína 1 asociada al NO (NOA1), una posible nueva sintasa, la cual está ligada a la regulación del NO mitocondrial y es necesaria para la modulación dependiente de O_2 de los complejos de la cadena respiratoria (Zemojtel y col., 2006; Heidler y col., 2011). Sin embargo, aún se desconoce la vinculación de estas nuevas fuentes de NO en la diabetes y en el daño renal en la diabetes.

Las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleídos son oxidados por las EROs, constituyendo así el daño oxidativo de la célula que conlleva la disfunción del tejido (Dröge, 2002). Sin embargo, las células cuentan con sistemas de defensa antioxidante para contrarrestar este daño (Yu, 1994). Las principales enzimas antioxidantes son la superóxido dismutasa dependiente de zinc y cobre (CuZn-SOD), la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GR), la hemooxigenasa 1, entre otras (Yu, 1994; Erdmann y col., 2008).

Las SODs catalizan la dismutación del O_2^- a H_2O_2 y O_2 , mientras que la CAT y la GPx reducen el H_2O_2 a H_2O . En pacientes con nefropatía diabética se ha observado una inhibición de la expresión de algunas de estas enzimas, tales como la CAT y la SOD, favoreciéndose así el desbalance oxidativo celular (Hodgkinson y col., 2003). Asimismo, algunos modelos de animales diabéticos que sobreexpresan la CAT o la SOD, presentan una significativa disminución del daño renal (Craven y col., 2001; DeRubertis y col., 2004; Brezniceanu y col., 2008) y de la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en las células renales en cultivo (Craven y col., 2001).

Las altas concentraciones de glucosa incrementan la formación de las EROs, tanto en las células mesangiales como en las del epitelio tubular (Ha y col., 2002 a,b). Este aumento del estrés oxidativo está asociado a la glucosa intracelular, ya que el pretratamiento con citocalacina B (un inhibidor del GLUT-1) bloquea la producción de las EROs en las células mesangiales (Ha y col., 2002a). Estas moléculas estimulan diversas cascadas de señalización dentro de las células renales, siendo consideradas

la proteína quinasa C (PKC), las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y la janus kinasa (JAK), como las principales mediadoras de los efectos de las EROs en relación con la nefropatía diabética (Lee y col., 2003; Marrero y col., 2006). La activación de estas vías de señalización estimula la expresión de algunas proteínas profibróticas por la acción de factores de transcripción, tales como: el NF- κ B, la AP-1 y la Sp-1 (Lee y col., 2003). De esta manera las EROs aumentan la expresión del TGF- β , del PAI-1 (el cuál disminuye la degradación de la matriz extracelular), de la fibronectina y del colágeno IV (Ha y col., 2001; Lee y col., 2003; Ha y Lee, 2003; Lui y Desai, 2005; Xia y col., 2006); trayendo como consecuencia la inducción de la transición epitelial-mesenquimal (EMT), la glomerulosclerosis y la proteinuria (Craven y col., 1997; Ha y Lee; 2003; Shah y col., 2007).

La hiperglicemia puede generar EROs en las células renales de manera indirecta a través de los productos de glicosilación avanzada (AGEs), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y la angiotensina II (ANG II) (Leehey y col., 2000; Scivitaro y col., 2000; Lee y col., 2003). Esta última, induce la producción de las EROs tanto en las células mesangiales como en las del epitelio tubular (Jaimes y col., 1998; Ha y col., 2002).

Los niveles de ambas especies, las EROs y las ERNs, dependen de la relación de producción inicial de O_2^- y de NO (NO/ O_2^-). Razones de NO/ O_2^- mayores que 10 traen como consecuencia nitrosación de proteínas lo que lleva a la entrada de la célula a un estado de reposo, siendo la ERN predominante el NO $^+$. Razones alrededor de 1 conducen a una máxima activación celular, en donde se produce activación de las proteasas, la oxidación de los dedos de

zinc "zinc fingers" y alteración de la función de varias proteínas, por nitración de éstas, todo esto mediado por la acción de la especie predominante bajo esas condiciones, el ONOO. Finalmente, relaciones menores o iguales a 0,5 promueven la oxidación y carbonilación de proteínas, la oxidación de ácidos nucleicos y la oxidación de lípidos, estableciéndose la condición de estrés oxidativo que conduce a la muerte celular. Este último nivel es mediado predominantemente por el NO_2^- y el OH. (Wink y Mitchel, 1998; Quijano y col., 2005; Frein y col., 2005; Ullrich y Kissner, 2006; Pacher y col., 2007; Leon y col., 2008; Poderoso, 2009; Zielonka y col., 2010).

La capacidad antioxidante de una planta y su actividad antidiabética se encuentran íntimamente relacionadas (Rahimi y col., 2005). Especies que poseen constituyentes antioxidantes, tales como, la mangiferina (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge, *Mangifera indica* L.), el galato de epigallocatequina (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), la swertiamarina y la swertisina (*Enicostemma hyssopifolium* (Willd.) I. Verd.), la epicatequina (*Pterocarpus marsupium* Roxb.) o la apigenina (*Teucrium polium* L.), a su vez, ejercen un efecto insulino mimético, atribuido a la presencia de estos compuestos (Patel y Mishra, 2011; Patel y col., 2012b).

Una de las plantas con gran potencial antioxidante (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011; Kensa y col., 2012 a y b) que se encuentra en Venezuela es *Ruellia tuberosa* L., conocida como escopetera, escopetilla o yuquilla, la cual pertenece a la familia Acanthaceae. Al igual que en otras partes del mundo, en nuestro país esta especie es utilizada de manera tradicional para el tratamiento de la diabetes (Ciangherotti y col., 2013; Chothani y col., 2010), así como

también para el manejo de las anemias, como diurético y para el tratamiento de diversos problemas renales (Gil y col., 2003; Giraldo y col., 2009).

Los estudios sobre la actividad antioxidante de las partes aéreas o la planta entera han revelado un potencial efecto atrapador de EROs y de especies reactivas de nitrógeno (ERNs), tales como: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) y el NO, principalmente los extractos orgánicos (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011 b; Kensa y col., 2012a,b). Igualmente, las partes aéreas de la *R. tuberosa* L. han mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, antinociceptiva y nefroprotectora (Chen y col., 2006; Ashraful y col., 2009; Manikandan y Doss, 2010, 2013; Chothani y col., 2010; Shahwara y col., 2011; Rajan y col., 2012). Sin embargo, la raíz ha sido menos estudiada, a pesar de que esta parte de la planta es utilizada en la medicina tradicional venezolana. La evaluación farmacológica del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT) ha permitido validar su uso tradicional como antiinflamatorio y antinociceptivo en modelos animales (Pastorello y col., 2012). Asimismo, investigadores de Sri Lanka, lograron validar el uso popular de RT para el tratamiento de la gastritis, utilizando un modelo de ratas con gastritis inducida por etanol (Arambewela y col., 2003). Actualmente se conoce que el extracto acuoso de la raíz *R. tuberosa* L. ha mostrado actividad antidiabética y potente actividad antioxidante (Pastorello y col., 2012), actividad hipoglicémica y antihiperlipidémica (Ciangherotti y col., 2016), y ha sido capaz de disminuir el daño oxidativo pancreático inducido por la diabetes mediante una disminución en el daño celular en la islotos de Langerhans (Asadullah y col., 2018), lo que apoya la posibilidad que los extractos de esta planta produzcan un importante

efecto protector del daño renal inducido por la glucosa, en parte por contrarrestar uno de sus mayores mediadores, el estrés oxidativo. De hecho, su extracto acuoso ya ha sido reportado como protector gástrico frente a un estímulo oxidativo como lo es el etanol (Afzal y col., 2015).

Con el fin comprender los mecanismos celulares y moleculares que puedan contribuir a la protección de RT frente a las complicaciones de la diabetes, se estudió la relación de la actividad protectora del extracto acuoso de la raíz de la RT con su potencial modulación de la producción de especies reactivas de oxígeno y de nitrógenos en un ambiente de glucosa normal o alta *in vitro*. Para ello, se evaluó la modulación del efecto protector de RT sobre la disminución de la viabilidad celular en ambiente de alta glucosa (HG) y en presencia de peróxido de oxígeno, L-NAME y de nitroprusiato de sodio en células renales (Vero). Igualmente se evaluó la capacidad de RT de contrarrestar el decremento de la actividad enzimática de la CAT, SOD total, CuZn-SOD, GPx y GR inducida por la glucosa *in vitro* en células Vero. Estos hallazgos pretenden consolidar los conocimientos acerca del potencial fitofármaco, de utilidad para el tratamiento de los pacientes diabéticos, con o sin nefropatía; y contribuir a la caracterización farmacológica de esta especie perteneciente a la gran biodiversidad nacional, así como incentivar el aislamiento y síntesis de nuevas moléculas capaces de prevenir o disminuir el daño renal.

Materiales y Métodos

LÍNEAS CELULARES

Las células Vero, una línea celular de epitelio renal de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fueron adquiridas

en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

CULTIVO CELULAR

Para los experimentos *in vitro* fueron empleadas las células Vero en cultivo. Esta línea celular es susceptible al daño oxidativo inducido por la exposición a alta concentración de glucosa (Kannan y Jain, 1994). Las células se cultivaron hasta confluencia en condiciones de 5% de CO₂ a 37 °C en medio completo que contiene: DMEM, 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. Además del tratamiento con el RT, las células se trataron con los protocolos descritos en la Tabla I.

Tabla I.

Protocolo de tratamientos para los experimentos *in vitro*

Citotoxicidad y enzimas antioxidantes

NG, control con glucosa normal (8 mM).

HG, alta glucosa (35 mM)

RT (concentraciones crecientes)

HG + RT

L-NAME, H₂O₂ o nitroprusiato de sodio

HG + L-NAME, H₂O₂, o nitroprusiato de sodio

HG + RT + L-NAME, H₂O₂ o nitroprusiato de sodio

Para ello, se incubaron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con medio completo (5% CO₂ 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, 8 mM de glucosa; pozos alta glucosa, 35 mM de glucosa; pozos RT (concentraciones crecientes) y pozos alta glucosa + RT. Bajo estas condiciones las células se cultivaron (5% CO₂ 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 CO₂ 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.

ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN CÉLULAS DE EPITELIO RENAL BAJO UN AMBIENTE CON ALTA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA

Se incubaron 2 millones de células en una placa de cultivo de 150 cm² con medio completo (5% CO₂ a 37°C) durante 120 horas (el medio se cambió cada 24 horas), utilizando el mismo protocolo de tratamientos del ensayo de glucotoxicidad. Luego, las células se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con tripsina al 10% en EDTA a 37°C por 5 minutos, una vez tripsinizadas, las células se lavaron 3 veces con PBS y se resuspendieron

en un volumen final de 500 µL para realizar los ensayos de las enzimas antioxidantes.

ACTIVIDAD DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT) por los O₂⁻ generados por el sistema de la xantina-xantina oxidasa (Oberley y Spitz, 1984). Se preparó una mezcla de reacción con la siguiente composición: xantina 0,122 mM, EDTA 0,122 mM, NBT 30,6 µM, albúmina 0,006% y bicarbonato de sodio 49 mM. Se colocaron 2,45 mL de la mezcla en tubos y se mantuvieron a 27 °C. Se adicionaron 500 µL de muestra, diluida 1:100 en amortiguador de fosfatos 50 nM (pH 7) e inmediatamente después, la reacción comenzó con la adición de 50 µL de xantina oxidasa (8,4 unidades). Se preparó un blanco para cada muestra con los mismos reactivos, pero sin xantina oxidasa; asimismo se preparó un tubo de 100% de reducción, el cual contenía xantina oxidasa sin muestra. Los tubos se incubaron por 30 minutos, seguidamente se adicionó 1 mL de cloruro de cobre (II) 0,8 mM y se midió la absorbancia a 560 nm. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína. Una unidad de SOD se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50% la reducción del NBT.

Para determinar la actividad de las isoformas de la SOD, en paralelo se utilizó el N,N-dietilisotiocianato de sodio, un inhibidor de la isoforma CuZn-SOD, por lo tanto se cuantificó directamente la isoforma Mn-SOD e indirectamente, la CuZn-SOD.

ACTIVIDAD DE LA CATALASA (CAT)

Se basa en la disminución de la absorbancia del H₂O₂ debido a su degradación por la

catalasa presente en la muestra de acuerdo con el método de Aebi (1982).

En una celda de cuarzo se colocaron 25 μL de la muestra diluida 1,33 en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7), se adicionó 725 μL de H_2O_2 7,7 mM e inmediatamente se midió el cambio de absorbancia a 240 nm a los 15 y 30 segundos. De acuerdo con Aebi, se utilizó la constante de reacción de primer orden (k) como la unidad de actividad de la CAT, la cual quedó definida de acuerdo con la siguiente fórmula: $k = (1/t) (2,3 \times \log A_1 / A_2)$, donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A1 y A2 son las absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t_1 y t_2 . Los resultados se expresaron como k/mg de proteína.

ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx)

La actividad de la GPx se mide de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutatión reductasa (Lawrence y Burk, 1976) y se basa en la disminución de la absorbancia a 340 nm debido a la desaparición de NAD(P)H. La GPx, al reducir los hidroperóxidos consume glutatión reducido, el cual es regenerado por la glutatión reductasa a partir de glutatión oxidado, proceso que consume NAD(P)H. Para la determinación de GPx, la muestra se diluyó con amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7,0) en una proporción de 1:8. Luego a 100 μL de esta dilución se le adicionaron 800 μL de una mezcla de reacción que contenía: EDTA 1 mM, azida de sodio 1 nM, NAD(P)H 0,2 nM, GSH 1 mM y 1U de GR/mL en amortiguador de fosfatos. De la misma manera, se preparó un tubo de actividad inespecífica con 100 μL de amortiguador de fosfatos. Los tubos se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente y su contenido se traspasó a una

celda de cuarzo que contenía 100 μL de H_2O_2 0,25 mM y la absorbancia se midió inmediatamente a 340 nm, cada minuto, durante 3 minutos. La actividad de la GPx se calculó promediando los cambios de la absorbancia por minuto de la muestra menos el promedio de los cambios de la absorbancia por minuto del inespecífico y se multiplicó este valor por 12,8, factor que se obtuvo del coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H (6,22) y el factor de dilución (8). Los datos se expresaron como U/mL. Entonces, por definición, una unidad de GPx es la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de NAD(P)H por minuto.

ACTIVIDAD DE LA GLUTATIÓN REDUCTASA (GR)

Se siguió el método de Carlberg y Mannervik (1975), en el cual se mide la desaparición de NAD(P)H a 340 nm de una mezcla de reacción que contiene: EDTA 0,5 mM; GSSG 1,25 mM y NAD(P)H 0,1 mM en amortiguador de fosfatos 0,1 M (pH 7,6). Se colocó en un tubo, 950 μL de la mezcla de reacción y 50 μL de la muestra (diluida 1:5) en amortiguador de fosfatos, los tubos se agitaron e inmediatamente se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto por 3 minutos. La actividad de la GR se determinó promediando los cambios de absorbancia por minuto de la muestra y multiplicando este valor por 0,16 (el inverso del coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H = 6,22). Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, una unidad de GR se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μmol de NAD(P)H por minuto.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas totales se determinaron en las células en cultivo. Para ello se

utilizó el método de Lowry (1951), que se fundamenta en la reacción de las proteínas con cobre y el reactivo de Folin-Ciocalteu, formándose un complejo coloreado el cual absorbe energía electromagnética a 660 nm. Se preparó una mezcla de reacción de los siguientes reactivos: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1 M; $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% y tartrato sódico-potásico al 2%, en relación 100:1:1. En un tubo se agregó 190 μL de agua destilada, 10 μL de la muestra (células cultivadas) y se agitó suavemente. Luego se añadió 2 mL de la mezcla de reacción, se agitó y se mantuvo en oscuridad por 10 minutos. Una vez culminado el tiempo, se agregaron 200 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:1 en agua destilada, preparado en el momento), se esperaron 30 minutos para la formación del color y se leyó a 660 nm en un espectrofotómetro. Las absorbancias de las muestras se interpolaron en una curva estándar de albúmina (0-100 μg). Los resultados se expresaron como mg de proteína.

Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm \text{E.E.M.}$). Los datos se analizaron con el programa Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) y por comparaciones múltiples de Bonferroni o una prueba de Dunnett. Valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

Resultados

Efecto del estrés oxidativo sobre la respuesta protectora del RT frente a la citotoxicidad inducida por glucosa.

En la Figura 1 se observa la modulación del inductor del estrés oxidativo, el H_2O_2 , sobre el efecto protector del RT sobre la disminución de la viabilidad celular bajo condiciones de HG. El tratamiento con H_2O_2 en condiciones de glucosa normal produce un efecto citotóxico, el cual es revertido parcialmente por el cotratamiento con el RT, mostrando un importante efecto protector en otro modelo de estrés oxidativo adicional al del ambiente HG. En este último, el H_2O_2 mostró ser mucho más citotóxico y revirtió completamente el efecto protector del RT, llegando a ser más citotóxico que la alta concentración de glucosa sola ($p < 0,01$). El tratamiento con RT revirtió parcialmente el efecto citotóxico inducido por HG+ H_2O_2 ($p < 0,01$).

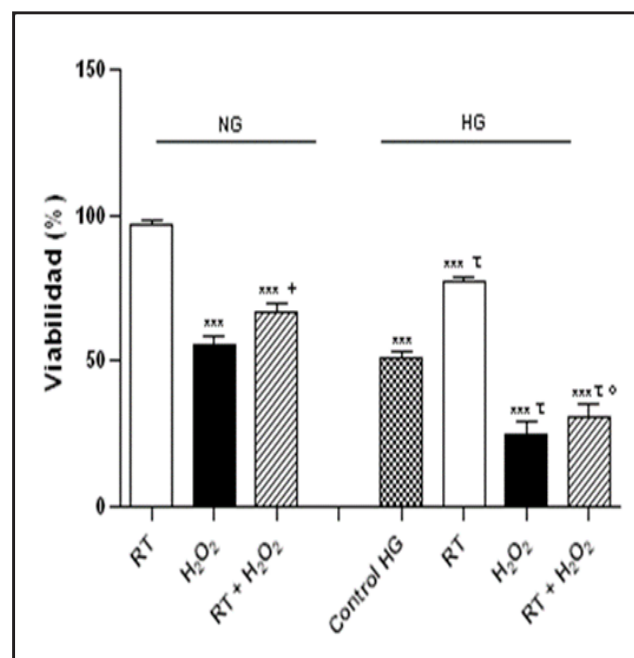


Figura 1. Efecto del peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 100 μM) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) frente a la disminución de la viabilidad de las células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. + $p < 0,01$ con respecto al grupo H_2O_2 . † $p < 0,001$ con respecto al control HG. ° $p < 0,01$ con respecto al grupo RT en HG. N=8-16

EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA NOS POR EL L-NAME SOBRE LA RESPUESTA PROTECTORA DEL RT SOBRE LA CITOTOXICIDAD INDUCIDA POR GLUCOSA

Mediante el uso del ensayo de la glucotoxicidad con MTT se evaluó el papel del NO sobre la respuesta protectora del RT sobre la citotoxicidad inducida por la glucosa. Como se observa en la Figura 2, en células Vero en cultivo en condiciones de glucosa normal, el bloqueo de la sintasa de óxido nítrico (NOS) con el L-NAME (1mg/mL) conduce a un aumento de la viabilidad celular comparado con su propio valor basal. De manera similar, en condiciones de alta concentración de glucosa, el tratamiento con el L-NAME produjo, por sí mismo, un efecto protector frente a la muerte celular inducida por HG y adicionalmente incrementó el efecto protector del RT ($p < 0,001$).

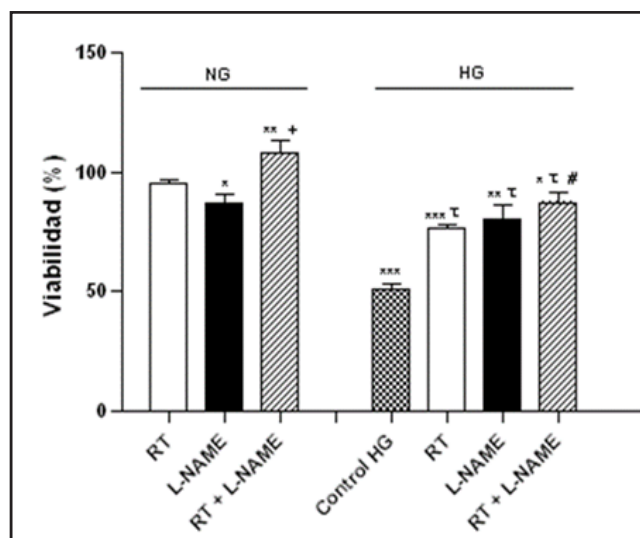


Figura 2. Efecto de la inhibición de la NOS por el L-NAME (1mg/mL) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 μ g/mL) frente a disminución de la viabilidad de las células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. † $p < 0,001$ con respecto al control HG. # $p < 0,01$ con respecto al grupo RT en HG. N=8-16

En la Figura 3 se puede observar que la combinación del RT con el NPS, un donador de NO, por un lado, no modifica la viabilidad basal del RT y por el otro disminuye el efecto protector del RT frente al HG, es decir la producción del NO en todos los casos disminuye los efectos del RT. Adicionalmente, el tratamiento con el RT fue capaz de inhibir el moderado efecto citotóxico del NPS sobre las células Vero ($p < 0,01$), sugiriendo un papel contraregulador al daño celular inducido por el estrés nitrosativo.

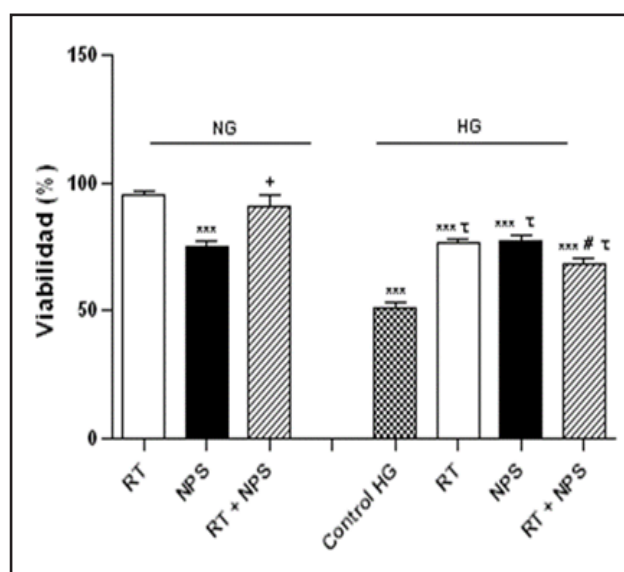


Figura 3. Efecto del nitroprusiato de sodio (NPS, 100 μ M) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 μ g/mL) frente a la disminución de la viabilidad de las células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. + $p < 0,01$ con respecto al grupo NPS. † $p < 0,001$ con respecto al control HG. # $p < 0,01$ con respecto al grupo RT en HG. N=8-16

EFECTO DEL RT SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES

La condición de alta concentración de glucosa *in vitro* disminuyó la actividad de todas las enzimas antioxidantes evaluadas (Figuras 4 a 7). El tratamiento *in vitro* con

RT incrementó significativamente (Figura 4, $p < 0,05$) la actividad basal de la CAT, y revirtió parcial o completamente los efectos inhibitorios del HG por el tratamiento con el RT sobre la CAT, GPx, GR y SOD total, respectivamente (Figuras 4 a 7). Estos efectos se relacionan con la actividad protectora frente al daño oxidativo y nitrosativo.

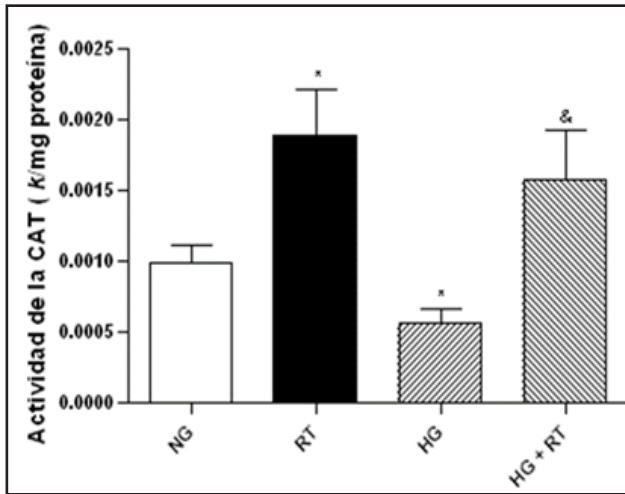


Figura 4. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad de la catalasa (CAT) en células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ con respecto al grupo NG. & $p < 0,05$ con respecto al grupo HG. N=5

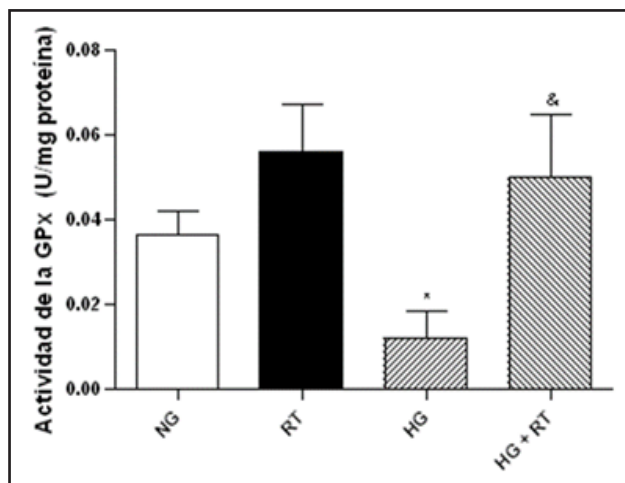


Figura 5. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad del glutatión peroxidasa (GPx) en células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ con respecto al grupo NG. & $p < 0,05$ con respecto al grupo HG. N=5

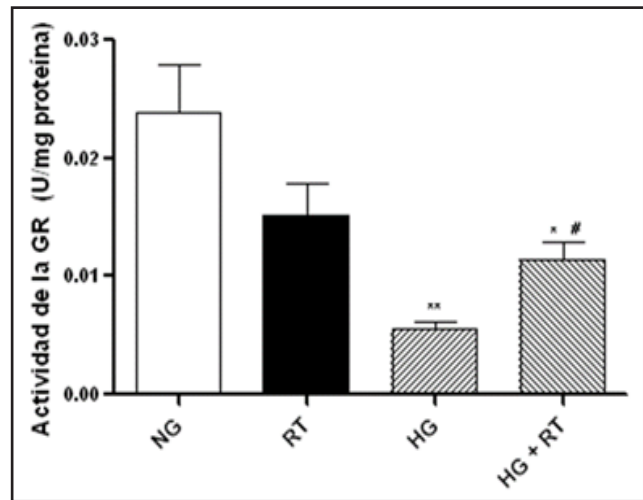


Figura 6. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto al grupo NG. # $p < 0,01$ con respecto al grupo HG. N=5

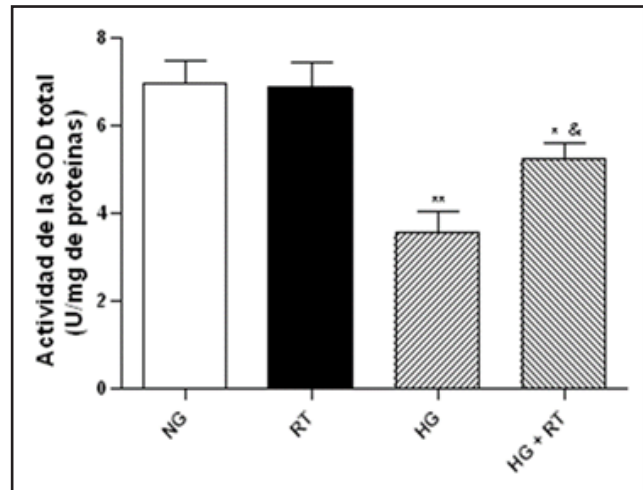


Figura 6. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en células Vero en cultivo, con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto al grupo NG. # $p < 0,01$ con respecto al grupo HG. N=5

Discusión

La diabetes es una enfermedad metabólica responsable del metabolismo anómalo de los hidratos de carbono, caracterizada por hiperglicemia resultante

de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas (American Diabetes Association, 2007a,b; World Health Organization, WHO, 2011). La diabetes está asociada a lesiones, disfunción e insuficiencia de órganos vitales, especialmente de los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos. Los pacientes con diabetes padecen una mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares, arterioscleróticas, vasculares periféricas, cerebrales y renales. La nefropatía diabética es una de las complicaciones vasculares más importantes y la mayor causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes tipo 2 (Thomas y Karalliedd, 2018).

Uno de los mecanismos propuestos para el daño endotelial y renal inducido por la hiperglicemia es la formación de EROs (Brownlee, 2001; Sen y Packer, 1996). Recientes estudios sugieren que la hiperglicemia induce estrés oxidativo y disminuye los mecanismos de defensa antioxidante (Nishikawa y col., 2000). Estas especies reactivas inician la modificación de lípidos, proteínas, carbohidratos y del ADN. Las modificaciones de estas moléculas afectan su función, distribución y metabolismo. Las EROs pueden iniciar entonces una cascada de señalización que induce daño celular y disfunción vascular. Así, la acción de las EROs representa un fenómeno crucial involucrado en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad microvascular.

Además de las EROs, la hiperglicemia conduce al daño renal a través de varios mediadores importantes, tales como: los AGEs, la ANG-II y las ERNs (Hannken y col., 2000; Tsiani y col., 2002; Gorin y col., 2004; Kanwar y col., 2005). Estos mediadores a su vez están íntimamente relacionados

a la activación de la vía de señalización diacilglicerol/proteína quinasa C/quinasas reguladas por señales extracelulares/factor nuclear potenciador de cadena ligera kappa de células B activadas (DAG/PKC/MAPK/NF- κ B) en condiciones de alta concentración de glucosa (Koya y col., 1997; Haneda y col., 2001; Ohshiro y col., 2006). A través de estas señales, conjuntamente orquestadas con otras rutas metabólicas, tales como: las de los polioles, las hexosaminas y el mio-inositol, ocurren los cambios nucleares que favorecen la expresión de factores profibróticos, pro-inflamatorios y, en algunos casos, pro-apoptóticos que conducen al daño tubular, al ensanchamiento del mesangio, a la fibrosis glomerular y a la proteinuria, entre otros (Steffes y col., 1984; Dalla-Vestra y col., 2001; Liu, 2004; Simonson, 2007).

Se ha sugerido que los antioxidantes podrían prevenir las complicaciones de la diabetes. Al respecto, en la farmacología de *Ruellia tuberosa* L. se le ha atribuido actividad antioxidante, específicamente se ha demostrado la presencia de una marcada actividad antioxidante en los extractos de las partes aéreas de la planta con una CI_{50} de $51,0 \pm 3,22 \mu\text{g/mL}$ (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011 b; Kensa y col., 2012a,b).

Uno de los mecanismos mediante el cual el RT podría ejercer su efecto renoprotector y antioxidante es a través de su acción sobre la actividad de las enzimas antioxidantes renales. Nuestros resultados apoyan esta posibilidad ya que el RT previno la reducción de la actividad de estas enzimas antioxidantes inducidas por la glucosa *in vitro*, lo que contribuye a la disminución del estrés oxidativo por esta vía. Estos resultados coinciden y avalan los reportados por Ciangherotti

y col. (2013), quienes demostraron que, en un modelo experimental de diabetes inducido por la ETZ, la RT mostró actividad antioxidante y fue capaz de disminuir y/o revertir la alteración de los marcadores del daño renal inducido por la hiperglicemia. Igualmente, RT contrarrestó la disminución de la actividad de la CAT, la SOD, la GPx y la GR inducida por la glucosa *in vivo*. Estos resultados coinciden con los reportados por Safitri y col. (2019) quienes demostraron la capacidad antidiabética del extracto de la raíz de *R. tuberosa* L. en ratas diabéticas, reflejado en una disminución en los niveles altos de glucosa en sangre, una disminución en las actividades de la proteasa, la reparación en los perfiles de proteínas y recuperación en los perfiles histopatológicos del riñón.

Se ha sugerido que esta actividad protectora esta mediada por compuestos polifenólicos presentes en el extracto de *Ruellia tuberosa*, que posiblemente este vinculado a su actividad antioxidante, hipoglicemiante y antihiperglicemiante (Ciangherotti y col., 2016), tal y como se reporta para otros extractos ricos en polifenoles, como el de *Ichnocarpus frutescens* y el de *Hibiscus sabdariffa* L. (Kumarappan y col., 2008; Lee y col., 2009) o algunos compuestos polifenólicos como el resveratrol y la mangiferina (Li y col., 2010; Schmatz y col., 2012).

El incremento del H_2O_2 ha sido asociado al daño renal en la diabetes en modelos experimentales *in vitro* donde esta especie reactiva induce apoptosis en varios tipos de células renales, tales como los fibroblastos, las células mesangiales y el epitelio tubular (Zanatta y col., 2003; Sommer y Wolf, 2007; Zhuang y col., 2007; Hasegawa y col., 2008; Kim y col., 2009; Wijesinghe y col., 2011). Zhuang y col. (2007) y Kim y col. (2009)

demostraron que el H_2O_2 induce apoptosis a través de un incremento de las EROs, de la fosforilación de las ERKs y de la activación de la caspasa 3, en células de epitelio tubular y mesangiales, respectivamente. Asimismo, en células Vero este inductor de estrés oxidativo produjo una disminución de la viabilidad celular, aumento de la fragmentación del ADN e incremento de la apoptosis (Zanatta y col., 2003; Sommer y Wolf, 2007; Wijesinghe y col., 2011). Todos estos hallazgos apoyan nuestro modelo experimental en células Vero, el cual fue susceptible a una significativa disminución de la viabilidad celular inducida por el H_2O_2 . Este efecto fue parcialmente inhibido por el co-tratamiento con el RT, consolidando aún más a este extracto como antioxidante y protector del daño oxidativo renal.

Esta actividad protectora frente al daño inducido por el H_2O_2 puede explicarse de dos maneras: 1) que el incremento basal de la actividad de la CAT inducida por el RT, aumente la degradación del H_2O_2 ; 2) el RT a través de su actividad atrapadora de $O_2^{\cdot-}$, contribuya al aumento de la actividad de la CAT por disminución de su inhibición por el $O_2^{\cdot-}$, de manera que se degrade más H_2O_2 ; y 3) que alguno de los componentes químicos del RT presente actividad atrapadora del H_2O_2 , tal como ha sido demostrado con las partes aéreas de la planta (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011b; Kensa y col., 2012). Como era de esperarse, en condiciones de glucotoxicidad, el tratamiento con el H_2O_2 aumentó el efecto citotóxico de la HG, muy probablemente por el incremento exacerbado del estrés oxidativo. Lo cual se refleja en la abolición y reversión de la acción del RT sobre el daño glucotóxico.

Todos estos hallazgos establecen al RT como un extracto antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la

diabetes, tanto *in vitro* (presente estudio) como *in vivo* (Ciangherotti y col., 2013, 2021), a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia, del estrés oxidativo, del estrés nitrosativo, y de la vía de señalización de la PKC-NF-κB (Ciangherotti y col., 2018). Esto sumado al mecanismo mediado a través de la inhibición del aumento de la fosforilación de las kinasas activadas por mitógenos (MAPK), conocidos mediadores del daño renal en la diabetes, y cuya activación (fosforilación) se encuentra asociada al aumento de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, entre otras) y a la fibrosis renal, del peso del riñón, y del contenido de proteínas y de colágeno I renal, en la diabetes inducida por ETZ (Ciangherotti y col., 2021).

Los resultados del presente estudio aportan información acerca de los efectos farmacológicos de la especie *R. tuberosa* L., a la vez que contribuye tanto a la validación de su uso tradicional como a la caracterización farmacológica de su género. Hasta la fecha sólo se conocía el efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina II (ECA), la actividad contráctil sobre la musculatura lisa del íleo de cobayo, la actividad colinérgica y la actividad estrogénica de *Ruellia praetermissa*. Scinf.ex. Lindau (Salah y col., 2000; Salah y col., 2001; Salah y col., 2002). Este conocimiento etnofarmacológico del género, sienta las bases para el estudio fitoquímico y tecnológico de este potencial fitofármaco.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por los Proyectos: Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV-2007001585, PEII-20122000760, el

CDCH-UCV proyectos PG-06-7349-2008-1/2 y AIA-06.8402.2012.

Conflicto de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de interés.

Referencias Bibliográficas

- Aebi H. 1982. Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (vol III), 3 ed., Weinheim, Verlag Chemie pp. 273-86.
- Afzal K, Uzair M, Ahmad Chaudhary B, Ahmad A, Afzal S, Saadullah M. 2015. Genus *Ruellia*: Pharmacological and Phytochemical Importance in Ethnopharmacology. *Acta Poloniae Pharm Drug Res* 72(5):821-827.
- American Diabetes Association. 2007a. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 30(Suppl1):S4-S41.
- American Diabetes Association. 2007b. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 30:S42-S47.
- Arambewela L, Thambugala S, Ratnasooriya W. 2003. Gastroprotective activity of *Ruellia tuberosa* root extract in rats. *Trop Med Plants* 4(2):191-199.
- Arirudran A, Saraswathy M, Vijayalakshmi K. 2011a. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using *in vitro* model. *J Pharmacy Res* 4(12):4344-4347.
- Arirudran A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. 2011b. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical. Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). *Pharmacognosy J* 3(22):29-34.
- Asadullah M, Aulanni'am A, Srihardyastutie A. 2018. Effects of *Ruellia tuberosa* L. Root extracts on the pancreatics of diabetic rat. *J Pure App Chem Res* 7(2):116-121.
- Ashraful A, Subhan N, Sarder M, Nahar L, Sarker S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Ruellia*. *Pharmaceutic Biol* 47(3):209-214.
- Basu S, Azarova NA, Font MD, King SB, Hogg N, Gladwin MT, Shiva S, Kim-Shapiro DB. 2008. Nitrite reductase activity of cytochrome c. *J Biol Chem* 283:32590-7.
- Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. 1999. Chemistry, physiology, and pathology of free radicals. *Life Sci* 65:1865-1874.

- Brezniceanu M, Liu F, Wei C, Chénier I, Godin N, Zhang S, Filep JG, Ingelfinger J, Chan J. 2008. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes* 57:451-459.
- Brownlee M. 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46:223-234.
- Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250:5475-5480.
- Chen J, Giridhar KV, Zhang L, Xu S, Wang QJ. 2011. A protein kinase C/protein kinase D pathway protects LNCaP prostate cancer cells from phorbol ester-induced apoptosis by promoting ERK1/2 and NF- κ B activities. *Carcinogenesis* 32(8):1198-206.
- Ciangherotti C, Maldonado AM, Orsini G, Perdomo L, Álvarez M, Salazar-Bookaman MM, Israel A. 2013. Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental. *Arch Vene Farmacol Terap* 32(4): 57-66.
- Ciangherotti C, Cegarra J, Usubillaga A, Rodríguez M, Bermúdez J, Mata R, Israel A. 2016. Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicémica aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas normales y con diabetes experimental. *Rev Fac Farm* 79 (1 y 2): 36-44.
- Ciangherotti C, Pimentel A, Benaim G, Orsini G, Salazar M, Israel A. 2018. Papel de la vía de señalización proteína quinasa C - NF- κ B en la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Farm* 81 (1 y 2): 99-116.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Perdomo L, Álvarez M, Orsini G, Israel A. 2021. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la activación de las ERK1/2 renal en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina. *Rev Fac Farm* 84 (1 y 2): 96-114.
- Craven P, DeRubertis F, Kagan V, Melhem M, Studer R. 1997. Effect of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF- α and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 8:1405-1411.
- Craven P, Phillips S, Melhem M, Liachenko J, DeRubertis F. 2001. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses increases in collagen accumulation induced by culture of mesangial cells in high-media glucose. *Metabolism* 50:1043-1048.
- Dalla Vestra M, Saller A, Mauer M, Fioretto P. 2001. Role of mesangial expansion in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Nephrol* 14: S51-S57.
- DeRubertis F, Craven P, Melhem M, Salah E. 2004. Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide-nitric oxide interaction. *Diabetes* 53:762-768.
- Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1):47-95.
- Erdmann K, Cheung B, Immenschuh S, Schröder H. 2008. Heme oxygenase-1 is a novel target and antioxidant mediator of S-adenosylmethionine. *Biochem Biophys Res Commun* 368:937-41.
- Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M, Sonoda N, Kobayashi K, Kuroda J, Sumimoto H, Nawata H. 2003. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetología* 46:1428-1437.
- Finocchietto PV, Franco MC, Holod S, González AS, Converso DP, Antico Arciuch VG, Serra MP, Poderoso JJ, Carreras MC. 2009. Mitochondrial nitric oxide synthase: a masterpiece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death. *Exp Biol Med (Maywood)* 234:1020-8.
- Frein D, Schildknecht S, Bachschmid M, Ullrich V. 2005. Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem Pharmacol* 70:811-23.
- Gil R, Mejías R, Carmona J, Mejías R, Rodríguez M. 2003. Estudio etnobotánico de algunas plantas expendidas en los herbolarios de Mérida, Ejido y Tabay (Estado Mérida-Venezuela). *Rev Fac Far* 45(1):69-76.
- Giraldo D, Baquero E, Bermúdez A, Oliveira M. 2009. Caracterización del comercio de plantas medicinales en los mercados populares de Caracas-Venezuela. *Acta Bot Venez* 32(2):267-301.
- Gorin Y, Ricono J, Wagner B, Kim N, Bhandari B, Abboud H. 2004. Angiotensin II-induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox-dependent in glomerular mesangial cells. *Biochem J* 381:231-239.
- HA H, Lee H. 2003. Reactive oxygen species and matrix remodeling in diabetic kidneys. *J Am Soc Nephrol* 14: S246-S249.
- Ha H, Seo J, Lee E, Kim Y, Lee H. 2001. Reactive oxygen species mediate upregulation of plasminogen activator inhibitor-1 secretion by mesangial cells cultured under high glucose. *J Am Soc Nephrol* 12:836A.

- Ha H, Yang Y, Lee H. 2002. Mechanisms of reactive oxygen species generation in LLC-PK1 cells cultured under high glucose. *J Am Soc Nephrol* 13:531A.
- Ha H, Yu M, Choi Y, Kitamura M, Lee H. 2002. Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 13:894-902.
- Haneda M, Koya D, Kikkawa R. 2001. Mesangial cell dysfunction as pathogenesis of diabetic nephropathy. *Contrib Nephrol* 134:16-29.
- Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl R, Wolf G. 2000. Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27Kip1: Role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 11:1387-1397.
- Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, Tatematsu S, Hara Y, Minakuchi H, Washida N, Tokuyama H, Hayashi K, Itoh H. 2008. Sirt1 protects against oxidative stress-induced renal tubular cell apoptosis by the bidirectional regulation of catalase expression. *Biochem Biophys Res Commun* 372(1):51-6.
- Heidler J, Al-Furoukh N, Kukat C, Salwig I, Ingelmann ME, Seibel P, Krüger M, Holtz J, Wittig I, Braun T, Szibor M. 2011. Nitric oxide-associated protein 1 (NOA1) is necessary for oxygen-dependent regulation of mitochondrial respiratory complexes. *J Biol Chem* 286:32086-93.
- Hodgkinson A, Bartlett T, Oates P, Millward B, Demaine A. 2003. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes* 52:846-51.
- Iglesias M, Ziyadeh F, Isono M, Kouahou M, Kalluri R, Mundel P, Chen S. 2002. Effect of high glucose and TGF- β on the expression of collagen IV and vascular endothelial growth factor in mouse podocytes. *Kidney Int* 62:901-913.
- Jaimes E, Galceran J, Raji L. 1998. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int* 54:775-784.
- Jha JC, Banal C, Chow BSM, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. 2016. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 25(12):657-684.
- Kannan K, Jain SK. 1994. Effect of high glucose on cellular proliferation and lipid peroxidation in cultured Vero cells. *Horm Metab Res* 26(7):322-5.
- Kanwar Y, Akagi S, Sun L, Nayak B, Xie P, Wada J, Chugh S, Danesh F. 2005. Cell Biology of Diabetic Kidney Disease. *Nephron Exp Nephrol* 101:100-110.
- Kensa M, Neelamegam A. 2012a. Comparison of free radical scavenging activities in the extracts of *Ruellia tuberosa* l. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Archives* 12(1): 69-74.
- Kensa M, Neelamegam R. 2012b. Analysis of antioxidants in *Ruellia tuberosa* l. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Archives* 12(1): 125-128.
- Kim OS, Kim YS, Jang DS, Yoo NH, Kim JS. 2009. Cytoprotection against hydrogen peroxide-induced cell death in cultured mouse mesangial cells by erigeroflavanone, a novel compound from the flowers of *Erigeron annuus*. *Chem Biol Interact* 180(3):414-20.
- Kumarappan CT, Mandal SC. 2008. Polyphenolic extract of *Ichnocarpus frutescens* attenuates diabetic complications in streptozotocin-treated diabetic rats. *Ren Fail* 30(3):307-22.
- Lawrence R, Burk R. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71:952-958.
- Lee H, Yu M, Yang Y, Jiang Z, Ha H. 2003. Reactive Oxygen Species-Regulated Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14: S241-S245.
- Lee WC, Wang CJ, Chen YH, Hsu JD, Cheng SY, Chen HC, Lee HJ. 2009. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes. *J Agric Food Chem* 57(6):2206-10.
- Leehey D, Singh A, Alavi N, Singh R. 2000. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 58: S93-S98.
- Leon L, Jeannin JF, Bettaieb A. 2008. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide* 19:77-83.
- Li X, Cui X, Sun X, Li X, Zhu Q, Li W. 2010. Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytother Res* 24(6):893-9.
- Li X, Pabla N, Wei Q, Dong G, Messing RO, Wang CY, Dong Z. 2010. PKC- δ Promotes Renal Tubular Cell Apoptosis Associated with Proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 21(7): 1115-1124.
- Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Würthwein G, Rohdewald P. 2004. Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci* 75(21):2505-13.
- Liu RM Leena P, Desai LP. 2015. Reciprocal regulation of TGF- β and reactive oxygen species: A perverse

- cycle for fibrosis. *Redox Biol* 6: 565-577.
- Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Arosorough A, Farr L, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265-275.
- Manikandan A, Doss VA. 2010. Effect of 50% Hydroethanolic Leaf Extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) on Non-enzymic Antioxidants and other Biochemical Parameters in Liver, Kidney, Serum of Alloxan Induced Diabetic Swiss Albino Rats. *J Biomed Sci Res* 2(3):190-201.
- Manikandan A, Doss VA. 2013. Effect of 50% hydroethanolic leaf extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) on Lipid Profile in Alloxan Induced Diabetic Rats. *Int J Prev Med* 4(7): 744-747.
- Marrero M, Banes-Berceli A, Stern D, Eaton D. 2006. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F762-768.
- Oberley L, Spitz D. 1984. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Meth Enzymol* 105:457-464.
- Ohshiro Y, Ma R, Yasuda Y, Yamamoto J, Clermont A, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern T, King G. 2006. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase C-Null Mice. *Diabetes* 55:3112-3120.
- Ozbek E. 2012 Induction of oxidative stress in kidney. *Int J Nephrol* 2012: 9.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87:315-424.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López-Gramko JT, Orsini G, Israel A. 2012. Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Farm* 75(1): 46-50.
- Patel MB, Mishra SH. 2011. Hypoglycemic activity of C-glycosyl flavonoid from *Enicostemma hyssopifolium*. *Pharm Biol* 49(4):383-91.
- Patel DK, Prasad SK, Kumar R, Hemalatha S. 2012. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic. *Property Asian Pacific J Trop Biomed* 320-330.
- Poderoso JJ. 2009. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 484:214-20.
- Quijano C, Romero N, Radi R. 2005. Tyrosine nitration by superoxide and nitric oxide fluxes in biological systems: modeling the impact of superoxide dismutase and nitric oxide diffusion. *Free Radical Biol Med* 39(6):728-741.
- Rahimi R, Nikfar S, Larijani B, Abdollahi M. 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomed Pharmacother* 59(7):365-73.
- Rajan M, Kishor V, Satheesh Kumar P, Reddy Swathi K, Sangam Haritha. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidaemic and hepatoprotective activity of methanolic extract of *Ruellia tuberosa* Linn leaves in normal and alloxan induced diabetic rats *J Chem Pharmaceutical Res* 4(6):2860-2868.
- Safitri A, Srihardyastutie A, Roosdiana A, Aulanni'am A, Laili Octaviana EN. 2019. Effects of Root Extract of *Ruellia tuberosa* L. on Kidneys of Diabetic Rats. *J Math Fund Sci* 51(2): 127-137.
- Salah AM, Dongmo AB, Kamanyi A, Bopelet M, Vierling W, Wagner H. 2000. *In vitro* purgative effect of *Ruellia praetermissa*. *Sceinf.ex.Lindau (Acanthaceae)*. *J Ethnopharm* 72:269-72.
- Salah A, Dongmo A, Kamanyi A, Bopelet M, Wagner H. 2001. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory effect by *Ruellia praetermissa*. *Pharma Biol* 39(1): 16-19.
- Salah AM, Gathumbi J, Vierling W, Wagner H. 2002, Estrogenic and cholinergic properties of the methanol extract of *Ruellia praetermissa* Sceinf. ex. Lindau (Acanthaceae) in female rats. *Phytomedicine* 9(1):52-5.
- Schmatz R, Perreira LB, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierrez J, Bagatini M, Martins CC, Abdalla FH, Daci da Silva Serres J, Zanini D, Vieira JM, Cardoso AM, Schetinger MR, Morsch VM. 2012. *Biochimie* 94(2):374-83.
- Scivittaro V, Ganz M, Weiss M. 2000. AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C-beta (II) in neonatal mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F676-683.
- Sen CK, Packer L. 1996. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 10(7):709-20.
- Shah S, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca V. 2007. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18:16-28.
- Shahwara D, Ullaha S, Ahmadb M, Ullaha S, Ahmada N, Khan MA. 2011. Hypoglycemic activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. *Iranian J Pharma Sci* 7(2):107-115
- Simonson M. 2007. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic Nephropathy. *Kidney Int* 71:846-854.
- Sommer M, Wolf G. 2007. Rosiglitazone increases PPARgamma in renal tubular epithelial cells and

- protects against damage by hydrogen peroxide. *Am J Nephrol* 27(4):425-34.
- Stefano GB, Kream RM. 2011. Reciprocal regulation of cellular nitric oxide formation by nitric oxide synthase and nitrite reductases. *Med Sci Monit* 17:RA221.
- Steffes M, Osterby R, Chavers B, Mauer M. 1984. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes* 38: 1077-1081.
- Thomas S, Karalliedd J. 2018. Diabetic nephropathy. *Medicine* 47(2):86-91.
- Tsiani E, Poli Lekas P, Fantus GI, Dlugosz J, Whiteside C. 2002. High glucose-enhanced activation of mesangial cell p38 MAPK by ET-1, ANG II, and platelet-derived growth factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E161-E169.
- Ullrich V, Kissner R. 2006. Redox signaling bioinorganic chemistry at its best. *J Inorg Biochem* 100:2079-86.
- Wijesinghe WA, Senevirathne M, Oh MC, Jeon YJ. 2011. Protective effect of methanol extract from citrus press cakes prepared by far-infrared radiation drying on H₂O₂-mediated oxidative damage in Vero cells. *Nutr Res Pract* 5(5):389-95.
- Wink DA, Mitchel JB. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 25(4-5):434-56.
- World Health Organization WHO. 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/07/06/2011>.
- Xia L, Wang H, Goldberg H, Munk S, Fantus G, Whiteside C. 2006. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F345-F356.
- Yu B. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74:139-62.
- Zanatta, M, Sandri, P, Arslan. 2003. Ascorbic acid increases cell death in fibroblast and Vero cultures after oxidative and thermic stress. *Riv Med Lab - JLM*. 4:3-4.
- Zemojtel T, Kolanczyk M, Kossler N, Stricker S, Lurz R, Mikula I, Duchniewicz M, Schuelke M, Ghafourifar P, Martasek P, Vingron M, Mundlos S. 2006. Mammalian mitochondrial nitric oxide synthase: characterization of a novel candidate. *FEBS Lett* 580:455-62.
- Zielonka J, Sikora A, Joseph J, Kalyanaraman B. 2010. Peroxynitrite is the major species formed from different flux ratios of co-generated nitric oxide and superoxide: direct reaction with boronate-based fluorescent probe. *J Biol Chem* 285:14210-6.