



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
POSTGRADO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA



**EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA RAÍZ DE *Ruellia tuberosa* L.
SOBRE EL DAÑO RENAL EN LA DIABETES. PAPEL DEL ESTRÉS
OXIDATIVO**

**Tesis Doctoral presentada ante la ilustre Universidad Central de Venezuela
para obtener el Título de Doctor en Ciencias Mención Farmacología**

**Realizado por:
Farmacéutico
Carlos Eduardo Ciangherotti Franco**

Tutora: Dra. Anita Stern

Caracas, septiembre de 2012

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Anita Stern por todo su apoyo en la tutoría de este trabajo de grado, gracias por permitir nutrirme de sus conocimientos y aptitudes científicas. Buenos valores y excelencia es lo que se respira bajo su conducción. Siempre lo he dicho: la institución necesita muchas Anitas para tener el nivel que demanda la ciencia mundial.

A la Dra. Margarita Salazar-Bookaman por su valiosa dedicación a mi formación profesional en el campo de la docencia y la investigación. Sus sabios consejos hicieron posible lograr tan anhelada meta.

A la Dra. María del Rosario Garrido (Chary) por su enorme colaboración en mi formación científica. Un insigne ejemplo seguir de investigación, de solidaridad, de amistad y de amor.

A mi compañera y amiga Giovannina Orsini del Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia de la UCV, por su grandiosa participación en este trabajo. Sabes que eres parte importante de esta tesis doctoral y de mi formación botánica, gracias por todos tus consejos y enseñanzas.

A la Universidad Central de Venezuela, en especial a la Facultad de Farmacia, por ser la plataforma académica de mi estudio de postgrado y de mí proyecto de vida profesional. UCV estaré caminando en tus calles de conocimientos, gozando de la alegría de servir a la ciencia venezolana desde tu abstracta morada.

Al Dr. Alfredo Usubillaga de la Universidad de Los Andes por ser el autor intelectual del estudio etnofarmacológica de *Ruellia tuberosa* L.

A la Dra. Rachel Mata Essayag, al Dr. José Pedraza Chaverri y a sus equipos de trabajo de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su valiosa colaboración en la elaboración de esta tesis doctoral.

Al Dr. Marcos Álvarez y a su equipo de trabajo del Instituto Anatómico, “José Izquierdo” de la Facultad de Medicina de la UCV, por su valiosa colaboración en la elaboración de los ensayos histológicos de este trabajo.

A la Dra. Adriana Pimentel, gran amiga, colega y compañera, por su colaboración en la realización los ensayos de actividad del factor NF-κB, en el Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

A la Prof. Conny Raddatz por su enorme apoyo en los ensayos *in vitro*. Entre tantas cosas positivas producto de mí transitar académico, no cabe duda, que nuestra amistad es lo más importante.

A mis compañeros y amigos: Ana María Maldonado, Maider Varela, José Tomas López, Mariella Pastorello, Elsa Camacho, José Antonio Silva, María Gabriela Matos, Bany Caraballo y Elodie Billet por su valiosa colaboración en la elaboración de este trabajo. Sus “manos” maravillosas forman parte importante de este logro.

Al Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Innovación por el financiamiento al Laboratorio de Neuropeptidos, apoyando así, parte de la elaboración de este trabajo, a través del Proyecto Misión Ciencia, No. 2007001585.

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, por el financiamiento al Laboratorio de Neuropeptidos, apoyando así, parte de la elaboración de este trabajo, a través del Proyecto Grupal No. PG-06-7349-2008/1 y 2.

A mi familia, en especial a mis padres, por hacer posible la culminación de esta meta. Sus esfuerzos fueron infinitos, mi gratitud vivirá por siempre. El amor es la enseñanza más importante de esta experiencia.

A mis compañeros del Postgrado de Farmacología, en especial a Adriana Pimentel, Tatiana González, María Alejandra Pérez, Hungría Fernández y Daniela Urrecheaga, desde que juntos comenzamos este camino, el apoyo y amistad, fue sin lugar a dudas el motor para conseguir el éxito. Nunca olvidare las vivencias tan gratificantes al lado de tan excelentes profesionales.

A la Dra. Marlene Vargas y a la Prof. María Eugenia Pineda por el valioso apoyo en la elaboración de este trabajo. Gracias por estar allí cada vez que las necesite, las quiero y de igual manera estaré aquí cuando lo necesiten.

A los profesores del Postgrado de Farmacología, en especial a la Dra. Neira Gamboa, quien más allá apoyarme en culminación de esta etapa, contribuyó de manera muy especial a mi formación como docente desde la Cátedra de Bioquímica. Gracias Dra. Neira, un brillante ejemplo de la investigación venezolana.

Finalmente a mis Amigos de la "Jauría" en especial a Omaica Valerio por no permitirme declinar en los malos momentos y acelerar la llegada de uno de los mejores: mi graduación doctoral. ¡Los quiero! grades amigos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABLAS	xiv
ABREVIATURAS	xv
RESUMEN	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Mecanismos Celulares del Daño Renal en la Diabetes	12
1.2. Efecto de <i>Ruellia tuberosa</i> L. en la diabetes y sus complicaciones	31
2. OBJETIVOS	35
2.1. Objetivo General	35
2.2. Objetivos Específicos	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Material botánico	38
3.2. Preparación del extracto acuoso	38
3.3. Reactivos	38
3.4. Animales de experimentación	39
3.5. Líneas celulares	40
3.6. Capacidad antioxidante del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. <i>in vitro</i>	40
3.6.1. Contenido de polifenoles totales del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	40
3.6.2. Actividad atrapadora de anión superóxido del extracto acuoso de la	41

raíz de *Ruellia tuberosa* L.

3.7.	Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el daño renal inducido por la diabetes <i>in vivo</i>	41
3.7.1.	Toxicidad aguda y subcrónica	42
3.7.2.	Inducción de la diabetes	42
3.7.3.	Efecto agudo extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la glicemia	43
3.7.4.	Diseño experimental	43
3.7.5.	Marcadores de función glomerular	44
3.7.5.1.	Creatinina en suero	44
3.7.5.2.	Nitrógeno ureico en sangre (BUN)	45
3.7.5.3.	Proteinuria	46
3.7.6.	Marcadores de la función tubular	47
3.7.6.1.	Actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx) en el suero	47
3.7.7.	Determinación del volumen urinario	48
3.7.8.	Marcadores de fibrosis renal	48
3.7.8.1.	Determinación del peso del riñón	48
3.7.8.2.	Determinación de las proteínas totales en la corteza renal	49
3.7.8.3.	Determinación del contenido de colágeno I en cortes de riñón	49
3.7.9.	Actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal	50
3.7.9.1.	Actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD)	50
3.7.9.2.	Actividad de la Catalasa (CAT)	51
3.7.9.3.	Actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx)	52

3.7.9.4.	Actividad de la Glutación Reductasa (GR)	52
3.7.10.	Cambios oxidativos finales en la corteza renal	53
3.7.10.1.	Peroxidación Lipídica	53
3.7.10.2.	Determinación de las proteínas oxidadas totales	54
3.8.	Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el daño epitelial renal inducido por altas concentraciones de glucosa <i>in vitro</i>	56
3.8.1.	Cultivo celular	56
3.8.2.	Determinación de la citotoxicidad	56
3.8.3.	Determinación de la proliferación celular	58
3.8.4.	Actividad de las enzimas antioxidantes en células de epitelio renal bajo un ambiente con alta concentración de glucosa	58
3.9.	Efecto del sobre la actividad del NF-κB en células HeLa.	59
3.10.	Análisis Estadístico	60
4.	RESULTADOS	61
4.1.	Capacidad antioxidante del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. <i>in vitro</i>	61
4.2.	Estudios de toxicidad en animales de experimentación	62
4.3.	Efectos del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el daño renal en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina	63
4.3.1.	Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la glucosa sanguínea	63
4.3.2.	Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la variación de peso corporal	65
4.3.3.	Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el volumen urinario	67

4.3.4. Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre los marcadores urinarios y plasmáticos del daño renal	68
4.3.5. Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre los marcadores fibróticos	73
4.3.6. Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el estrés oxidativo en la corteza renal	76
4.3.6.1. Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal	77
4.3.6.2. Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre los cambios oxidativos totales en la corteza renal	80
4.4. Efectos del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el daño inducido por alta concentración de glucosa en células de epitelio renal (Vero) en cultivo	82
4.4.1. Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la viabilidad y la proliferación celular	82
4.4.2. Efecto de la inhibición de la oxido nítrico sintasa por el L-NAME sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la citotoxicidad inducida por glucosa	85
4.4.3. Efecto del estrés oxidativo sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. frente a la citotoxicidad inducida por glucosa	87
4.4.4. Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de las enzimas antioxidantes.	89
4.4.5. Efecto de la señalización de la proteína kinasa C sobre la acción del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	91
5. DISCUSIÓN	94
6. CONCLUSIONES	115
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Pacientes con disfunción diastólica en presencia o ausencia de diabetes e insuficiencia renal Crónica	3
Figura 2: Prevalencia global de la diabetes mellitus. Cifras estimadas del año 2000 y proyectadas para el año 2030	3
Figura 3: Mortalidad por diabetes en Venezuela	4
Figura 4: Distribución de plantas antidiabéticas investigadas	6
Figura 5: Distribución de las patentes basadas en las principales enfermedades durante 2001-2010 en la India	7
Figura 6: Distribución de las patentes basadas en las principales enfermedades durante 2001-2010 en los Estados Unidos	7
Figura 7: <i>Ruellia tuberosa</i> L.	11
Figura 8: Algunos metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	13
Figura 9: Inducción de la glomeruloesclerosis y la fibrosis túbulointersticial por los procesos fenotípicos: la transdiferenciación miofibroblástica (MFT) y la transición epitelial - mesenquimal (EMT) en la nefropatía diabética	14
Figura 10: Efecto de la exposición crónica y aguda a altas concentraciones de glucosa sobre la síntesis de ADN y la viabilidad de las células de epitelio tubular humano	17
Figura 11: Interacción entre los factores activados por la hiperglicemia que inducen la nefropatía diabética	19
Figura 12: Modelo por el cual la hiperglicemia (HG) promueve la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (ECM) en las células mesangiales	21
Figura 13: Vías y eventos que conducen a la nefropatía diabética	22
Figura 14: Enzimas productoras del $O_2^{\cdot-}$ y sus vías metabólicas	28
Figura 15: Protocolo para la evaluación del efecto de la extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el daño renal en la diabetes <i>in vivo</i>	45
Fig. 16: Contenido de polifenoles totales del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	61
Figura 17: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la producción de $O_2^{\cdot-}$ generado por el sistema xantina/xantina oxidasa <i>in vitro</i>	62

Figura 18: Curso temporal de la glicemia de ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ), tratadas con del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. durante 28 días	66
Figura 19: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la variación del peso corporal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) el día 28 de tratamiento	67
Figura 20: Cambios del volumen urinario de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) tratadas con el extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. durante 28 días	68
Figura 21: Curso temporal de la excreción urinaria de proteínas en ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) tratadas con el extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. durante 28 días	69
Figura 22: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la concentración de nitrógeno ureico en sangre (BUN) de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	70
Figura 23: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la concentración de creatinina en suero de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	71
Figura 24: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la excreción urinaria de creatinina en las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	72
Figura 25: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) plasmática de las tratadas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	73
Figura 26: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el peso de los riñones de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	74
Figura 27: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la síntesis de proteínas en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	74
Figura 28: Foto representativa de microscopía óptica del efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el contenido de colágeno I en el riñón de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ), al día 28 de trataminto	75
Figura 29: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el contenido de colágeno I en el riñón de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ), al día 28 de trataminto	76

Figura 30: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la catalasa (CAT) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	77
Figura 31: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	78
Figura 32: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	78
Figura 33: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la superóxido dismutasa total (SOD) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	79
Figura 34: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZn-SOD) y la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	79
Figura 35: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la peroxidación lipídica en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	81
Figura 36: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el contenido de grupos carbonilos de las proteínas en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ)	81
Figura 37: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la viabilidad de las células Vero en cultivo	82
Figura 38: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	83
Figura 39: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la citotoxicidad inducida por la glucosa en células Vero	84
Figura 40: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la proliferación de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	85
Figura 41: Efecto de la inhibición de la óxido nítrico sintasa por el L-NAME (1mg/mL) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. frente a la disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	86

Figura 42: Efecto del nitroprusiato de sodio sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. frente a disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	87
Figura 43: Efecto peróxido de hidrógeno sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. frente a disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	88
Figura 44: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la catalasa (CAT) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	89
Figura 45: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	90
Figura 46: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	90
Figura 47: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la actividad de superóxido dismutasa total (SOD) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	91
Figura 46: Efecto de la inducción de la proteína kinas a C por el 12-miristato-13 acetato de forbol sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. frente a la disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa	92
Figura 47: Efecto del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la expresión del factor NF-κB, basal y estimulada por el 12-miristato-13 acetato de forbol en células de cáncer de cuello uterino (HeLa)	92
Figura 50: Papel del estrés oxidativo y nitrosativo en el efecto protector el extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre el daño renal en la diabetes	116
Figura 51: Mecanismo propuesto del efecto protector el extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. (RT) sobre el daño renal en la diabetes. Las lines discontinuas indican disminución o bloqueo	117

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla I: Protocolos de tratamientos para los experimentos <i>in vitro</i>	57
Tabla II: Efecto agudo del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la glicemia de ratas no diabéticas	64
Tabla III: Efecto agudo del extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L. sobre la glicemia de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina	65

ABREVIATURAS

CRF	Insuficiencia renal crónica
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
AGEs	Productos de glicosilación avanzada
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
MAPKs	Proteínas kinasas activadas por mitógenos
ANG II	Angiotensina II
PKC	Proteína kinasa C
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ETZ	Estreptozotocina
RT	Extracto acuoso de la raíz de <i>Ruellia tuberosa</i> L.
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
O₂⁻	Anión superóxido
ON	Óxido nítrico
MFT	Transdiferenciación miofibroblástica
EMT	Transición epitelial-mesenquimatosa
α-SMA	A-actina del músculo liso
HG	Altas concentraciones de glucosa
hPTEC	Células epiteliales del túbulo proximal humano
GH	Hormona del crecimiento
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
TSP-1	Trombospodina 1
PKA	Proteína kinasa A
Smad	Pequeñas madres contra la decapentaplegia (small mothers against decapentaplegic)
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno 1
TIMPs	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz
AP-1	Proteína activada 1
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
JAK	Janus kinasa
CREB	Elemento de respuesta de unión al AMP cíclico
STAT	Transductores de señal y activadores de la transducción (signal transducers and activators of transcription)
Sp-1	La proteína específica 1
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
CC-5 o RANTES	Quimokina CC-5
GLUT-1	Transportador de glucosa de tipo 1
GLUT-4	Transportador de glucosa de tipo 4
SGLT-1	Cotransportador de Na ⁺ -glucosa-1

GSH	Glutati3n reducido
MIOX	Enzima mioinositol oxigenasa
ECM	Matriz extracelular
RAGE	Receptor de los productos de glicosilaci3n avanzada (AGEs)
FN	Fibronectina
egr-1	Factor de respuesta de crecimiento temprano
GFAT	Glutamina:fructosa-6-fosfato-aminotransferasa
DAG	Diacilglicerol
PLC	Fosfolipasa C
OH[·]	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
NOS	Sintasa del 3xido n3trico
eNOS	Sintasa del 3xido n3trico endotelial
nNOS	Sintasa del 3xido n3trico neuronal
iNOS	Sintasa del 3xido n3trico inducible
mNOS	Sintasa del 3xido n3trico mitocondrial
NOA1	Prote3na 1 asociada al 3xido n3trico
CuZn-SOD	Super3xido dismutasa dependiente de zinc y cobre
Mn-SOD	Super3xido dismutasa dependiente de manganeso
CAT	Catalasa
GPx	Glutati3n peroxidasa
GR	Glutati3n reductasa
NO⁺	Nitronio
N₂O₃	Tri3xido de dinitr3geno
BUN	Nitr3geno de ureico en sangre
NPS	Nitroprusiato de sodio
NBT	Nitroazul de tetrazolio
DT₅₀	Dosis t3xica media
DT₅₀	Dosis letal media
GSSG	Glutati3n oxidado
MDA	Malondialdeh3do
DNPB	2,4-dinitrofenilhidrazina
TCA	Acido tricloroac3tico
PBS	Buffer salino-fosfato
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
Vero	C3lulas de epitelio renal
NG	Sin ambiente de alta concentraci3n de glucosa
HG	Con ambiente de alta concentraci3n de glucosa
HeLa	C3lulas de c3ncer de cuello uterino

RESUMEN

La diabetes es una de los principales problemas de la salud pública mundial, en parte debido a su asociación con otras enfermedades cardiometabólicas. Las complicaciones tisulares de la diabetes es su principal causa de muerte, siendo la nefropatía diabética la que lidera la lista de daños inducidos por la hiperglicemia crónica. Se conocen varios mediadores celulares de la nefropatía: la angiotensina II, los productos de glicosilación avanzada, las kinasas activadas por mitógenos, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otras, cuya activación traen como consecuencia el aumento de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, el ensanchamiento del glomérulo, el daño tubular y la fibrosis. Esto se traduce en insuficiencia renal crónica, caracterizada por la proteinuria, el aumento de la diuresis, el desequilibrio electrolítico, el incremento de creatinina plasmática y del nitrógeno ureico en sangre (BUN), los cuales son considerados marcadores clínicos del daño renal en la diabetes. Muchos grupos de investigación están enfocados en la búsqueda de fármacos que sean capaces de abolir, disminuir o prevenir la nefropatía diabética. En el campo de la etnobotánica, la etnomedicina y la etnofarmacología existen diversos estudios que han aportado nuevas especies, fitofármacos y productos naturales para el tratamiento no sólo de la diabetes, sino también de sus complicaciones. Existen alrededor de 1200 plantas antidiabéticas en el mundo. En Venezuela son muy pocas las especies que han sido estudiadas, a pesar que goza de gran biodiversidad vegetal. *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) es una de estas plantas de uso etnomédico, la cual pertenece a la familia Acanthaceae y está distribuida en todo el país. Las partes aéreas de esta especie han sido estudiadas de manera exhaustiva, encontrándose actividad: antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria y analgésica. Sin embargo, su raíz ha sido muy poco estudiada. Recientemente, reportamos la actividad analgésica y antiinflamatoria del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) en animales de experimentación. Con el fin de validar su uso tradicional como antidiabético y de conocer la capacidad protectora ante las complicaciones de la diabetes, en este trabajo se evaluó el efecto del RT sobre el daño renal en un modelo de ratas con

diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) e *in vitro* en células de epitelio renal (células Vero) sometidas a altas concentraciones de glucosa. Asimismo, se evaluó la relación de la actividad protectora del RT con su potencial antioxidante y con la inhibición de la vía de señalización de la PKC-NF-κB. Para ello fueron evaluadas las modificaciones de la glicemia, de los marcadores de daño renal, el daño oxidativo renal, el sistema antioxidante renal, la proliferación y muerte de las células de epitelio renal, en los modelos experimentales bajo diferentes condiciones de estrés. Asimismo la expresión del NF-κB inducida por un activador de la PKC (PMA) en células de cáncer de cuello uterino (HeLa), la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles del extracto. Los resultados muestran que el RT contiene compuestos polifenólicos y que produce un efecto atrapador del anión superóxido, estableciéndose así su capacidad antioxidante. El RT disminuyó la glicemia, la proteinuria, la diuresis, el BUN la creatinina plasmática y la pérdida de peso en los animales diabéticos; disminuyó el contenido de grupos carbonilos en las proteínas, de malonildialdehído, de proteínas totales en la corteza renal y suprimió el incremento del peso del riñón en las ratas con diabetes inducida por la ETZ; contrarrestó el decremento de la actividad de la CAT, SOD total, CuZn-SOD, GPx y GR inducida por la glucosa *in vivo* e *in vitro*; protegió a las células Vero de la glucotoxicidad, del estrés oxidativo y del estrés nitrosativo, inducido por la alta glucosa, por el peróxido de hidrógeno y por el nitroprusiato de sodio respectivamente. Sin embargo, el peróxido, el nitroprusiato así como el PMA disminuyeron el efecto protector del RT sobre la glucotoxicidad. Este extracto previno el incremento de la actividad del NF-κB inducido por el PMA en las células HeLa. Todos estos hallazgos establecen al RT como un antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, tanto *in vivo* como *in vitro*, 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. Esto aporta, por primera vez, información acerca de los efectos farmacológicos de la especie, a la vez que contribuye tanto a la validación de su uso tradicional como a la caracterización farmacológica de su género, sentado así las bases para el estudio fitoquímico y tecnológico de este potencial fitofármaco.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado principalmente por un desequilibrio del metabolismo de la glucosa, debido a defectos en la secreción de insulina por las células beta páncreas (diabetes tipo 1) o por la disminución de la actividad de ésta a nivel celular (diabetes tipo 2), la cual generalmente viene acompañada por un déficit en la secreción de insulina; de manera que hay un aumento de la glucosa sanguínea. La hiperglicemia se ha observado en otros tipos de patologías que son consideradas también como un tipo de diabetes, tales como: pancreatitis, neoplasias pancreáticas, infección por citomegalovirus, acromegalia, glucagonomas, hipertiroidismo, diabetes inducida por medicamentos, diabetes gestacional, entre otras (American Diabetes Association, 2007^{a,b}; Organización Mundial de la Salud, 2011). Esta enfermedad se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud pública, debido a su alta morbilidad y a su asociación con otros trastornos como la obesidad, hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca e insuficiencia renal (Wild y col., 2004; Gilbert y col., 2006; Balkau y col., 2007). Miyazato y colaboradores (2005) asociaron la disfunción diastólica con la diabetes y la insuficiencia renal crónica en pacientes (figura 1), concluyendo que la cardiopatía está marcadamente aumentada en pacientes con diabetes y/o nefropatía. Adicionalmente, esta enfermedad presenta una importante vinculación con la socioeconomía mundial, más del 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos y medios. Asimismo, en países como China y los Estados Unidos, se calcula que dejarán de percibir ingresos

nacionales multimillonarios por causa de la diabetes y sus complicaciones (Organización Mundial de la Salud, 2011).

En el año 2000 la cifra estimada de personas con diabetes a nivel mundial (figura 2) era de 171 millones y la proyección para el año 2030 es de 366 millones de personas diabéticas (Wild y col., 2004). En el continente americano hay alrededor de 33 millones de diabéticos, siendo Venezuela uno de los de menor prevalencia con un aproximado de 500 mil afectados, según cifras estimadas de la Organización Mundial de la Salud a comienzos del siglo XXI. Asimismo, Venezuela es considerado como uno de los países del mundo con más baja incidencia de diabetes tipo 1 (DM1), la cual es alrededor de 0,1 por cada 100 habitantes por año (Organización Mundial de la Salud, 2007; Soltesz y col., 2007). No obstante, la diabetes mellitus ha sido la sexta causa de muerte en el país en la últimas décadas, por encima de enfermedades tales como las respiratorias y las infecciosas, una situación que actualmente ha venido agravándose, ya que las últimas cifras del Ministerio para el Poder Popular para la Salud revela que en el año 2011, la diabetes, pasó de ser la sexta a convertirse en la cuarta causa de muerte.

En la figura 3 se observa la casuística donde se destaca que la mortalidad asociada a la diabetes ha ido incrementándose paulatinamente a través de los años en Venezuela (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2007 y 2012).

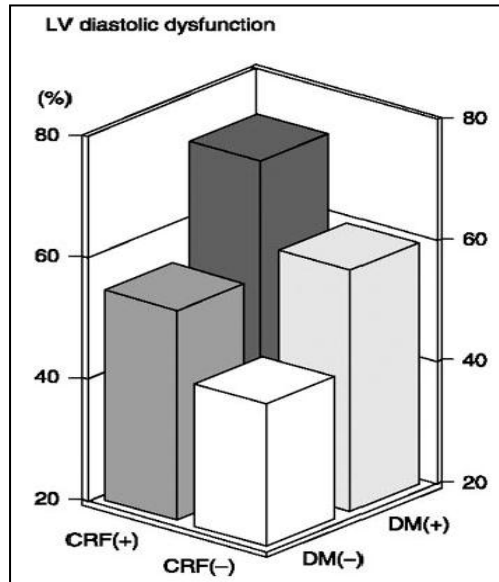


Figura 1. Pacientes con disfunción diastólica en presencia o ausencia de diabetes e insuficiencia renal crónica. CRF: insuficiencia renal crónica. DM: diabetes mellitus (Miyazato y col., 2005).

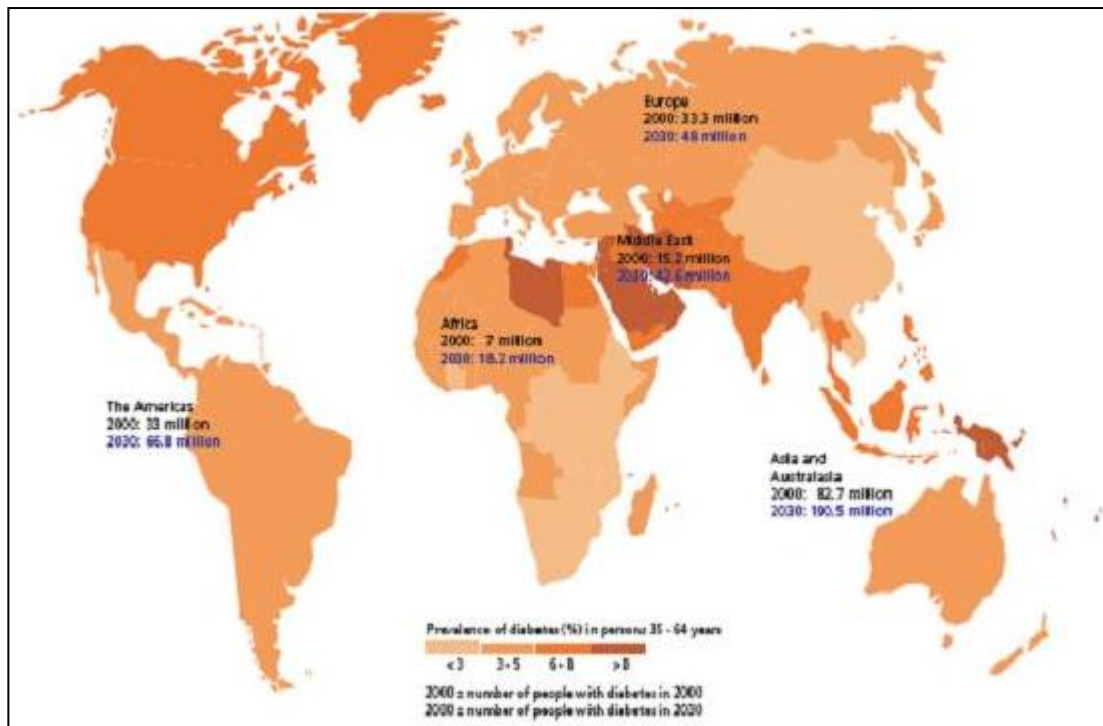


Figura 2. Prevalencia Global de la Diabetes Mellitus. Cifras Estimadas del año 2000 y proyectadas para el año 2030 (Organización Mundial de la Salud, 2007).

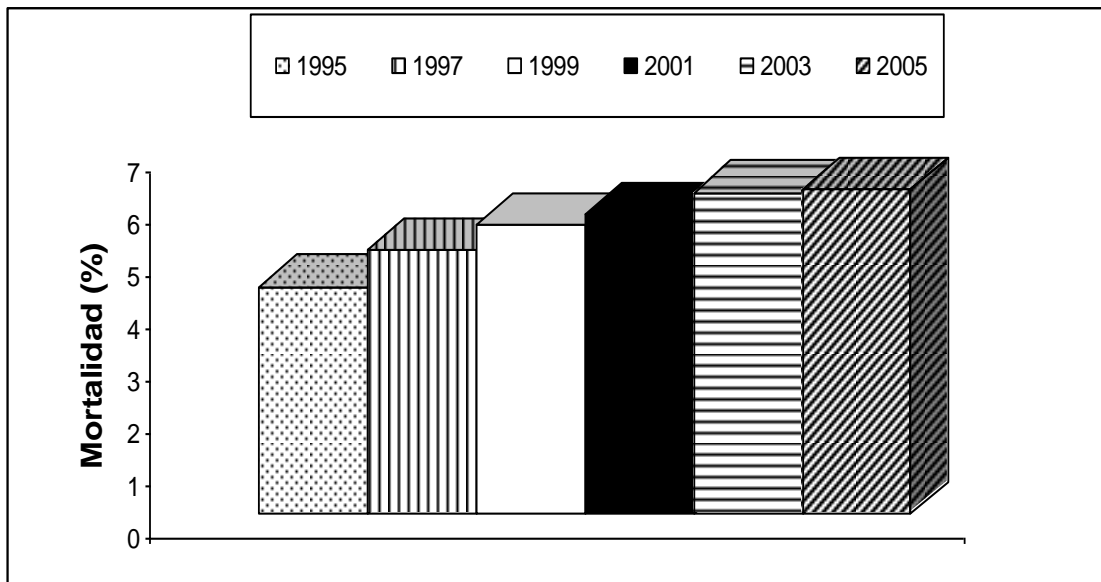


Figura 3. Mortalidad por Diabetes en Venezuela. (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2007).

Este problema de salud se exagera por la aparición de complicaciones patológicas inducidas por la hiperglicemia prolongada sobre algunos tejidos blancos, tales como: la retina, el tejido nervioso, los vasos sanguíneos, el corazón y el riñón (Bloomgarden, 2004; Boyle, 2007), siendo este último de gran importancia debido a que la condición diabética es la principal causa de insuficiencia renal terminal (American Diabetes Association, 2004). En países como Estados Unidos, Japón, Alemania y el Reino Unido, la nefropatía diabética constituye el 46, 41, 34 y 18 %, respectivamente, del total de casos de insuficiencia renal terminal (Feest, 2007).

El riñón al igual que la mayoría de órganos afectados en la diabetes, sufre un daño celular mediado por diferentes moléculas, entre las que se encuentran: los

polioles, las hexosaminas, los productos de glicosilación avanzada (AGEs), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs), la angiotensina II (ANG II), la proteína kinasa C (PKC), las especies reactivas de oxígeno (EROs), entre otras (Leeheyn y col., 2000; Schrijvers y col., 2004; Kanwar y col., 2005). La activación de estos mediadores, por exposición a altas concentraciones de glucosa, trae como consecuencia la alteración de la expresión de las proteínas que conducen al incremento de la matriz extracelular y al ensanchamiento de la membrana basal glomerular. Esto se traduce en cambios de la estructura renal, fibrosis, hiperfiltración, cambios hemodinámicos y proteinuria, las cuales son alteraciones características de la nefropatía diabética (Wolf y Ziyadeh, 1999; Mason y Wahab, 2003; Kanwar y col., 2005; Wolf y Ziyadeh, 2007).

Es importante mencionar que la búsqueda de nuevos compuestos químicos con actividades antidiabéticas o capaces de proteger o contrarrestar el daño renal inducido por las altas concentraciones de glucosa, es la ruta a seguir para el desarrollo de terapias alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, en virtud del aumento de la calidad de vida de los pacientes. Es por esto que el estudio etnofarmacológico de plantas con potencial uso en la diabetes y sus complicaciones, así como también el aislamiento, purificación y elucidación de la estructura de los compuestos responsables de la actividad de estas especies, ha sido de gran importancia para la terapéutica actual (Baynes, 2006; Jung y col., 2006; Uma y Sudarsanam, 2011; Khan y col., 2012; Hung y col., 2012). Un estudio hecho acerca del origen de los fármacos entre 1981 y el 2002 que los

productos naturales representan el 28% de los nuevos compuestos químicos lanzados al mercado, cifra que se mantuvo de manera similar hasta el 2010 (Newman y Cragg, 2003; Newman y Cragg, 2010).

Se han identificado cerca de 1200 especies de plantas con propiedades antidiabéticas, algunas utilizadas de manera popular, así como también en la clínica, mediante el desarrollo de fitofármacos por parte de la industria farmacéutica (figura 4). Entre los géneros más estudiados se encuentran los siguientes: *Panax*, *Phyllanthus*, *Momordica* y *Allium* (Baley y Day, 1989; Baynes, 2006; Hung y col., 2012; Chug-Hung y col., 2012; Patel y col., 2012^{a,b}). En países como la India y los Estados Unidos, en los últimos años, se han patentado cerca de 200 y 100 medicamentos herbarios respectivamente, de los cuales 29 son utilizados en la diabetes, consolidándose así, como la principal patología en la investigación y desarrollo de fitofármacos (figuras 5 y 6).



Figura 4. Distribución de plantas antidiabéticas investigadas. (Chan y col., 2012).

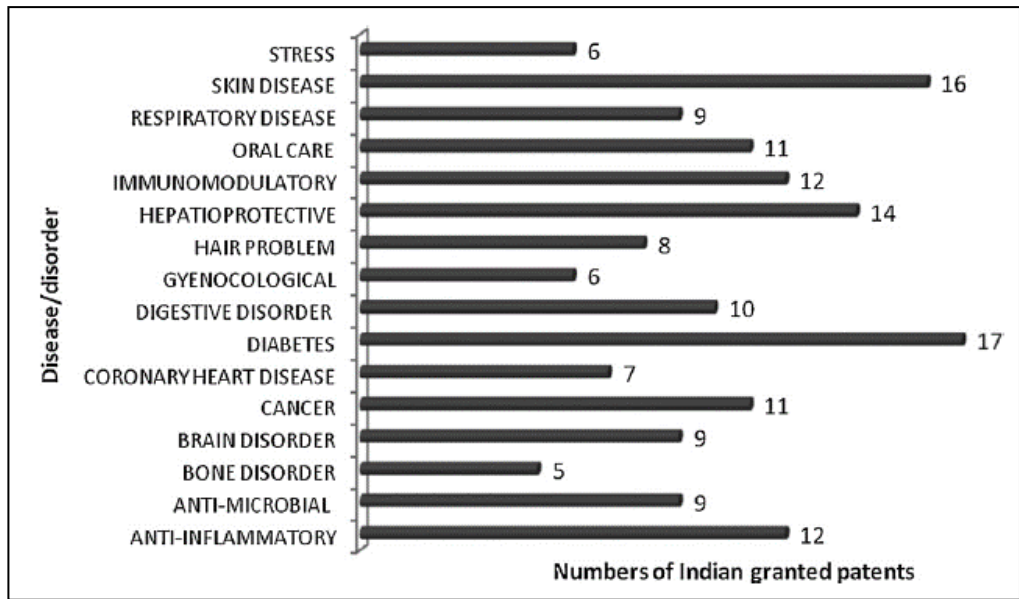


Figura 5. Distribución de las patentes basadas en las enfermedades más frecuentes durante 2001-2010 en la India. (Sahoo y col., 2011).

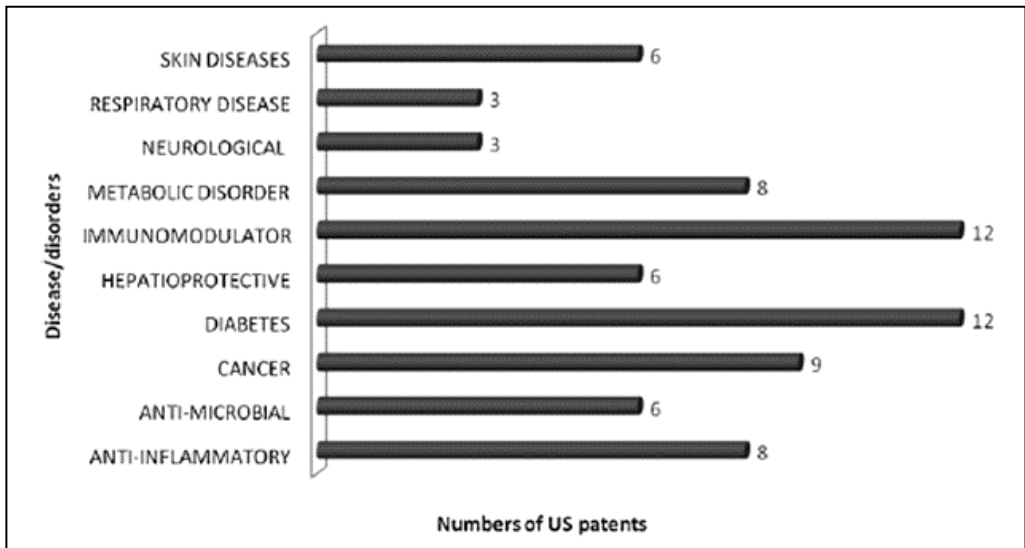


Figura 6. Distribución de las patentes basadas en las enfermedades más frecuentes durante 2001-2010 en los Estados Unidos (Sahoo y col., 2011).

En Venezuela, existen pocos reportes sobre las especies de uso tradicional en la diabetes, un gran número de las plantas comercializadas en los mercados y los herbolarios no han sido estudiadas etnobotánicamente y/o farmacológicamente,

así como tampoco han sido aislados, identificados y caracterizados los compuestos químicos responsables de su actividad. Entre las plantas estudiadas en nuestro país, se destacan: *Justicia secunda* Vahl (sangrienta), *Cedrela odorata* L. (cedro), *Melia azedarach* L. (alelí), *Artemisia absinthium* L. (ajenjo), *Momordica charantia* L. (cundeamor), *Croton cuneatus* Klotz. (arapurina), *Azadirachta indica* Juss. (neem), *Phyllanthus niruri* L. (flor escondida), *Bauhinia variegata* L. (casco de vaca), *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray (árnica), *Lepidium virginicum* L. (mastuerzo), *Cecropia* sp. (yagrumo), *Tradescantia zebrina* Heynh. (suelda consuelda), *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo), *Croton malambo* H. Karst. (palomatías), *Jatropha gossypifolia* L. (tua tua), *Putzeysia rosea* Planch. & Linden. (covalonga), *Ocimum campechianum* Mill (albahaca morada), *Eucalyptus globulus* Labill. (eucalipto), *Rubus floribundus* Weihe (mora), *Verbena litoralis* Kunth (verbena), *Bauhinia megalandra* L. (urape blanco), *Baccharis tricuneata* (L. f.) Pers. (sanalotodo) y *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) (Hidalgo y col., 1999; De los Ríos y col., 2000; Bermúdez y Velázquez, 2002; Gil y col., 2003; Estrada y col., 2005; Gil y col., 2006; Torrío y col., 2007; Ciangherotti y col., 2007; Fernández-Peña y col., 2008; Giraldo y col., 2009; Isea y col., 2011).

Desde el punto de vista de la comercialización de fitofármacos, en Venezuela existe una industria promisoriosa, encontrándose algunos de importancia en el tratamiento coadyuvante de la diabetes mellitus, tales como: el extracto de *Pinus maritima* Mill. (pycnogenol®) de laboratorios Leti S.A.V. y los extractos de *Tabebuia avellanedae* Lorentz ex Griseb. (palo de arco®) y *Allium sativum* (sativum®) de laboratorios Vita Plant C.A. Ambos, *P. maritima* y *A. sativum*, han

exhibido potente actividad antidiabética y antioxidante. El pycnogenol (extracto de corteza de pino francés) produce un efecto antidiabético, tanto en animales de experimentación como en pacientes con diabetes tipo 2 (Maritim y col., 2003; Liu y col., 2004). Por su parte, el aceite o el extracto de *A. sativum*, ha sido reportado como antihiperlipémico en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ), así como antioxidante y protector del daño renal en la diabetes (Eidi y col., 2006, Lee y col., 2009; Mariee y col., 2009).

La capacidad antioxidante de una planta y su actividad antidiabética se encuentran íntimamente relacionadas (Rahimi y col., 2005). Como se ha mencionado anteriormente, las EROs son unas de las principales mediadoras de la diabetes y sus complicaciones. (Stanton, 2011; Tang y col., 2012). 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., 2012^b)

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 (figura 7). 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., 2007; 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).

Esta especie se caracteriza por ser una hierba perenne erecta de hasta 60 cm, con raíces fibrosas y tuberosas, tallos tetraédricos; hojas simples, opuestas, alternas, sin estípulas y algo rugosas. Lámina oblongo-obovada de 6-8 cm x 4,2 cm, base atenuada, margen entero a ligeramente sinuado y ápice agudo a redondeado. Las flores son campanuladas en cimas axilares o terminales; cáliz con 5 sépalos lineales libres o apenas unidos en la base; corola gamopétala, lila, subactinomorfa, tubo de hasta 3 cm de largo, 5 lóbulos de hasta 1,4 cm de largo. El fruto está constituido por una cápsula sésil de 2 cm de largo, de color marrón-grisáceo, las semillas son lenticulares y numerosas. En Venezuela crece desde los 10 hasta los 1900 metros sobre el nivel del mar, en prácticamente todo el país (Long, 1976; Tripp, 2007; Arirudran y col., 2011^a).

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 Arokia, 2010; Chothani y col., 2010; Shahwari y col., 2011; Rajan y col., 2012). Sin embargo, la raíz ha sido poco estudiada, a pesar de que esta parte de la planta es utilizada en la medicina tradicional venezolana. En nuestro laboratorio ha sido evaluado

farmacológicamente el extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT) en los últimos años, logrando 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).

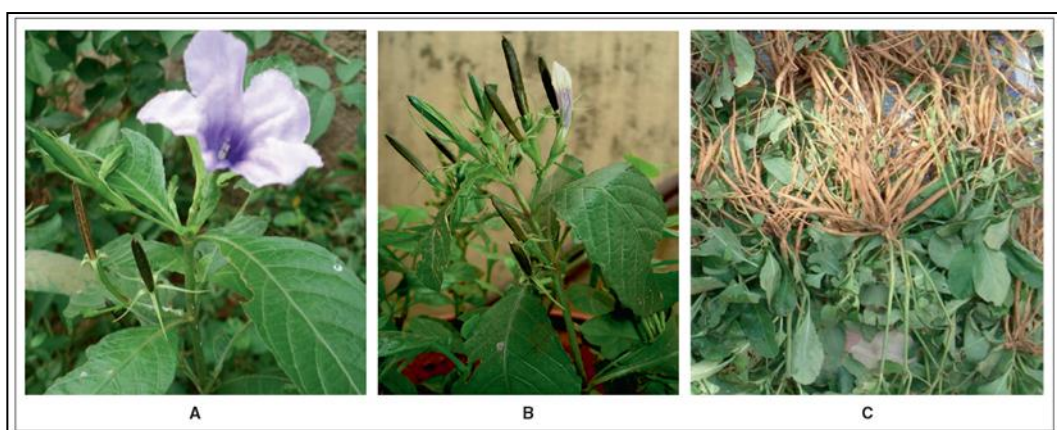


Figura 7. *Ruellia tuberosa* L. A. flor y hojas, B. hojas y frutos, C. raíz. (Arirudran y col., 2011^a).

Entre los productos naturales aislados de las partes aéreas de *R. tuberosa* L. se encuentran: la apigenina y la apigenina-7- β -D-glucurónido (Behari y col., 1981; Misra y col., 1997, Singh y col., 2002), los cuales han sido señalados como los responsables de la actividad antidiabética de *Teucrium polium* L. (Esmaeili y col., 2009; Mirghazanfari y col., 2010) y de *Pilea microphylla* (L.) Liebm. (Bansal y col., 2011). Sin embargo, el RT debe ser estudiado más exhaustivamente. Se conoce de manera preliminar la presencia de flavonoides, fenoles y saponinas en extractos de todas las partes de la planta, incluyendo la raíz (Arirudran y col.,

2011a; Chothani y col., 2011; Chothani y col., 2012). En la figura 8 se observa algunos de los compuestos químicos aislados de *R. tuberosa* L.

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 ($O_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico (ON), principalmente los extractos orgánicos (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011 b; Kensa y col., 2012). Todas estas especies reactivas son mediadores muy importantes del daño renal en la diabetes (Stanton, 2011). En este sentido, resulta interesante evaluar el posible efecto de RT sobre el daño renal en la diabetes. Al mismo tiempo de contribuir con la caracterización etnofarmacológica y con la validación del uso tradicional de esta especie perteneciente a la valiosa biodiversidad nacional.

1.1. Mecanismos Celulares del Daño Renal en la Diabetes

Son varios los tipos celulares susceptibles al daño inducido por concentraciones altas de glucosa, siendo las principalmente afectadas las células mesenquimales-angioblásticas, tales como las células endoteliales; seguido de las angioblásticas, en donde se destacan las células mesangiales renales y también células endodérmicas y ectodérmicas, entre las que se encuentran los podocitos y las células del epitelio tubular renal (Kanwar y col., 2005). Bajo la condición de hiperglicemia crónica, las células renales sufren cambios fenotípicos que traen como consecuencia la fibrosis y la pérdida de la función renal, conduciendo al

establecimiento de la nefropatía (Simonson, 2007). En la figura 9 se pueden observar los dos cambios fenotípicos presentes en la nefropatía diabética, la transdiferenciación miofibroblástica (MFT) y la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT).

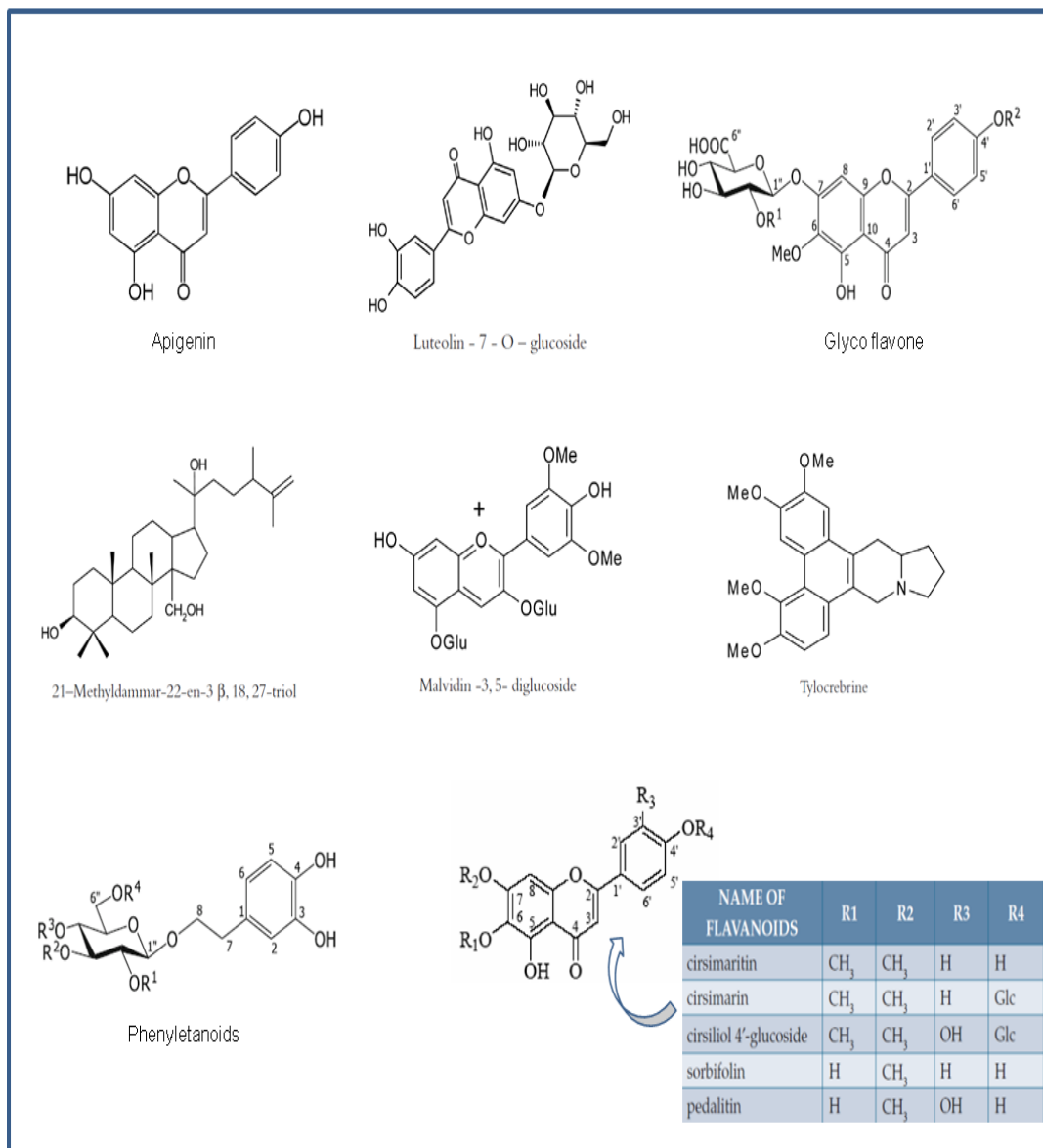


Figura 8. Algunos metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas de *Ruellia tuberosa* L. (Behari y col., 1981; Misra y col., 1997, Singh y col., 2002; Chothani y col., 2010; Phakeovilay y col., 2012).

Estos procesos fenotípicos alteran la estructura y la función de las células mesenquimales, epiteliales y las células progenitoras, en donde se produce una reprogramación nuclear inducida por algunas citoquinas y factores de crecimiento, trayendo como consecuencia la formación de miofibroblastos (en la MFT) a partir de las células mesangiales, fibroblastos intersticiales y células progenitoras, así como también la formación de miofibroblastos intersticiales (en la EMT) a partir de las células del epitelio tubular; llevando en el primer caso a la expansión del mesangio y a la glomeruloesclerosis y en el segundo caso, a la fibrosis túbulointersticial (Steffes y col., 1984; Dalla-Vestra y col., 2001; Liu, 2004; Simonson, 2007).

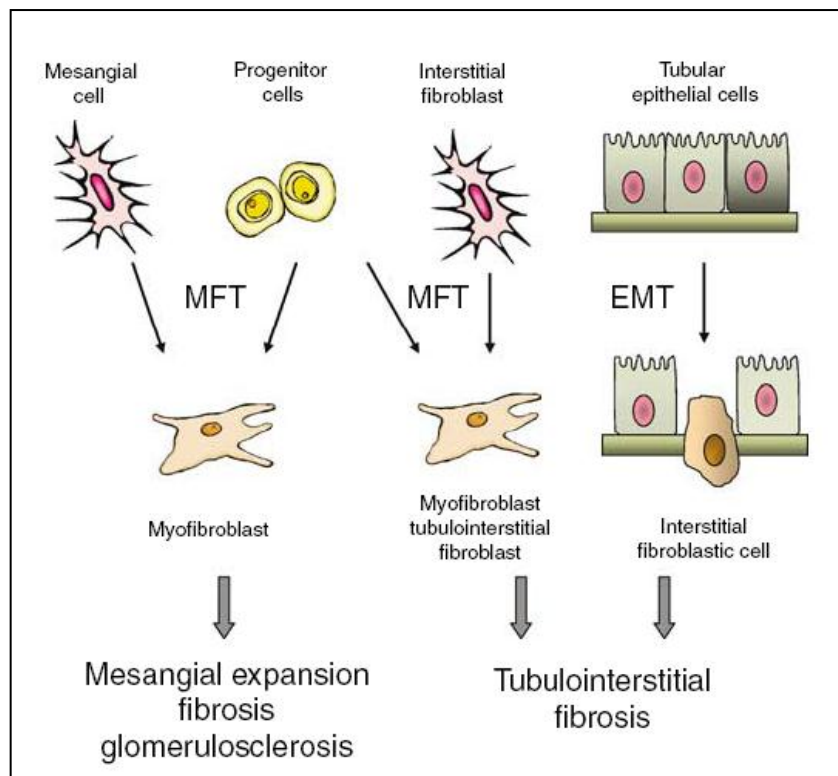


Figura 9. Inducción de la glomeruloesclerosis y fibrosis túbulointersticial por los procesos fenotípicos: la transdiferenciación miofibroblástica (MFT) y la transición epitelial - mesenquimal (EMT) en la nefropatía diabética (Simonson, 2007).

Las células formadas como resultado de los cambios fenotípicos en el riñón son consideradas efectoras profibróticas, en las cuales hay un aumento de la expresión de las citoquinas proinflamatorias (en especial el TGF- β), de la α -actina del músculo liso (α -SMA) y de las proteínas de la matriz extracelular (Simonson, 2007). En modelos experimentales de diabetes se han observado un aumento de la α -SMA en el riñón, siendo este considerado un marcador de ambos procesos fenotípicos (Sanai y col., 2000; Mima y col., 2006; Simonson, 2007).

El TGF- β , la ANG II y los AGEs son algunos de los factores profibróticos que inducen la EMT y la MFT (Yang y Liu, 2001; Oldfield y col., 2001; Yang y col., 2002; Liu, 2004; Simonson 2007). Aunque estos factores están elevados en la diabetes (Wolf y Ziyadeh, 1999; Vidotti y col., 2004; Schrijvers y col., 2004; Ziyadeh, 2004), no está claro, si las altas concentraciones de glucosa pueden directamente estimular las transiciones fenotípicas Sin embargo, la hiperglicemia es considerada un estímulo potencial de estos cambios (Simonson, 2007). Más aún, está bien establecido que el daño renal en la diabetes es causado por la acumulación de proteínas de la matriz extracelular tanto en el glomérulo como en el intersticio (Steffes y col., 1992; Lane y col., 1993). Entre las proteínas de la matriz, alteradas en la nefropatía diabética, se encuentran, la fibronectina, la laminina y el colágeno tipo I, III y IV (Mason y Wahab, 2003). Nerlich y Schleicher (1991) mostraron un incremento de la inmunoreactividad del colágeno IV y la fibronectina en la matriz mesangial de riñones de pacientes diabéticos en comparación con riñones de individuos sanos. Asimismo, Wahab y colaboradores (1996) reportaron este mismo incremento, pero en células mesangiales humanas

cultivadas bajo un ambiente de alta glucosa. El aumento de la expresión del colágeno IV inducido por la glucosa ha sido observado también en los podocitos renales (Iglesias y col., 2002), en células del epitelio tubular (Skill y col., 2004) y en células mesangiales (Baccora y col., 2007) en modelos animales; así como también en riñones de ratas con diabetes inducida por ETZ (Kamalakkannan y col., 2006).

Por otra parte, las células del epitelio tubular sufren inhibición de la proliferación y apoptosis bajo un ambiente prolongado de concentraciones altas de glucosa, esto acompañado de un incremento del estrés oxidativo (Park y col., 2001; Allen y col., 2003; Verzola y col., 2004).

Samikkannu y colaboradores (2006) mostraron que la exposición a 25 mM de glucosa (alta concentración) es capaz de aumentar la proliferación de células epiteliales del túbulo proximal de humano (hPTEC), hasta las primeras 24 horas, seguido de una inhibición de la proliferación (evaluada por la incorporación de [³H]-timidina). Adicionalmente, estos autores demostraron que la exposición a altas concentraciones de glucosa por 10 minutos produce el mismo esquema de proliferación, observándose por primera vez que esta exposición aguda es suficiente para producir los efectos antiproliferativos e inducir la muerte celular en el epitelio tubular, sugiriendo que los episodios no prolongados de hiperglicemia pueden conducir a la disfunción tubular (figura 10).

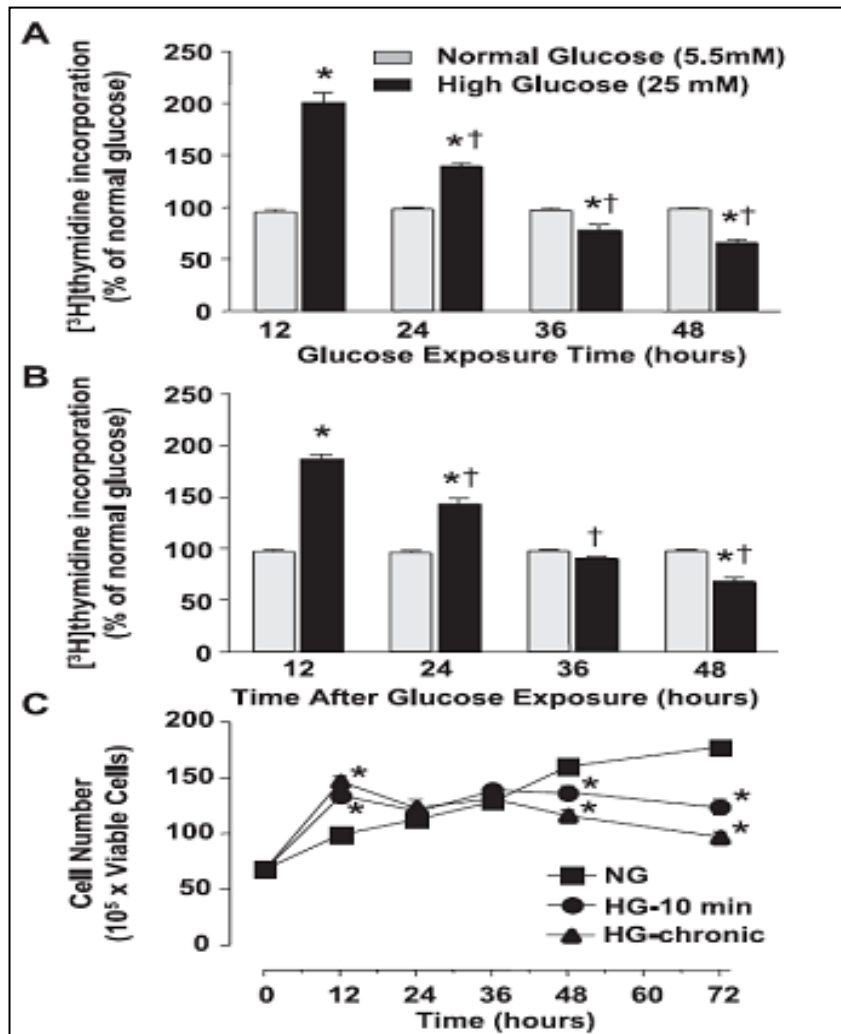


Figura 10. Efecto de la exposición crónica y aguda a altas concentraciones de glucosa (HG) sobre la síntesis de ADN (marcador de proliferación) y la viabilidad celular en hPTEC. A: células expuestas a HG (25 mM) por 12, 24, 36 y 48 h. B: células previamente expuestas a HG por 10 minutos. C: viabilidad celular (número de células) en condición aguda o crónica de HG (Samikkannu y col., 2006).

Los cambios celulares finales, tales como, la fibrosis tubulointersticial, la glomeruloesclerosis, las alteraciones en la proliferación celular y la apoptosis, son muy complejos y son mediados por diversos factores, los cuales se encuentran exacerbados en la diabetes: factores metabólicos como los AGEs, el mioinositol (vía del mioinositol), la glucosamina-6-fosfato (vía de las hexosaminas) y el sorbitol

(vía de los polioles); factores hemodinámicos como la ANG II, endotelina-1, el ON y algunas prostaglandinas; factores de crecimiento, citoquinas y relacionados como el TGF- β , la hormona del crecimiento (GH), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), la trombospodina 1 (TSP-1), entre otros; factores intracelulares y de transcripción como la PKC, la PKA, las proteínas de unión al GTP (Rho, Gq, Gs, Ras, entre otras), las EROs, las MAPKs, las pequeñas madres contra la decapentapleja (small mothers against decapentaplegic, Smad), el inhibidor del factor activador del plasminógeno 1 (PAI-1), los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz (TIMPs), la proteína activada 1 (AP-1), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), la janus kinasa (JAK), el elemento de respuesta de unión al AMPc (CREB), los transductores de señal y los activadores de la transducción (signal transducers and activators of transcription, STAT), c-Fos, c-Jun, la proteína específica 1 (Sp-1) entre otros (Wolf y Ziyadeh, 1999; Manson y Wahab, 2003; Schrijvers y col., 2004; Kanwar y col., 2005; Marrero y col., 2006). La mayoría de estos factores están relacionados o tienen vías de señalización entrecruzadas, lo que al final conduce al aumento de la expresión de la matriz extracelular y el daño renal en la diabetes (figuras 11, 12 y 13). El NF- κ B es un buen ejemplo de ello. Este factor de transcripción activado por diversas señales, tales como la ANG-II y la PKC, regula corriente abajo la expresión de varios genes relacionados con la progresión del daño renal, entre los que se encuentran: la proteína quimioatrayente de monocitos

1 (MCP-1) y la quimokina CC-5 (CC-5 o RANTES) (Mezzano y col., 2004; Patel y Santani, 2009).

La glucosa entra a las células renales a través de los transportadores de glucosa de tipo 1 y 4 (GLUT-1 y GLUT-4, respectivamente) y por el cotransportador de Na^+ -glucosa-1 (SGLT-1). En la hiperglicemia, los GLUT-1 se encuentran sobreexpresados en las células mesangiales, lo que contribuye al daño renal (Gnudi y col., 2007).

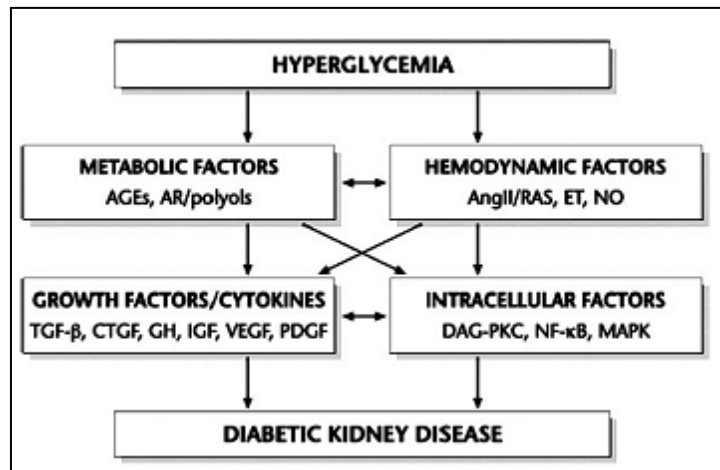


Figura 11. Interacción entre los factores activados por la hiperglicemia que inducen la nefropatía diabética (Schrijvers y col., 2004)

La excesiva concentración de glucosa intracelular puede dirigirse a varias rutas metabólicas que favorecen la nefropatía. Una de estas vías es la de los polioles, en la cual la glucosa es convertida a sorbitol mediante la acción de la aldosa reductasa dependiente de NAD(P)H (coenzima redox) y posterior oxidación a fructosa a través de la sorbitol deshidrogenasa, acompañado de la producción de

NADH (coenzima redox), por lo que un aumento de la actividad de esta vía contribuye al desequilibrio oxidativo, produciéndose: un agotamiento del NAD(P)H y del glutatión reducido (GSH), así como un incremento de la relación NADH/NAD⁺ (Kikkawa y col., 1987; Cheng y col., 2003; Kanwar y col., 2005).

Otra vía activada en la diabetes es la del mioinositol, en donde se ha evidenciado un agotamiento de este intermediario por causa de una sobreexpresión de la enzima mioinositol oxigenasa (MIOX) inducida por las altas concentraciones de glucosa a través de la activación de la vía de los polioles (Prabhu y col., 2005; Kayak y col., 2005).

Por otra parte, la fructosa-6-fosfato formada por la degradación oxidativa de la glucosa es la puerta de entrada hacia la vía de las hexosaminas, al ser convertida a glucosamina-6-fosfato por la acción de la glutamina:fructosa-6-fosfato-aminotransferasa (GFAT), enzima que juega un papel relevante en la nefropatía diabética debido a que su inhibición afecta la actividad de mediadores importantes como el TGF- β y el PAI-1 (Schleicher y col., 2000; Kanwar y col., 2005). Cabe destacar que las hexosaminas inducen estrés oxidativo e incrementan la síntesis de las proteínas de la matriz extracelular en las células renales (Singh y col., 2004; Singh y col., 2007).

Los AGEs son otros de los productos metabólicos de la glucosa incrementados por la hiperglicemia. Son considerados complejos tóxicos que producen daño renal en la diabetes, induciendo cambios estructurales, tales como: la

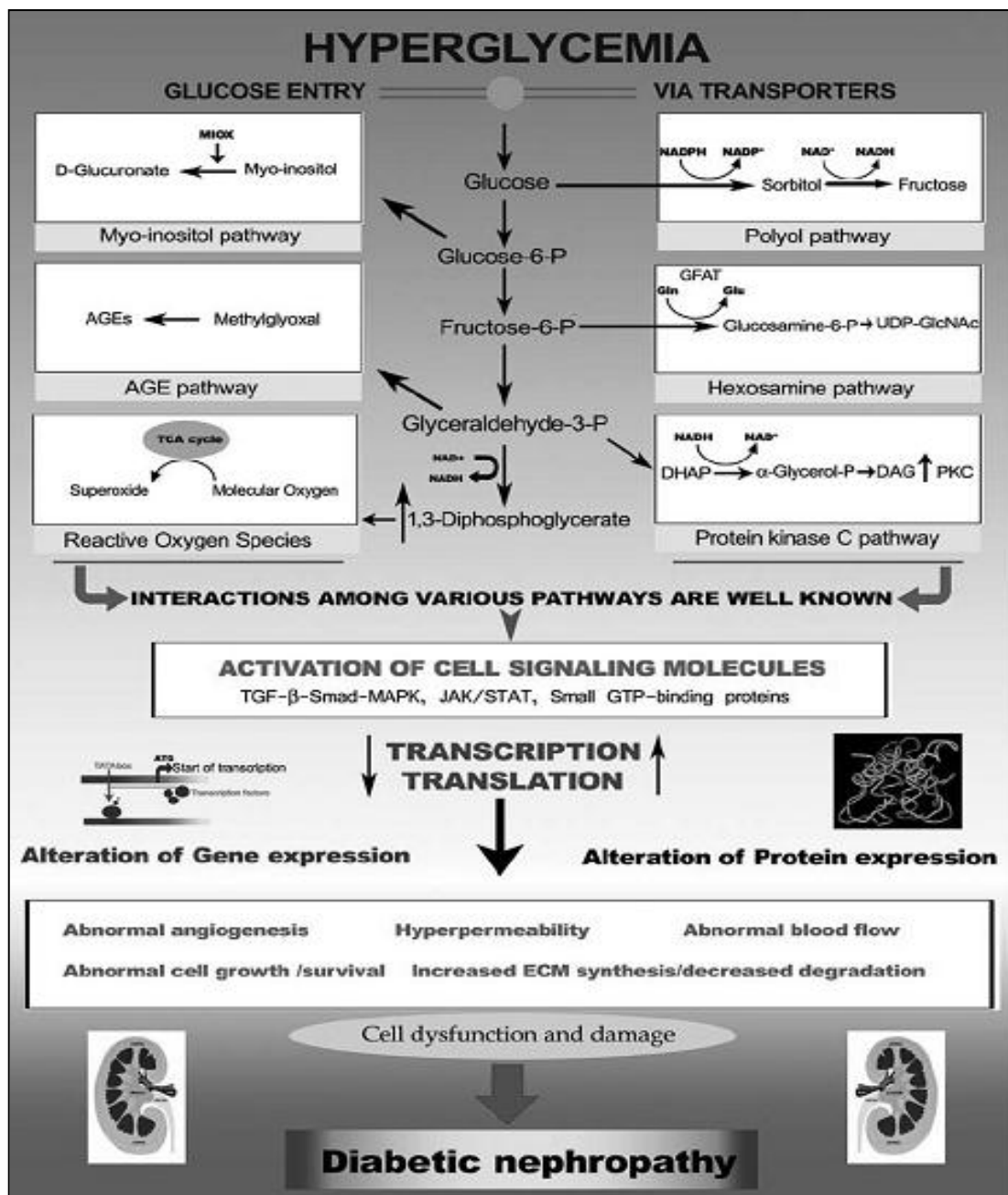


Figura 13. Vías y eventos que conducen a la nefropatía diabética (Kanwar y col., 2005).

Estos productos abarcan un grupo de proteínas y lípidos glicosidados, formados extracelularmente por la glucosa e intracelularmente por compuestos dicarbonilos, como por ejemplo, el metilglioxal (proveniente del gliceraldehido-3-fosfato) y el glioxal (Bohlender y col., 2005; Kanwar y col., 2005). Los AGEs pueden actuar

sobre sus receptores de membrana (RAGE) y activar las vías dependientes de la PKC, las MAPKs y las EROs, favoreciendo de esta manera la liberación de factores profibróticos como el TGF- β y el aumento de la expresión de las proteínas de la matriz extracelular (Scivittaro y col., 2000; Forbes y col., 2003; Bohlender y col., 2005; Kanwar y col., 2005; Yan y col., 2007).

Los eventos intracelulares mediados por la PKC, las MAPKs, las Smads y las EROs son el eje central de la nefropatía diabética y pueden ser activadas por diversas señales, tales como: las altas concentraciones de glucosa, el TGF- β , la ANG II, los AGEs, entre otras (Kanwar y col., 2005).

La activación de la PKC la realiza principalmente el diacilglicerol (DAG), proveniente del metabolismo del gliceraldehido-3-fosfato (glicólisis) o por la acción de la fosfolipasa C (PLC) sobre los fosfolípidos de la membrana plasmática, favoreciendo la activación corriente abajo de las MAPKs (Craven y col., 1990; Haneda y col., 2001; Idris y col., 2001; Parker y Murria, 2004). La actividad de la PKC esta aumentada en el glomérulo de ratas con diabetes inducida por la ETZ (Craven y DeRubertis, 1989), estando la mayoría de sus isoformas involucradas en el daño renal (Whyteside y col., 2002). La PKC- α y la PKC- β han mostrado ser mediadoras del daño renal en varios modelos experimentales de diabetes (Koya y col., 1997; Koya y col., 2000). Baccora y colaboradores (2007) observaron en las células mesangiales expuestas a un prolongado ambiente glucotóxico, un aumento de la expresión de colágeno IV, la cual fue significativamente disminuida

por un inhibidor de la PKC- δ , dejando en claro la participación de esta kinasa en la acumulación de proteínas de la matriz extracelular.

En general, la activación de la vía DAG-PKC-ERK en la diabetes conduce a la disfunción renal por el incremento en la producción de las EROs, de las prostaglandinas, de la expresión de TGF- β y de los componentes de la matriz extracelular, así como también por la disminución de la actividad de la Na⁺, K⁺ ATPasa (Koya y col., 1997; Haneda y col., 2001; Kawan y col., 2005; Ohshiro y col., 2006). Además de la hiperglicemia prolongada, la ANG II juega un papel importante en la activación de la PKC en las células renales (Leehey y col., 2000; Ikehara y col., 2003). La expresión de la mayoría de los genes relacionados con la nefropatía diabética es realizada a través de dos sistemas de señalización: las MAPKs y las Smads (Schiffer y col., 2000; Manson y Wahab, 2003; Ziyadeh, 2004).

Ambas vías son activadas por la citoquina más importante en el daño renal en la diabetes, el TGF- β (Ziyadeh, 2004; Kanwar y col., 2005; Young y col., 2005). Este componente actúa a través del receptor tipo 1, activando las proteínas Smad 2 y 3, las cuales forman un complejo con Smad 4 para así transponerse hacia el núcleo y regular la transcripción de varios genes, tales como: TSP-1, colágeno I y IV, fibronectina, laminina, PAI-1, c-Jun, entre otros (Schiffer y col., 2000; Mason y Wahab, 2003). Algunos de los miembros de la superfamilia de las MAPKs (la ERK-1 y 2, la p-38 MAPK y la JNK) están involucrados en los eventos que desencadenan el aumento de la expresión de las proteínas de la matriz

extracelular en la diabetes. (Haneda y col., 1997; Kanwar y col., 2003). La activación de estas kinasas es estimulada tanto por las altas concentraciones de glucosa, como por los AGEs, el TGF- β , el PDGF, la ANG II, las EROs, entre otros (Hannken y col., 2000; Tsiani y col., 2002; Gorin y col., 2004; Kanwar y col., 2005), encontrándose, esta activación, correlacionada con las lesiones glomerulares observadas en los pacientes diabéticos (Toyoda y col., 2004). Entre los genes cuya expresión es aumentada por activación de las MAPKs en la nefropatía diabética, se encuentran: el TGF- β , el CTGF, la fibronectina, PAI-1, TIMP-1, entre otros (Mason y Wahab, 2003).

Como ya fue mencionado, las EROs juegan un papel importante en el daño renal en la diabetes. 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 ON, el peroxinitrito (ONOO \cdot). 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; Droge, 2002). Lee y colaboradores (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 ETZ (Etoh y col., 2003), así como también en las células mesangiales sometidas a una alta concentración de glucosa *in vitro* (Xia y col., 2005).

Por su parte, el 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 post-traducciona, denominada mNOS (Finocchietto y col., 2009; Stefano y Kream, 2011). El NO también es formado a partir otras fuentes, tal como es el caso de los nitritos citosólicos y mitocondriales a través de la acción de las nitrito reductasas (Stefano y Kream, 2011). Basu y colaboradores (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 ON (NOA1), una posible nueva sintasa, la cual está ligada a la regulación del ON mitocondrial y es necesaria para la modulación dependiente de O₂ 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 ON 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 (Droge, 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 $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 y O_2 , mientras que la CAT y la GPx reducen el H_2O_2 a H_2O (figura 14). 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^a; 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^b).

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 pre tratamiento con citocalacina B (un inhibidor del GLUT-1) bloquea la producción de las EROs en las células mesangiales (Ha y col., 2002^a). Estas moléculas estimulan diversas cascadas de señalización dentro de las células renales, siendo consideradas la PKC, las MAPKs y la 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; Iglesias y col., 2001; Lee y col., 2003; Ha y Lee, 2003; Xia y col., 2006); trayendo como consecuencia la inducción de la EMT, la glomeruloesclerosis y la proteinuria (Craven y col., 1997; Ha y Lee; 2003; Shah y col., 2007).

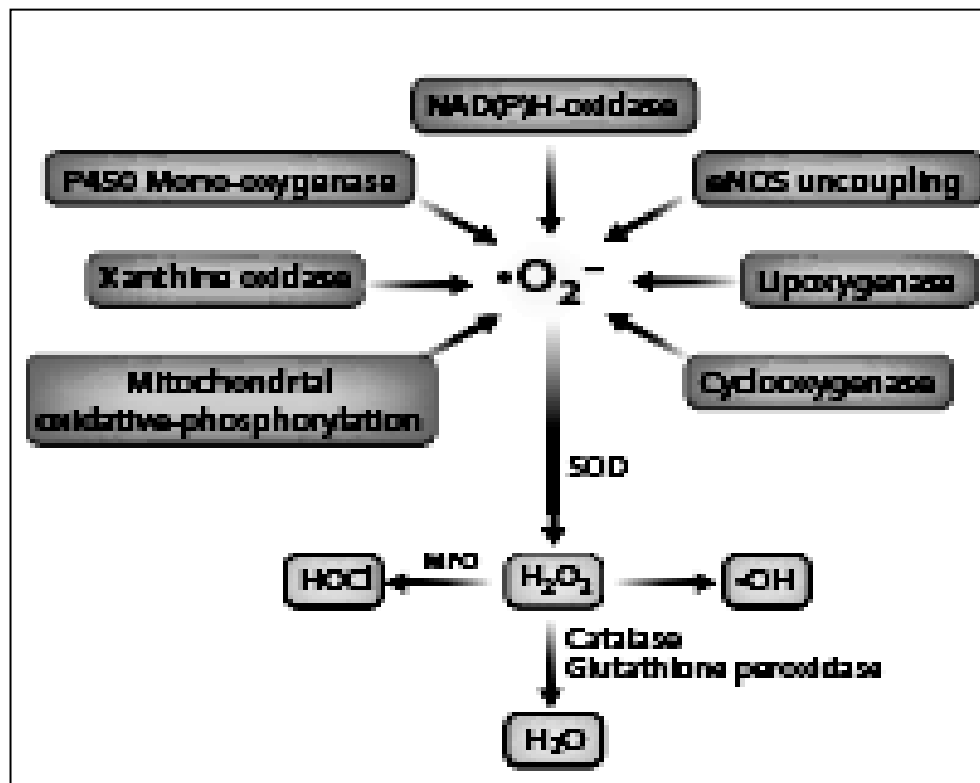


Figura 14. Enzimas productoras del O_2^- y sus vías metabólicas (Sachse y Wolf, 2007).

La hiperglicemia puede generar EROs en las células renales de manera indirecta a través de los AGEs, del TGF- β y de la ANG II (figura 12) (Leehey y col., 2000; Scivitatto y col., 2000; Lee y col., 2003; Leehey y col., 2005). 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).

Por otro lado, las ERN inducen cambios postraduccionales de un gran número de proteínas, trayendo como consecuencia su inactivación o su sobreactividad. Entre estas modificaciones se encuentran: la nitrosación, mediada por el nitronio (NO^+) y el trióxido de dinitrógeno (N_2O_3), la nitrosilación, mediada por el NO ; la nitración por el ONOO^- (Frein y col., 2005; Eursalinsky y Moncada, 2007; Parcher y col., 2007; Poderoso, 2009; Habib y Ali, 2011). Al igual que el oxidativo, el estrés nitrosativo se encuentra aumentado en la diabetes. Productos finales del daño nitrosativo, tal como la formación nitrotirosina a partir de proteínas blanco, se ha visto incrementado en riñones de ratas diabéticas (Fujii y col., 2010). El ON es el principal radical nitrosativo envuelto en la patogénesis de la nefropatía diabética. La disminución de la producción de este compuesto a partir de la SON, está asociado con el daño renal en la diabetes (Prabhakar y col., 2007). En ratas con diabetes inducida por la ETZ se ha demostrado una disminución de los niveles de ON renal, acompañado de una disminución de la actividad de la SON y en especial por un decremento de la expresión de la isoforma neuronal (SONn) (Keinan y col., 2000; Khamaisi y col., 2006). La disminución en la generación del

ON ha sido observada *in vitro*, en fibroblastos renales expuestos a altas concentraciones de glucosa, en donde la aplicación de compuestos donadores de ON, suprimen el incremento de las señales mitogénicas mediadas por las MAPKs y las JAK/STAT inducido por la glucosa, sugiriendo que el ON juega un papel importante en la modulación de la respuesta mitogénica en la nefropatía diabética (Chuang y col., 2006). Otros trabajos en animales diabéticos han mostrado que el aumento de los niveles de ON por la administración de L-arginina (precursor), disminuye la proteinuria y previene la hiperfiltración glomerular (Reyes y col., 1993).

Los niveles de ambas especies, las EROs y las ERNs, dependen de la relación de producción inicial de $O_2^{\cdot-}$ y de NO^{\cdot} ($NO^{\cdot}/O_2^{\cdot-}$). Razones de $NO^{\cdot}/O_2^{\cdot-}$ 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 y alteración de la función de varias proteínas, por nitración de las mismas, todo esto mediado por la acción de la especie predominante bajo esas condiciones, el $ONOO^{\cdot}$. 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^{\cdot} y el OH^{\cdot} (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).

1.2. Efecto de *Ruellia tuberosa* L. en la diabetes y sus complicaciones

Como ha sido mencionado, tanto la raíz como las partes aéreas de la planta, son empleadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la diabetes (Chothani y col., 2010^a). No obstante su caracterización etnofarmacológica ha sido insuficiente, sobre todo en lo que respecta al RT. Recientemente, Ullah y colaboradores (2012) mostraron que el tratamiento oral con el extracto metanólico de todas las partes de *R. tuberosa* L. en conejos con diabetes inducida por el aloxano, fue capaz de disminuir los niveles de glucosa sanguínea de manera aguda, después de 4 horas, con resultados comparables a los de la tolbutamina. Asimismo, Rajan y colaboradores (2012) empleando el extracto metanólico de las hojas demostraron el mismo efecto antihiperглиcemiante a las dosis de 100 y 200 mg/kg/día durante 14 días en ratas con diabetes inducida por el aloxano. Estos hallazgos respaldan los resultados de Chothani y colaboradores (2010^b), quienes también administraron extractos metanólicos, pero de hojas y raíz por separado, a ratas con diabetes tipo II inducida por la ETZ combinada con nicotinamida, durante 15 días; en donde encontraron que no sólo fueron capaces de disminuir la glicemia, sino también los niveles plasmáticos de colesterol total y de HDL, sugiriendo que ambos extractos ejercen un efecto antidiabético con control adicional de factores metabólicos de riesgo cardiovascular. Este estudio representa el único hasta la fecha en donde se ha evaluado la raíz de esta especie. Sin embargo, el extracto empleado fue orgánico y no acuoso, lo que

podría traer como consecuencias diferencias importantes entre estos reportes y los posibles efectos del RT sobre la glicemia.

En lo que respecta a los efectos protectores de *R. tuberosa* L. frente a los daños tisulares inducidos por la diabetes, se conoce que el extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de esta planta ha revertido, de manera crónica, el daño renal en las ratas diabéticas inducidas por el aloxano, evaluadas desde el punto de vista de sólo dos marcadores de la función renal: el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina plasmática (Manikandan y Arokia, 2010^a). Adicionalmente, sobre este mismo modelo, el extracto hidroalcohólico de *R. tuberosa* L. fue capaz de proteger al hígado del daño glucotóxico, tanto por revertir el incremento de las transaminasas y de la fosfatasa ácida, así como también por disminuir la peroxidación lipídica en el tejido hepático inducida por la diabetes (Manikandan y Arokia, 2010^a; Manikandan y Arokia, 2010^b), sugiriendo un papel importante de la regulación del estrés oxidativo en la acción antidiabética de esta especie. A la vez que establece las bases para el estudio del efecto del RT sobre las complicaciones de la diabetes y la participación de los sistemas oxidantes y antioxidantes en la posible actividad protectora.

La búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la diabetes mellitus y sus complicaciones es el punto central de la investigación de decenas de laboratorios en el mundo. Sólo en el primer trimestre del presente año, fueron publicados más de doscientos trabajos en diversas revistas científicas, referentes a las nuevas alternativas farmacológicas para este gran problema de salud

pública. Una de las principales complicaciones de la diabetes es la nefropatía, la cual ha sido atacada terapéuticamente desde diferentes puntos de vista, enfocados en las vías extra e intracelulares que median el daño renal, tales como: los AGEs, las EROs, las ERNs, las hexosaminas, las citoquinas, el SRA, entre otros.

Sin lugar a dudas, una de las principales fuentes de obtención de promisorios fármacos, está representado por las plantas, ya sean de uso tradicional o no. De las más de 1200 especies vegetales utilizadas popularmente para el tratamiento de la diabetes, sólo unas pocas han sido validadas o estudiadas etnofarmacológicamente. En Venezuela, al igual que en diversas partes del mundo, la especie *Ruellia tuberosa* L. es utilizada en la medicina herbaria, no sólo para el tratamiento de esta patología sino también como diurético, antiinflamatorio, entre otras aplicaciones. Sin embargo, sólo sobre las partes aéreas de esta planta recae la mayoría de los estudios farmacológicos, mientras que la raíz, cuya decocción es una de las formas en las cuales se utiliza en la medicina tradicional, ha sido pobremente investigada. Actualmente se conoce que la *R. tuberosa* L. ha mostrado actividad antidiabética, potente actividad antioxidante y ha sido capaz de disminuir el daño oxidativo hepático inducido por la diabetes, lo que sugiere la posibilidad de 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 de gran impacto social como lo es el etanol.

De esta manera, se considera pertinente demostrar si esta preparación de *R. tuberosa* L., es capaz, por un lado, de modular los niveles de glucosa sanguínea y por otro de proteger al riñón del daño inducido por una condición diabetógena, así como también elucidar los mecanismos celulares que contribuyen a dichos efectos. Para ello, se propone utilizar modelos experimentales de diabetes, tanto *in vivo* como *in vitro*, en donde se evaluará como afecta el extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. los cambios fisiológicos y bioquímicos renales inducidos por un ambiente hiperglicémico. Con esto se pretende consolidar un nuevo y potencial fitofármaco, de utilidad para el tratamiento de los pacientes diabéticos, con o sin nefropatía; además, se pretende 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.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Evaluar el posible efecto protector del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el daño renal en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) y sobre células renales cultivadas bajo alta concentración de glucosa, así como la relación de este efecto con el estrés oxidativo.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Determinar el contenido de polifenoles del RT.

2.2.2. Evaluar la actividad antioxidante del RT.

2.2.3. Evaluar el efecto agudo y crónico del RT sobre los niveles de glucosa sanguínea en ratas con diabetes inducida por la ETZ.

2.2.4. Evaluar la función renal de las ratas con diabetes inducida por la ETZ, tratadas crónicamente con el RT.

2.2.5. Cuantificar el volumen urinario en las ratas con diabetes inducida por la ETZ, tratadas crónicamente con el RT.

2.2.6. Evaluar el desarrollo de la fibrosis renal de las ratas con diabetes inducida por la ETZ, tratadas crónicamente con el RT.

2.2.7. Evaluar el efecto del RT sobre la proliferación celular y la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa sobre las células de epitelio renal en cultivo.

2.2.8. Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), GPx y glutatión reductasa (GR) en la corteza renal de las ratas con diabetes inducida por la ETZ y en las células de epitelio renal cultivadas bajo un ambiente de alta concentración de glucosa tratadas con el RT.

2.2.9. Evaluar el daño oxidativo renal en las ratas con diabetes inducida por la ETZ y en las células de epitelio renal cultivadas bajo un ambiente de alta concentración de glucosa tratadas con el RT.

2.2.10. Evaluar la modificación al efecto protector del RT por el inductor de estrés oxidativo, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y por el inductor de estrés nitrosativo, el nitroprusiato de sodio (NPS), sobre el daño renal *in vitro*.

2.2.11. Evaluar la modificación al efecto protector *in vitro* del RT por las vías de señalización mediadas proteína kinasa C (PKC) y la óxido nítrico sintasa (SON), sobre el daño renal *in vitro*.

2.2.12. Determinar el efecto del RT sobre la actividad del factor de transcripción inducible NF- κ B en un sistema de células HeLa transfectadas con el gen reportero de la luciferasa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material botánico

La planta fue recolectada en los jardines de la Facultad de Ingeniería, entre el edificio de Ingeniería Mecánica y entrada de Las Tres Gracias, de la Universidad Central de Venezuela, Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela. Fue identificada por la Lic. Giovannina Orsini Herbario "Victor Manuel Ovalles" (MYF) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Unos ejemplares vouchers fueron depositados en el herbario bajo el código MYF 26390, Colectada por el Dr. Stephen Tillett.

3.2. Preparación del extracto acuoso

La raíz de la planta fue separada y secada en una estufa a 50°C durante siete (7) días. Luego fue cortada en pequeños trozos y sometida a decocción a 60°C durante una (1) hora. El extracto acuoso preparado fue liofilizado y mantenido bajo protección de la humedad. Posteriormente fue disuelto en agua destilada o medio de cultivo para los diferentes ensayos.

3.3. Reactivos

Los kits utilizados para la determinación de la glucosa y la determinación del BUN son de Stanbio Laboratory (Boerne, TX, USA). El kit utilizado para la

determinación de creatinina fue de Laboratorio Biogamma C.A (Caracas, Venezuela). El reactivo de Folin & Ciocalteu, el rojo de Ponceau's, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el Nitroazul de Tetrazolio (NBT), el ácido tiobarbitúrico (TBA), la leupeptina, la pepstatina, la aprotinina, el Tris-HCl, la Guanidina, la Nicotidamida adenina dinucleótido reducida (NADH), la nicotidamida adenina dinucleótido fosfato reducida (NADPH), la azida de sodio, la glutamato deshidrogenasa se adquirieron de Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO). El TritonX-100, el suero fetal bovino (SFB), el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium), la estreptozotocina, el ácido gálico, la xantina, la glutatión reductasa (GR), el sulfato de estreptomycin, el ácido etilendiamintetracético (EDTA), la solución de ácido piperico, glutatión oxidado (GSSG), el DNPH, el MTT, el forbol 12- miristrato 13- acetato (PMA), el nitroprusiato de sodio, el dimetilsulfoxido (DMSO), el ADP, el L-NAME, la ureasa y el alfa cetoglutarato son de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El L-NAME se adquirió de Cayman Chemical Co. (Michigan, USA). El etanol, el ácido tricloroacético (TCA), el ácido fosfórico, el N-butanol y el ácido clorhídrico se adquirieron de Honeywell Riedel-de Haen (Hanover, Germany).

3.4. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* con peso corporal comprendido entre 200 y 300 g, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas-Venezuela. Los animales se mantuvieron en jaulas con libre acceso a agua y alimento. Para los experimentos de toxicidad

aguda y subcrónica se utilizaron ratones machos (10-25 g de peso) de la cepa NIH bajo las mismas características antes mencionadas.

3.5. 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”. Las células de carcinoma de cuello uterino (HeLa) transfectadas con el gen reportero de la luciferasa controlado por el promotor de IL-6, fueron facilitadas por el Dr. Gustavo Benaim del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

3.6. Capacidad antioxidante del RT *in vitro*

3.6.1. Contenido de polifenoles totales del RT

El contenido de polifenoles totales del RT fue determinado por espectroscopía, utilizando ácido gálico como estándar, usando el método descrito por la International Organization for Standardization (ISO) 14502-1 (2005). Brevemente, 1 mL del extracto diluido, fue transferido a tubos que contienen 5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu's en agua (1:10). Posteriormente, se añadió 4 mL de carbonato de sodio (7,5% p/v). Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 60 minutos y la absorbancia fue medida a 765 nm. La concentración de polifenoles fue calculada mediante la interpolación sobre una curva patrón de ácido gálico (10

a 500 µg/mL) y los resultados fueron expresados como gramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 g de extracto (gEAG/100g de extracto).

3.6.2. Actividad atrapadora de anión superóxido del RT

Para la determinación de la capacidad del RT para atrapar $O_2^{\cdot-}$ se empleó la metodología descrita por Bielski y colaboradores (1980). Este método se basa en la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por el $O_2^{\cdot-}$ generado de la oxidación de la xantina a ácido úrico a través de la xantina oxidasa.

Se preparó una solución de reacción con la siguiente composición: xantina 0,3 mM; $NaCO_3$ 0,4 M y NBT 150 µL en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7,0). El ensayo se comenzó colocando en una celda de cuarzo 782 µL la mezcla de reacción, 170 µL de extracto (concentraciones crecientes) y 170 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7,0). Posteriormente se inició la reacción colocando 48 µL de xantina oxidasa (8U) y se obtuvo las lecturas en simultáneo de la absorbancia a 295 nm y a 560 nm cada minuto durante 3 minutos. También se preparo una celda de 100% de reducción que contenía: 170 µL de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7,0) en lugar de muestra. Fue necesario medir la absorbancia a 295 nm (ác. úrico), para asegurar que el extracto no afecta la actividad de la xantina oxidasa (Owen y John, 1999). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de $O_2^{\cdot-}$ atrapado, mientras que la producción de ácido úrico fue expresado como $\Delta DO_{295}/\text{minuto}$.

3.7. Efecto del RT sobre el daño renal inducido por la diabetes *in vivo*

3.7.1. Toxicidad aguda y subcrónica

Para evaluar la toxicidad del RT se usó el método observacional de Irwin (1962). Toxicidad aguda: Los animales fueron divididos en grupos 8 animales cada uno y se les administró dosis crecientes de RT hasta 1500 mg/Kg v.o. Posterior al tratamiento, el comportamiento y/o muerte de los ratones fueron evaluadas a los 0, 15, 30, 60 y 90 minutos. Toxicidad subcrónica: siguiendo el mismo protocolo anterior, se administró dosis de 100 y 300 mg/kg/día v.o. durante 20 días a los animales de experimentación y tanto el comportamiento, como las muertes y los daños orgánicos finales fueron monitoreados.

Estos ensayos se utilizaron para establecer las bases de seguridad para el uso del extracto en las demás determinaciones *in vivo*.

3.7.2. Inducción de la diabetes

La diabetes tipo 1 fue inducida por la inyección intraperitoneal (ip) de 70 mg/kg de ETZ a las ratas. La glucosa sanguínea de los animales fue monitoreada durante 7 días o hasta que los niveles de glicemia eran ≥ 250 mg/dL. Para ello se utilizó un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche). En este momento los animales fueron considerados diabéticos (Verspohl, 2002).

3.7.3. Efecto agudo del RT sobre la glicemia

Se empleó el método descrito por Verspohl (2002) y modificado por Guerrero (2005). Se utilizaron ratas sanas (actividad hipoglicemiante) y con diabetes inducida por la ETZ (actividad antihiperglicemiante). Los animales fueron sometidos a un ayuno de 12 horas previo al experimento. Posteriormente, fueron tratados con dosis crecientes de RT v.o. y se utilizó la glibenclamida como el hipoglicemiante de referencia. Una muestra de sangre de la vena caudal de la cola del animal fue tomada para determinar la glucosa sanguínea basal (tiempo cero) y a las 1,5; 3; 5; 7 y 9 horas post-tratamiento. La glucosa se determinó por el método enzimático de la glucosa oxidasa, empleando un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de variación de la glicemia.

Este ensayo fue empleado para establecer la dosis antihiperglicemiante, que se utilizó en los ensayos para evaluar el daño renal en la diabetes.

3.7.4. Diseño experimental

Los animales fueron divididos en cuatro (4) grupos de siete (7) animales cada uno: 1). grupo Control, ratas tratadas con agua destilada v.o. (0,1 mL/100g de peso corporal/día), 2); grupo ETZ, ratas diabéticas tratadas con agua destilada v.o; 3). grupo RT, ratastratados con 10 mg//kg/día v.o. de RT y 4). grupo ETZ + RT, ratas diabéticas tratadas con 10 mg//kg/día v.o. de RT. Se evaluó la función renal basal

de los animales, mediante la recolección de muestras de orina de 24 horas, para la determinación del volumen urinario y de la proteinuria, y a través de la toma de muestras de sangre de la vena caudal de la cola de las ratas para la determinación de la creatinina, del BUN y de la actividad de la GPx. Posteriormente, se realizó el control de la función renal al final de cada semana, durante cuatro (4) semanas (figura 15). Al término de la última semana, los animales fueron sacrificados por decapitación y los riñones fueron extraídos.

3.7.5. Marcadores de la función glomerular

3.7.5.1. Determinación de la creatinina en el suero

La determinación de creatinina se fundamenta en la reacción de Jaffé, en la cual la creatinina forma un complejo coloreado con el picrato en medio alcalino, que absorbe energía electromagnética a 510 nm (Narayanan y Appleton, 1980).

La concentración de creatinina en el suero es un índice de la tasa de filtración glomerular, por lo que es considerada como un marcador de la función del glomérulo (Schor y col., 1981).

La determinación se llevó a cabo usando un kit comercial de creatinina directa (Laboratorios Biogamma C.A., Caracas, Venezuela). Se prepararon tubos que contenían: 1,5 mL de solución saturada de ácido pícrico, 1,5 mL de solución de NaOH (0,1 N) y 0,2 mL de agua destilada para el blanco, 0,2 mL de creatinina (6

mg%) para el estándar y 0,2 mL de suero para la muestra. Se mezclaron bien y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Posteriormente se leyó a 510 nm en un espectrofotómetro (BioRad, modelo Benchmark). Los resultados se expresaron en mg/dL.

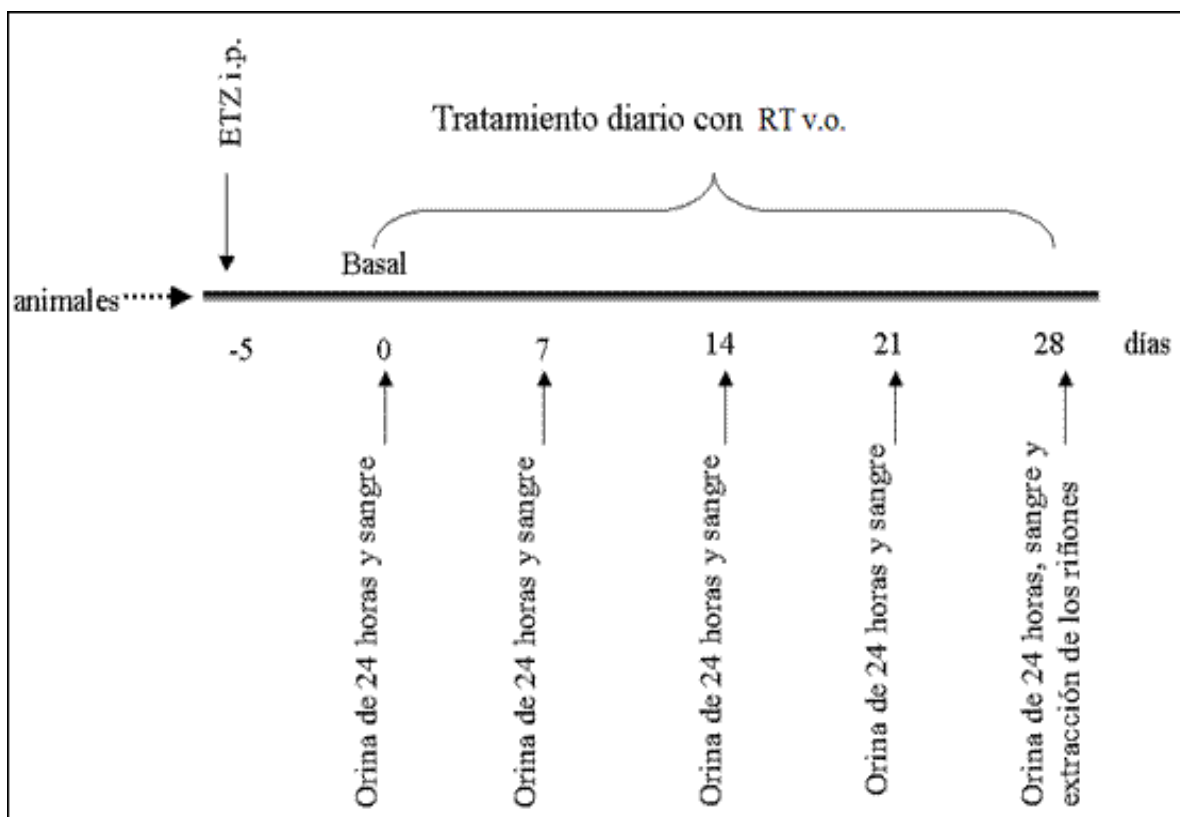


Figura 15. Protocolo para la evaluación del efecto del RT sobre el daño renal en la diabetes in vivo.

3.7.5.2. Determinación del nitrógeno ureico en sangre (BUN)

La cuantificación del BUN se fundamenta en la hidrólisis de la urea a amonio y CO_2 por acción de la ureasa, este amonio es utilizado en otra reacción acoplada, en la cual éste se conjuga con el α -cetoglutarato para producir L-glutamato a

través de la glutamato deshidrogenasa, acompañado del consumo de NADH (Sampson y Baird, 1979). Los niveles elevados de BUN fueron considerados una consecuencia de daño glomerular (Schor y col., 1981)

La determinación del BUN se llevó a cabo por el método descrito por Sampson y colaboradores (1980), empleando un kit comercial (Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA), el cual se resume a continuación: en una celda de cuarzo se colocó 10 μ L de suero y se le adicionó 1 mL de mezcla de reacción que contenía: ureasa, α -cetoglutarato, ADP, Tris, glutamato deshidrogenasa y NADH. Se mezcló suavemente y se leyó la absorbancia a 340 nm (región de absorción del NADH) a los 30 y 90 segundos post-mezcla. Bajo las mismas condiciones se preparó una celda con un estándar de urea de 30 mg/dL. Se calcularon los cambios en la absorbancia de la muestra (Δm) y del estándar (Δe) y la concentración de BUN se determinó a través de la siguiente relación: $(\Delta m/\Delta e)*30$. Los resultados se expresaron en mg/dL de BUN.

3.7.5.3. Determinación de la Proteinuria

El aumento de la proteinuria es considerada una de las características clínicas más importantes de la nefropatía diabética (Wolf y Ziyadeh, 2007), la cual es indicativa de daño glomerular o tubular.

La cuantificación de las proteínas en la orina se llevó a cabo mediante el método turbidimétrico descrito por Pesce y Strande (1973), en donde se forma un

complejo coloreado con el rojo de Ponceau S. Para ello se preparó una mezcla de reacción que contiene: 120 mg/mL de Ponceau S y 4,5 % de TCA. Se tomó 50 μ L de la muestra (orina) y se adicionó 500 μ L de la mezcla de reacción, se mezcló bien y se centrifugó a 3700 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante fue removido, el precipitado fue resuspendido con 1 ml de solución de NaOH 1M y se leyó la absorbancia a 560 nm. La absorbancia de las muestras se interpoló sobre una curva estándar de albúmina (0,125 - 8,0 mg/mL). Los resultados se expresaron como mg de proteína excretados en 24 horas (mg/24h).

3.7.6. Marcadores de la función tubular

3.7.6.1 Actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx) en el suero

La concentración plasmática de la GPx está relacionada principalmente con la síntesis y secreción de esta enzima en los túbulos renales, especialmente en el túbulo proximal, por lo que la medición de sus niveles en suero ha sido empleada como un marcador de daño tubular (Avisar y col., 1994; Whitin y col., 1998).

La actividad de la GPx se mide de manera indirecta por una reacción acoplada con la glutación 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 glutación reducido, el cual es regenerado por la glutación reductasa a partir de glutación oxidado, proceso que consume NAD(P)H. Para la determinación de GPx, la muestra de suero 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 a temperatura ambiente por 5 minutos y su contenido se traspasó a una celda de cuarzo que contenía 100 µL de H₂O₂ 0,25 mM y la absorbancia se midió inmediatamente a 340 nm, cada minuto, durante 3 minutos. 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.

3.7.7. Determinación del volumen urinario

El volumen urinario se determinó en muestras de orina recolectadas durante 24 horas empleando jaulas metabólicas. La toma de la muestra se efectuó al inicio y a los días 7, 14, 21 y 28 de tratamiento (figura 15). Los resultados del volumen urinario se expresaron en mL/100g de peso corporal.

3.7.8. Marcadores de fibrosis renal

3.7.8.1. Determinación del peso del riñón

Una vez sacrificados los animales, los riñones fueron inmediatamente extraídos y pesados en una balanza analítica (Ohaus, 4070).

3.7.8.2. Determinación de las proteínas totales en la corteza renal

Para ello se utilizó el método de Lowry (1951), fundamentado por 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. Al inicio del ensayo, 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 (homogenizado de tejido o de células cultivadas) y se agitó suavemente. Luego se añadió 2 mL de la mezcla de reacción, se agita 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. La absorbancia de las muestras se interpoló en una curva estándar de albúmina (0-100 μg). Los resultados se expresaron como mg de proteína.

3.7.8.3. Determinación del contenido de colágeno I en cortes de riñón

Uno de los riñones de los animales se rebanó y se fijó en 1 mL de formaldehído al 10 % en PBS. Posteriormente, este corte se deshidrató gradualmente en etanol

absoluto seguido de xilol, para luego embeberlo en parafina líquida. Utilizando un microtómo se obtuvo cortes de 4 μm de grosor y fueron con tricromico de Masson. La cuantificación del contenido de colágeno I se realizó a través de un analizador de imágenes. Los resultados se reportaron como incremento sobre el control.

3.7.9. Actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal

Se preparó un homogenizado de corteza renal 1:10 en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7,0) con tritón X-100 al 1%. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 30 minutos (IEC MicroCL 17R, Thermo). El sobrenadante se empleó en las determinaciones que se mencionan a continuación:

3.7.9.1. Actividad de la Superóxido Dismutasa (SOD)

La actividad de la SOD se determinó por la capacidad de esta enzima de inhibir la reducción del NBT por los O_2^- 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 4 mM. Se colocaron 2,45 mL de la mezcla en tubos y se mantienen a 27 °C. Se añadió 500 μL de muestra, diluida 1:100 en amortiguador de fosfatos 50 mM (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.

3.7.9.2. 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 al método de Aebi (1982).

En una celda de cuarzo se colocó 25 µL de homogeneizado del tejido de interés diluido 1:33 en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7), se adicionó 725 µL de H₂O₂ 7,7 mM e inmediatamente se midió el cambio de absorbancia a 240 nm a los 15 y 30 segundos de reacción. De acuerdo a 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 a la siguiente fórmula: $k = (1/t) (2,3 \times \log A1 / A2)$, donde t es

el intervalo de tiempo medido (seg), A1 y A2 son las absorbancias del H₂O₂ en los tiempos t1 y t2. Los resultados se expresaron como k/mg de proteína.

3.7.9.3. Actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx)

La actividad de la GPx en la corteza renal se determinó de manera similar a la actividad de la GPx plasmática, sólo difirió en la preparación de la dilución inicial de la muestra que, en este caso, es tejido homogeneizado en amortiguador de fosfatos (50 nM, pH 7,0) en una relación de concentración de 1:10 y los resultados se expresaron como U/mg de proteína.

3.7.9.4. Actividad de la Glutación 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: glutatión oxidado (GSSG), EDTA, NAD(P)H y la fuente de la enzima (homogeneizado de tejido). Se preparó 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 tejido homogeneizado (diluido 1:5) en amortiguador de fosfatos (el número de tubos dependió del número de muestras), 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 μ mol de NAD(P)H por minuto.

3.7.10. Cambios oxidativos finales en la corteza renal

3.7.10.1. Determinación de la peroxidación lipídica

Para esta determinación fue necesario hacer un preparado de membranas, el cual se realizó mediante el método descrito por Dodge y colaboradores (1963). Brevemente, las células se lisaron mediante el tratamiento con 10 volúmenes de amortiguador de fosfatos (5 mM, pH 7,4) a 4 °C, luego se dejaron sobre hielo por 30 min. El lisado obtenido se centrifugó a 20.000 g por 10 min a 4 °C y el sobrenadante se removió por aspiración. Las membranas precipitadas se lavaron 3 veces resuspendiendo con el mismo volumen de amortiguador de fosfato (5 mM, pH 7,4) recientemente preparado, y luego se centrifugó bajo las condiciones antes mencionadas. Finalmente, las membranas se resuspendieron en solución isotónica amortiguadora de fosfato.

El malondialdehído (MDA) es un dialdehído de 3 carbonos altamente reactivo producido a partir de los hidroperóxidos lipídicos, por lo que constituye un indicador importante de peroxidación lipídica. Para su medición, se utilizó el método de Buege y Aust (1978), que se fundamenta en la reacción de una molécula de MDA con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico a un pH entre 2 y 3. El

aducto formado exhibe una absorción primaria máxima a 532-535 nm y una secundaria más leve a 245 y 305 nm. Un volumen de la preparación de membranas (0,1-2 mg de proteínas/mL), se trató con 6 volúmenes de ácido fosfórico 1% P/V en HCl 0,1N y con dos volúmenes de ácido tiobarbitúrico (0,6%P/V en HCl 0,1 N), se mezcló y se incubó en agua hirviendo por 45 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y se procedió a realizar una extracción con n-butanol. En la fase alcohólica se encontró el complejo coloreado que se lee a 535 nm. En paralelo, se preparó un blanco de reactivos y una curva estándar de malondialdehído (0-500 μ M). Los resultados se expresaron como micromoles de malondialdehído presente en la muestra por mg de proteínas.

3.7.10.2. Determinación de las proteínas oxidadas totales

Las proteínas oxidadas se evaluaron mediante la determinación de los grupos carbonilos totales. Estos grupos carbonilos reaccionaron con la 2,4-dinitrofenil hidrazina (DNPH), para formar hidrazonas de proteínas (Reznick y Packer, 1994). El contenido de grupos carbonilos se ha utilizado como marcador de daño oxidativo a proteínas bajo condiciones de estrés (Stadman, 1992), ya que las EROs conducen a su formación al atacar a ciertos aminoácidos de las proteínas, tales como: la arginina, la lisina y la prolina (Dean y col., 1997).

La corteza renal (100 mg) se homogenizó en 900 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7,4) que contenía: un coctel de inhibidores de proteasas (leupeptina 5 μ g/mL, pepstatina 7 μ g/mL y aprotinina 5 μ g/mL), EDTA 1 mM y Tritón X-100 0,1%.

Luego el homogeneizado se centrifugó a 20.937 g por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, 300 µL del sobrenadante se incubaron con 100 µL de sulfato de estreptomina al 10%, para eliminar los ácidos nucleicos. Las muestras se incubaron durante 24 horas a 4°C y se centrifugaron a 20.937 g a 4°C durante 30 minutos (IEC MicroCL 17R, Thermo). Se tomaron dos alícuotas del sobrenadante, de 150 µL cada una; a la primera se le añadió 600 µL de DNPH 10 mM en HCl 2,5 M; mientras que a la otra se le añadió 600 µL de HCl 2,5 M.

Estas muestras se incubaron nuevamente durante 1 hora a temperatura ambiente y en la oscuridad, con agitación cada 15 minutos. Posteriormente, se adicionó 750 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20 %, las muestras se incubaron nuevamente a 4°C por 10 minutos y luego, se centrifugaron a 2.236 g a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó, se lavó con 600 µL de TCA al 10 % y, nuevamente, se centrifugó a 2.236 g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, los precipitados se lavaron dos veces con 600 µL de una mezcla de etanol-acetato de etilo 1:1 para remover el DNPH y libre y los lípidos contaminantes.

El precipitado final se disolvió en 1 mL de guanidina 6 M en amortiguador de fosfatos 20 mM (pH 2,3). Las muestras se leyeron a 370 nm y el contenido de grupos carbonilos se calculó mediante el coeficiente de absorción molar de la DNPH ($22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). El contenido total de proteínas se determinó a 280 nm mediante una curva estándar de albúmina (0,2 a 2,0 mg/mL). Los resultados se expresaron como nmol/mg de proteína.

3.8. Efecto del RT sobre el daño epitelial renal inducido por altas concentraciones de glucosa *in vitro*

3.8.1. 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 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.

3.8.2. Determinación de la citotoxicidad

Para evaluar los efectos del RT sobre la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa, se realizó el protocolo descrito por Kannan y Jain (1994) en células Vero y se empleó el ensayo de supervivencia celular desarrollado por Mosman (1983), el cual consiste en la formación de púrpura de formazán a partir

de una sal de tetrazolio, el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), en donde esta sal es reducida por la acción de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial.

Tabla I. Protocolo de tratamientos para los experimentos *in vitro*.

Citotoxicidad, proliferación celular, enzimas antioxidantes, daño oxidativo y western blot
NG, control con glucosa normal (8 mM).
HG, alta glucosa (35 mM)
RT (concentraciones crecientes)
HG + RT
L-NAME, H ₂ O ₂ o nitroprusiato de sodio, Forbol 12- Miristato 13-Acetato (PMA)
HG + L-NAME, H ₂ O ₂ o nitroprusiato de sodio, PMA
HG + RT + L-NAME, H ₂ O ₂ o nitroprusiato de sodio, PMA
Actividad del NF-κB
Medio, control
Medio + RT
Medio + PMA
Medio + PMA + RT

Para esto, 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 MTT (2,5 mg/mL) y se añadió 100 μ L 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 será disuelta con la incorporación de 100 μ L de DMSO. La placa se dejó reposar por 30 minutos para que se desarrollara el color 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.

3.8.3. Determinación de la proliferación celular

Se empleó el método de exclusión con azul de tripano, a través del conteo diario de las células vivas por microscopía. El azul de tripano es incapaz de atravesar las membranas plasmáticas de las células viables. De esta manera, se cultivaron 10000 células por placa individual en condiciones de glucosa normal o alta glucosa y tratadas con el RT. Las células se tripsinizaron y se contaron por grupo a las 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento. Los resultados se expresaron como células/mL.

3.8.4. 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 μ L para realizar los ensayos de las enzimas antioxidantes.

3.9. Efecto del RT sobre la expresión del NF- κ B en células HeLa

Para evaluar el efecto del RT sobre la actividad del factor de transcripción NF- κ B se empleó un sistema estable de células HeLa (carcinoma de cuello uterino) transfectadas con el gen reportero luciferasa, el cual es controlado por el promotor de la IL-6 con un sitio de unión al NF- κ B. La actividad de la luciferasa se determinó por luminiscencia a través de la reacción luciferasa-luciferina, la cual produjo un incremento de la emisión de luz. El PMA se utilizó como inductor de la actividad del NF- κ B mediante la activación de la PKC.

En resumen, se colocaron 5000 células por pozo en medio DMEM completo y se incubaron durante 48 horas. Posteriormente, el medio se removió y las células se trataron según los diferentes protocolos (tabla I), durante 24 horas. Luego las células se lavaron con PBS y seguidamente se les agregó amortiguador de lisis por 30 minutos. Las células fueron transferidas a un tubo y se centrifugaron a 12000 g durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se agregó 20 μ L de la muestra a cada pozo de una placa opaca y se midió la luminiscencia a una sensibilidad de 255, después de agregar 50 μ L del sustrato de luciferasa.

3.10. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro* se presentaron como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm$ EEM). 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. Los resultados con valores de $p < 0,05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Capacidad antioxidante del RT *in vitro*

El análisis del extracto de *R. tuberosa* L. (figura 16) demostró que contiene polifenoles, con un promedio de $18,46 \pm 1,9$ g equivalentes al ácido gálico por cada 100 g de extracto. Asimismo, tal y como se muestra en la figura 17, el extracto de RT fue capaz de atrapar al $O_2^{\cdot-}$ generado *in vitro* por el sistema: xantina-xantina oxidasa, de manera dependiente de la concentración. De esta manera el extracto muestra un importante perfil antioxidante, tanto por la presencia de compuestos químicos comúnmente atrapadores de EROs, así como también por su capacidad de reducir una de las más importantes especies involucradas en el daño renal en la diabetes, el $O_2^{\cdot-}$.

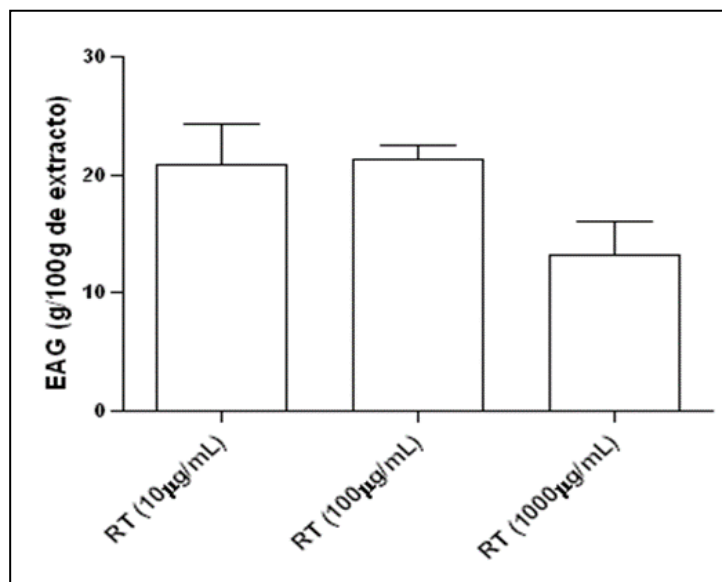


Figura 16. Contenido de polifenoles totales del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT). Los resultados se muestran como la media \pm EEM de equivalentes del ácido gálico (g/100g de extracto). N=9 por grupo.

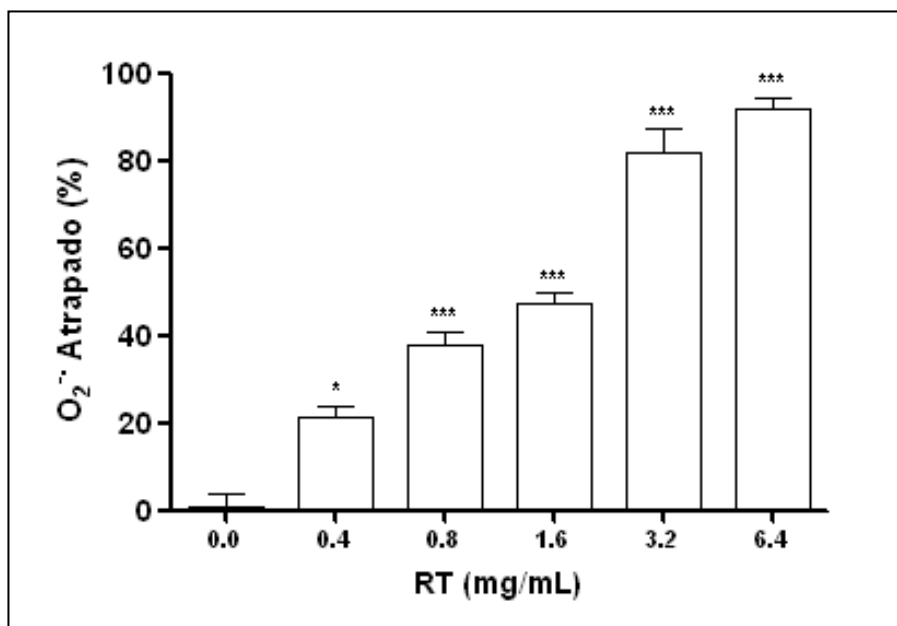


Figura 17. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la producción de O₂^{•-} generado por el sistema xantina/xantina oxidasa *in vitro*. Los datos se muestran como la media ± EEM. *p<0,05 y ***p< 0,001 con respecto al control. N=4 por grupo.

4.2. Estudios de toxicidad en animales de experimentación

Ninguna de las dosis utilizadas en el ensayo de toxicidad aguda en ratones, mostrarán alteraciones tóxicas en los animales observados durante 90 minutos de experimentación. Por lo tanto, no fue posible calcular la DT₅₀ ni la DL₅₀. De manera similar, los animales tratados durante 20 días con RT no mostraron alteraciones conductuales y sus principales órganos, tales como: el riñón, el hígado, el estómago, el corazón y el cerebro, no mostraron alteraciones morfológicas observables macroscópicamente cuando se comparó con el control.

Todo esto sugiere un índice de seguridad importante para el uso de algunas de estas dosis en los demás experimentos *in vivo*.

4.3. Efectos del RT sobre el daño renal en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina

4.3.1. Efecto del RT sobre la glucosa sanguínea

El extracto de RT presentó efectos hipoglicemiantes y antihiperглиemiantes agudos, ya que fue capaz de disminuir la glicemia tanto en animales normoglicémicos (Tabla II) como en animales hiperglicémicos (Tabla III) de manera comparable al hipoglicemiante de referencia, la glibenclamida. Estos efectos se manifestaron desde la hora y media de experimentación y se mantuvieron en forma sostenida hasta las nueve horas de observación. Desde que las diferentes dosis empleadas produjeron efectos en el mismo orden de magnitud, se seleccionó la menor dosis, de 10 mg/kg para ser utilizada en los experimentos crónicos *in vivo*.

En la figura 18 se muestra el curso temporal de la glicemia en animales no diabéticos y en animales con diabetes inducida por la ETZ, tratados con el RT durante 28 días. Como se observa, los animales diabéticos presentaron incrementos significativos de los valores de glicemia a los 7, 14, 21 y 28 días. El tratamiento con el extracto de RT, no alteró la glicemia en las ratas no diabéticas, pero ejerció un efecto antihiperглиemiante significativo ya que previno parcialmente el incremento de la glicemia inducida por la ETZ. Sin embargo, el

tratamiento con el RT fue incapaz de restaurar completamente a valores normales los niveles de glucosa sanguíneos de las ratas diabéticas.

Tabla II. Efecto agudo del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la glicemia en ratas no diabéticas.

Grupos	%Variación de glicemia				
	1,5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	2.35±5.15	0.17±5.66	-15.75±3.41	-16.64±4.02	-22.29±3.95
Glibenclamida (10 mg/kg)	-12.07±3.89*	-22.55±6.14*	-38.25±5.27**	-49.15±5.15**	-43.42±4.39**
Extracto <i>R. tuberosa</i> (10 mg/kg)	-8.82±4.08	-12.89±2.68	-22.67±3.80	-32.07±3.35*	-24.58±2.72
Extracto <i>R. tuberosa</i> (30 mg/kg)	3.51±3.59	-10.00±4.78	-25.23±4.04	-29.80±3.03*	-27.91±2.43
Extracto <i>R. tuberosa</i> (100 mg/kg)	-5.82±4.26	-3.06±3.67	-20.92±8.42	-34.75±4.81*	-31.09±5.55
Extracto <i>R. tuberosa</i> (300 mg/kg)	1.54±2.66	-22.32±2.21**	-31.07±2.37**	-36.60±2.95**	-35.49±3.36*

Los valores se muestran como la media ± EEM. *p<0,05 y **p< 0,01 con respecto al control. N=6 por grupo.

Tabla III. Efecto agudo del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la glicemia en ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina.

Grupos	Variación de glicemia (%)				
	1,5 h	3 h	5 h	7 h	9 h
Control (vehículo)	8.76±3.79	-3.99±3.66	-7.97±6.75	-9.85 ± 4.93	-17.63±3.36
Glibenclamida (10 mg/kg)	-17.83±7.72*	-23.48±7.08*	-34.65±6.80*	-35.43±5.97**	-33.95±5.66*
Extracto <i>R. tuberosa</i> (10 mg/kg)	-12.77±7.49*	-27.99±7.05*	-30.69±5.27*	-38.73±5.65**	-49.24±9.66*
Extracto <i>R. tuberosa</i> (30 mg/kg)	-4.93±4.63*	-17.86±4.70*	-26.64±4.85*	-27.02±4.22*	-33.87±5.39*
Extracto <i>R. tuberosa</i> (100 mg/kg)	-9.68±2.48**	-20.59±4.15*	-26.03±2.24*	-26.82±2.20*	-31.71±4.68*
Extracto <i>R. tuberosa</i> (300 mg/kg)	4.00±10.28	-16.48±7.11	-23.18±6.25	-28.88±3.66*	-31.36±4.05*

Los valores se muestran como la media ± EEM. *p<0,05 y **p< 0,01 con respecto al control. N=6 por grupo.

4.3.2. Efecto del RT sobre la variación de peso corporal

En la figura 19 se muestra el efecto de RT sobre la variación de peso corporal en las ratas. Como se observa, tanto los animales sanos como los animales

diabéticos que fueron tratados con el extracto de RT presentaron una disminución de leve a moderada del peso corporal en comparación con el grupo control, con una variación de peso de $-6 \pm 5,50$ y $-10,17 \pm 7,47$, respectivamente.

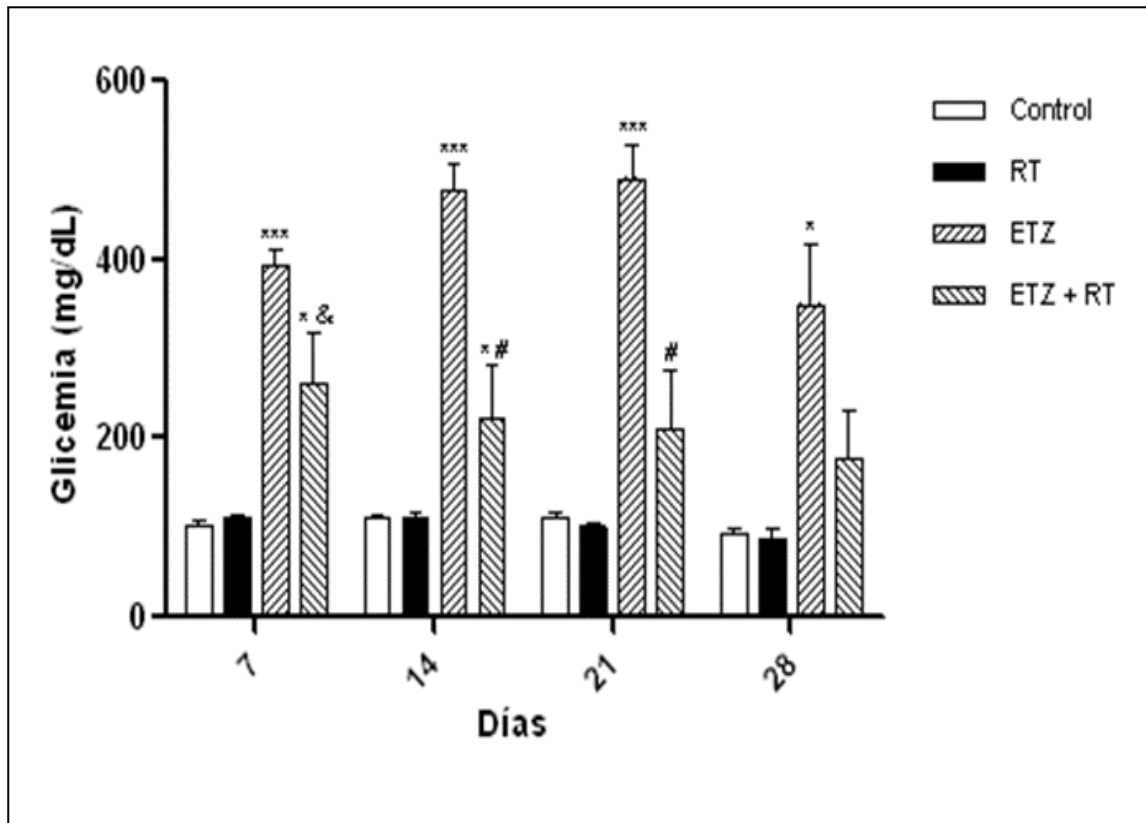


Figura 18. Curso temporal de la glicemia de ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ), tratadas con 10 mg/kg del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) durante 28 días. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control. [&] $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. # $p < 0,01$ con respecto al grupo ETZ. N=7 por grupo.

Los animales con diabetes inducida por la ETZ presentaron una disminución significativa del peso corporal en comparación con los animales controles, presentando una variación de peso sobre su propio basal de $-51,14 \pm 7,42$ g. El tratamiento con RT revirtió significativamente la reducción de peso inducida por la

ETZ, es decir la RT protege a las ratas diabéticas de la excesiva pérdida de peso, muy común en esta patología.

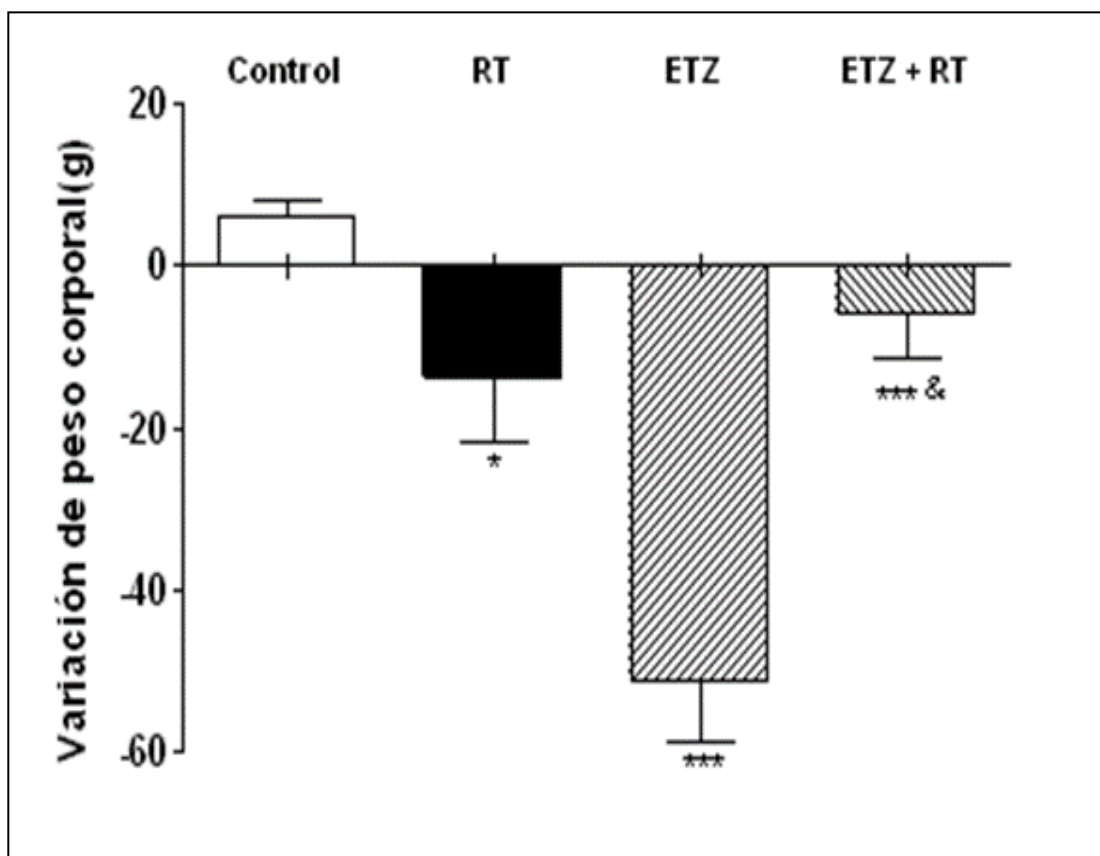


Figura 19. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la variación del peso corporal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) el día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=7 por grupo.

4.3.3. Efecto del RT sobre el volumen urinario

La diabetes inducida por ETZ en las ratas produjo un incremento significativo del volumen urinario a los 7, 14, 21 y 28 días de recolección de orina. El tratamiento

durante 28 días con 10 mg/kg/día del extracto de RT no alteró el volumen urinario en ratas no diabéticas, pero fue capaz de prevenir parcialmente el aumento de la diuresis inducida por la diabetes en el grupo ETZ (figura 20).

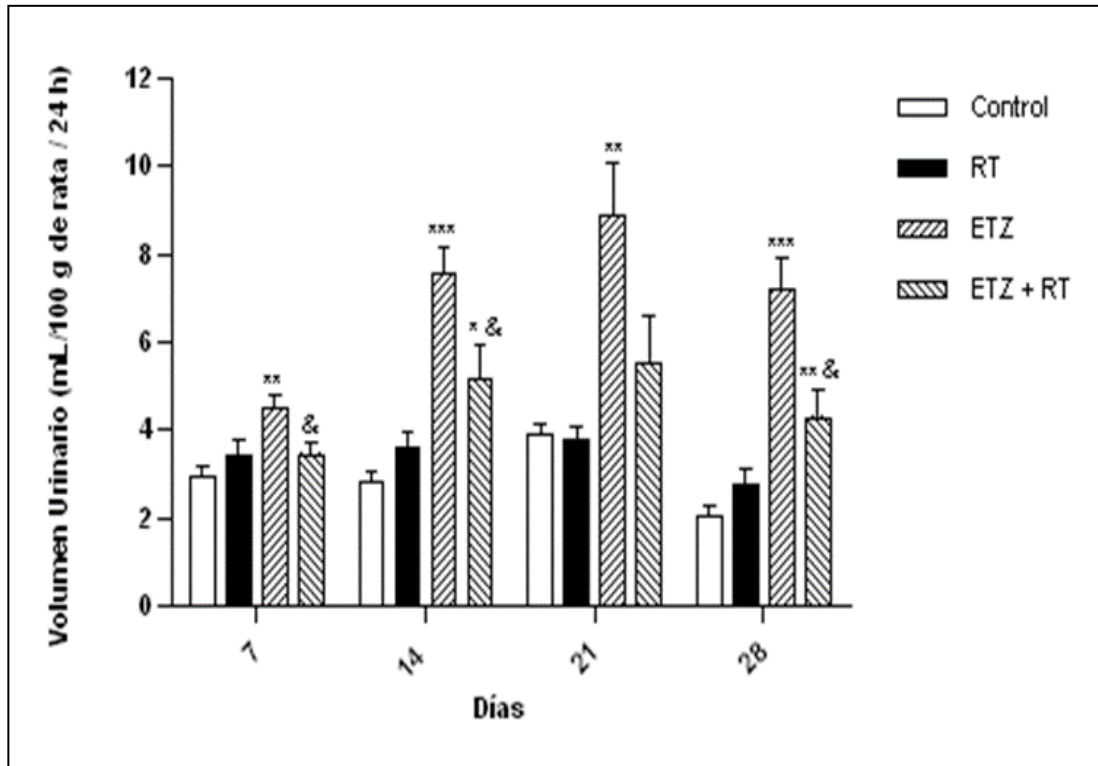


Figura 20. Cambios del volumen urinario de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) tratadas con 10 mg/kg del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) durante 28 días. Los valores se muestran como la media \pm EEM. ^{**} $p < 0,05$ y ^{***} $p < 0,001$ con respecto al control. ^{&epsilon} $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=7 por grupo.

4.3.4. Efecto del RT sobre los marcadores urinarios y plasmáticos del daño renal

Al evaluar el curso temporal de la excreción urinaria de proteínas, un marcador de daño glomerular, se observó que el tratamiento con ETZ produjo proteinuria

significativa a los 14, 21 y 28 días. En la figura 21 se observa que el tratamiento con el RT fue capaz de prevenir completamente el incremento en la excreción de proteínas urinarias inducida por la diabetes, manteniéndose a niveles similares al grupo control durante todo el tiempo de la recolección de la orina.

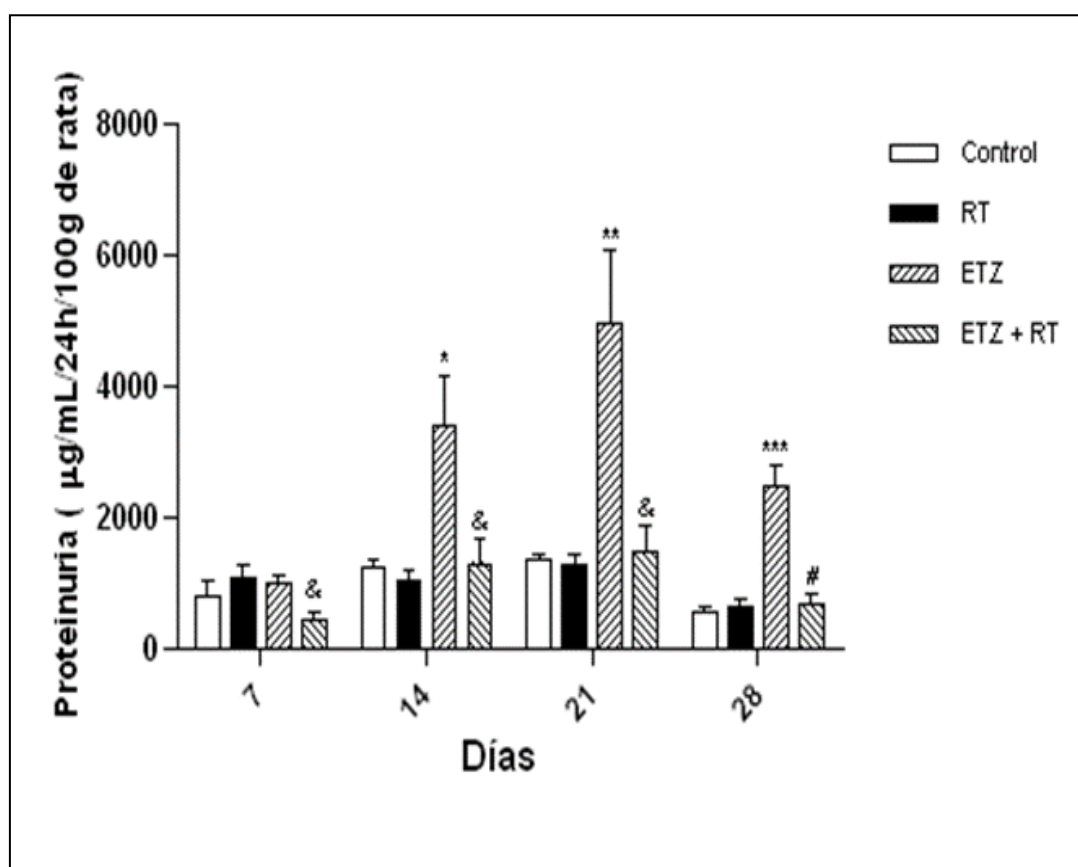


Figura 21. Curso temporal de la excreción urinaria de proteínas en ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) tratadas con 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) durante 28 días. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. # $p < 0,01$ con respecto al grupo ETZ. N=7 por grupo.

De igual forma, las ratas diabéticas mostraron incrementos de otros de los marcadores de daño renal como lo son el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina en el suero (figuras 22 y 23). El tratamiento por 28 días con el extracto

de RT fue capaz de revertir en forma significativa tanto el aumento del nitrógeno de ureico en sangre (BUN) como el de la creatinina en el suero inducida por la diabetes.

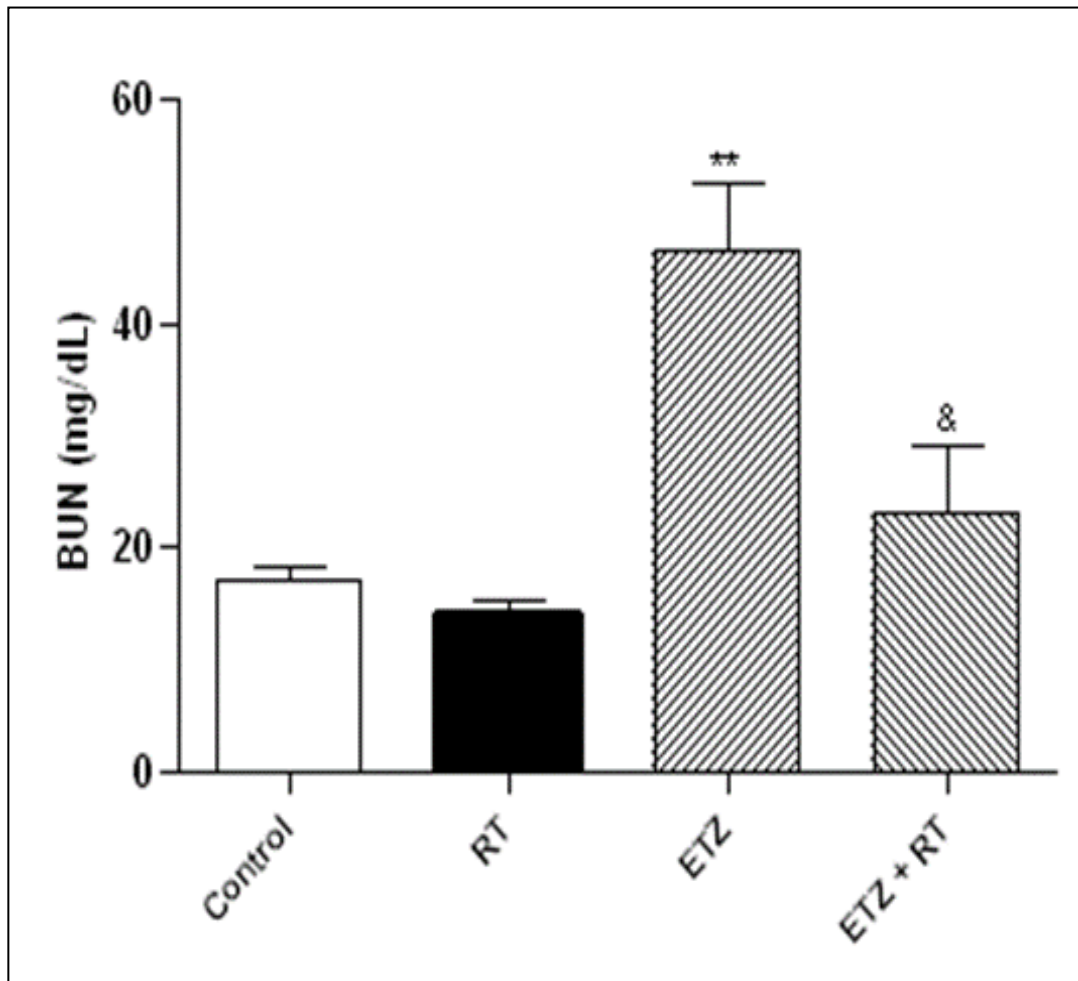


Figura 22. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la concentración de nitrógeno de la urea en sangre (BUN) de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. ** $p < 0,01$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

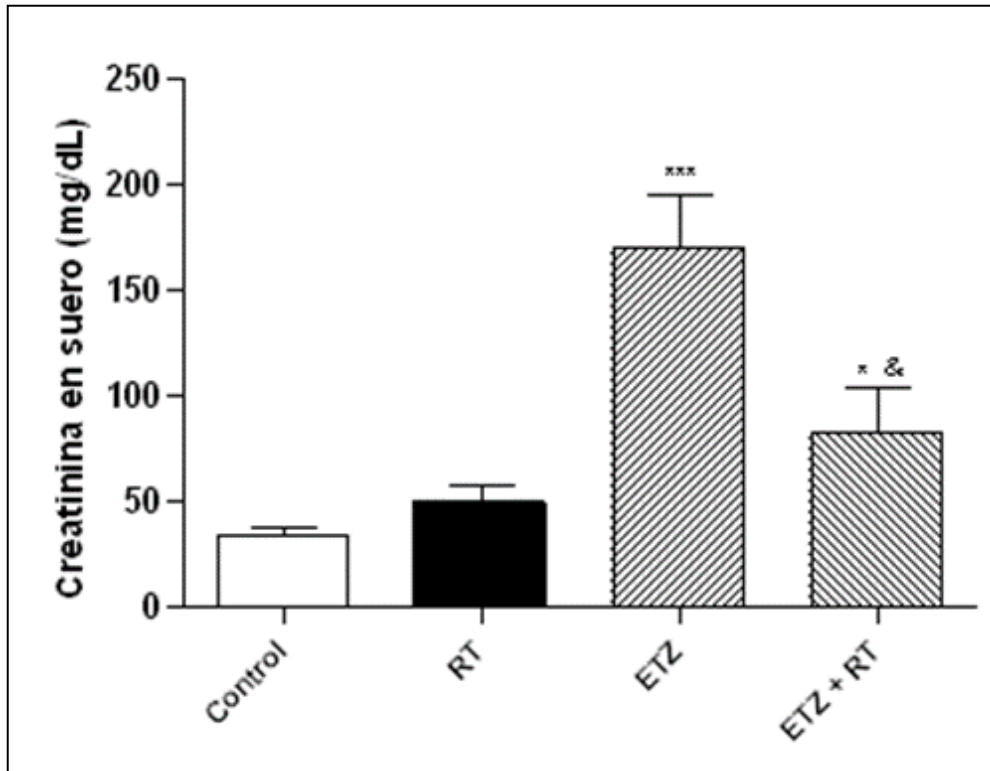


Figura 23. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la concentración creatinina en suero de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control. § $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

En la figura 24 se observa que el tratamiento con ETZ produce una reducción significativa de la excreción urinaria de creatinina, reducción que se corresponde con su incremento en el suero (figura 23). El tratamiento con el extracto de RT durante 28 días revirtió parcialmente la reducción de la excreción urinaria de creatinina en las ratas diabéticas, y este efecto se relacionó con la disminución de la concentración de creatinina en el suero del grupo ETZ tratado con el RT, el cual es similar al grupo control.

Al evaluar la actividad de la GPx plasmática, un marcador importante de daño tubular renal (figura 25), se observó que la ratas diabéticas presentan un incremento significativo de la actividad de la GPx plasmática y el tratamiento con el RT logró revertir el efecto de la diabetes sobre dicha actividad enzimática hasta valores comparables con el grupo control y con el grupo sano tratado con RT.

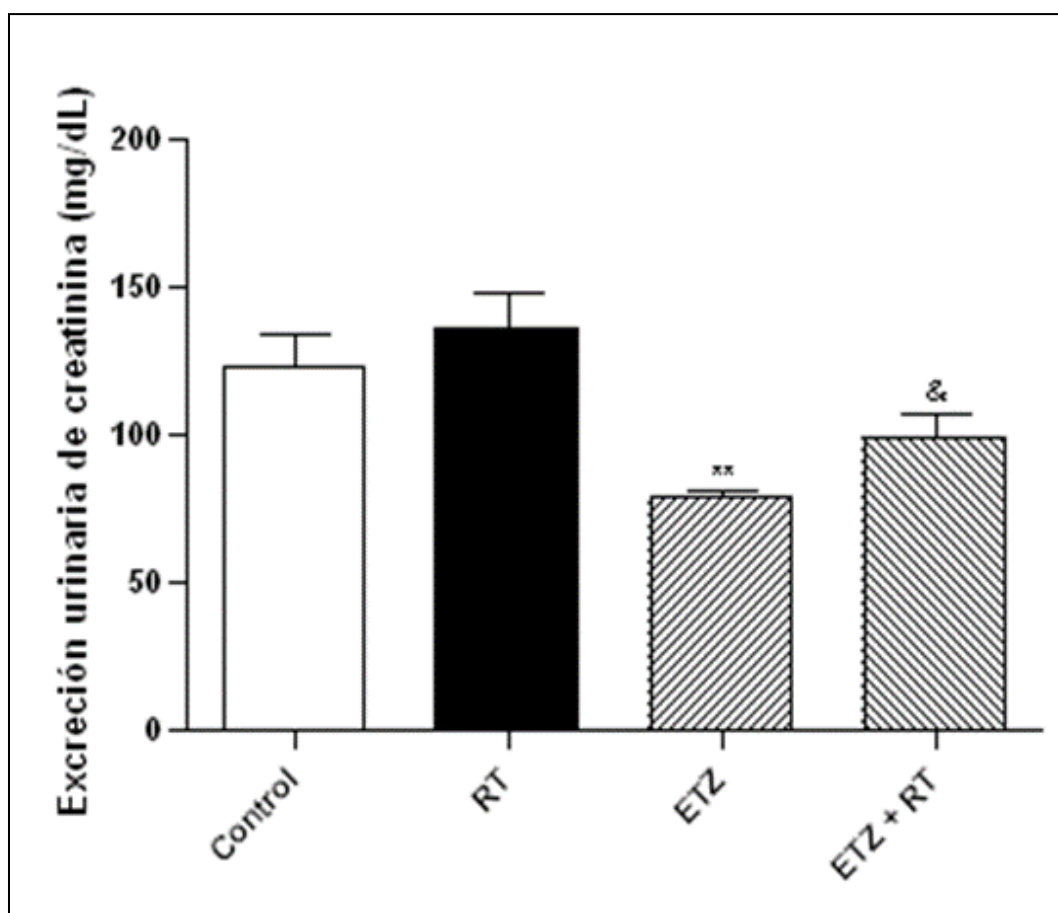


Figura 24. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la excreción urinaria de creatinina de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. ** $p < 0,01$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

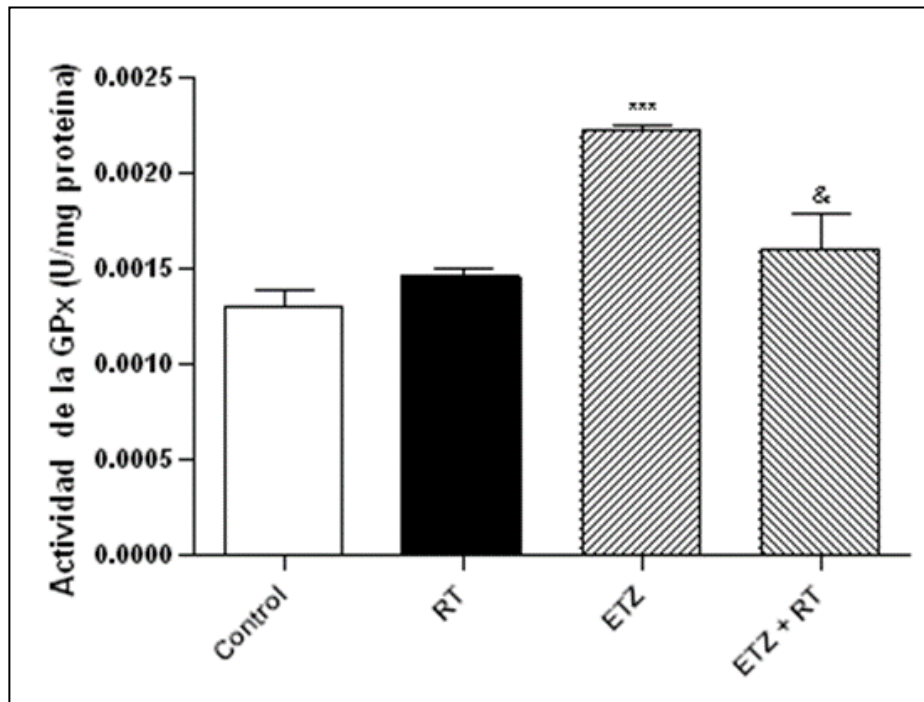


Figura 25. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) plasmática de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. *** $p < 0,01$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

4.3.5. Efecto del RT sobre los marcadores fibróticos

Tres de los marcadores más comunes de daño fibrótico, el peso renal, la cantidad de proteínas totales y de colágeno I renal, fueron alteradas en los animales con diabetes inducida por la ETZ. El tratamiento con el RT durante 28 días, fue capaz de revertir totalmente el incremento del peso del riñón y del contenido de colágeno I, así como también parcialmente en el incremento del contenido de proteínas totales (figuras 26, 27, 28 y 29).

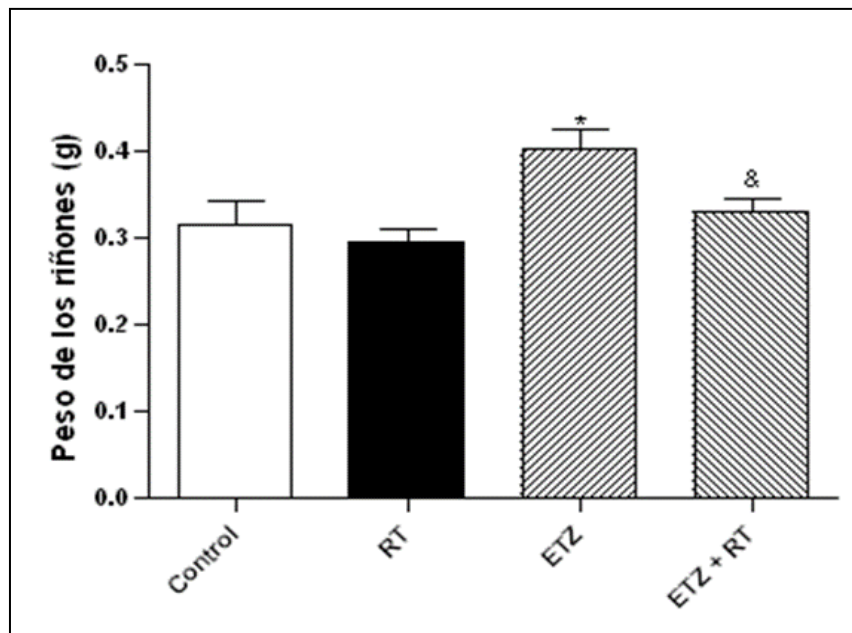


Figura 26. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el peso de los riñones de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

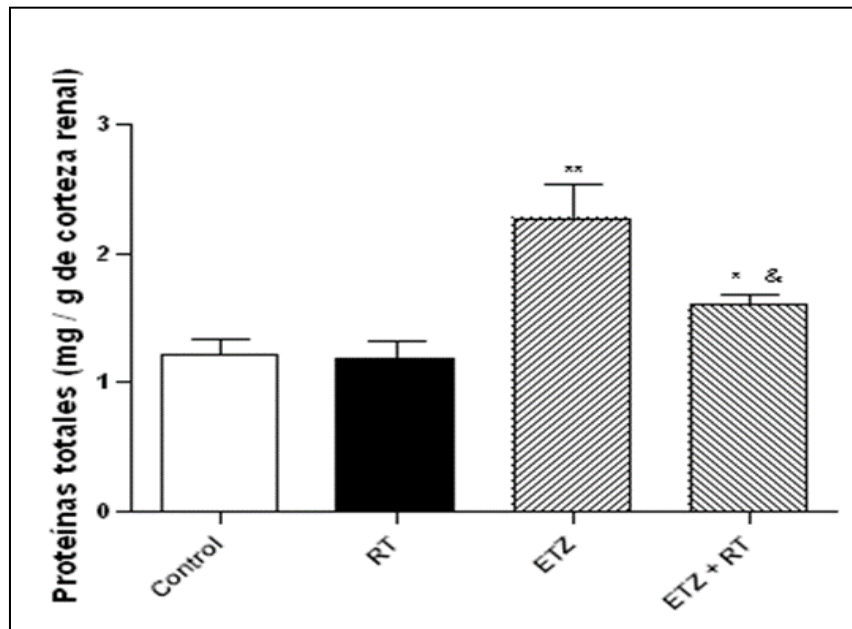


Figura 27. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la síntesis de proteínas en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

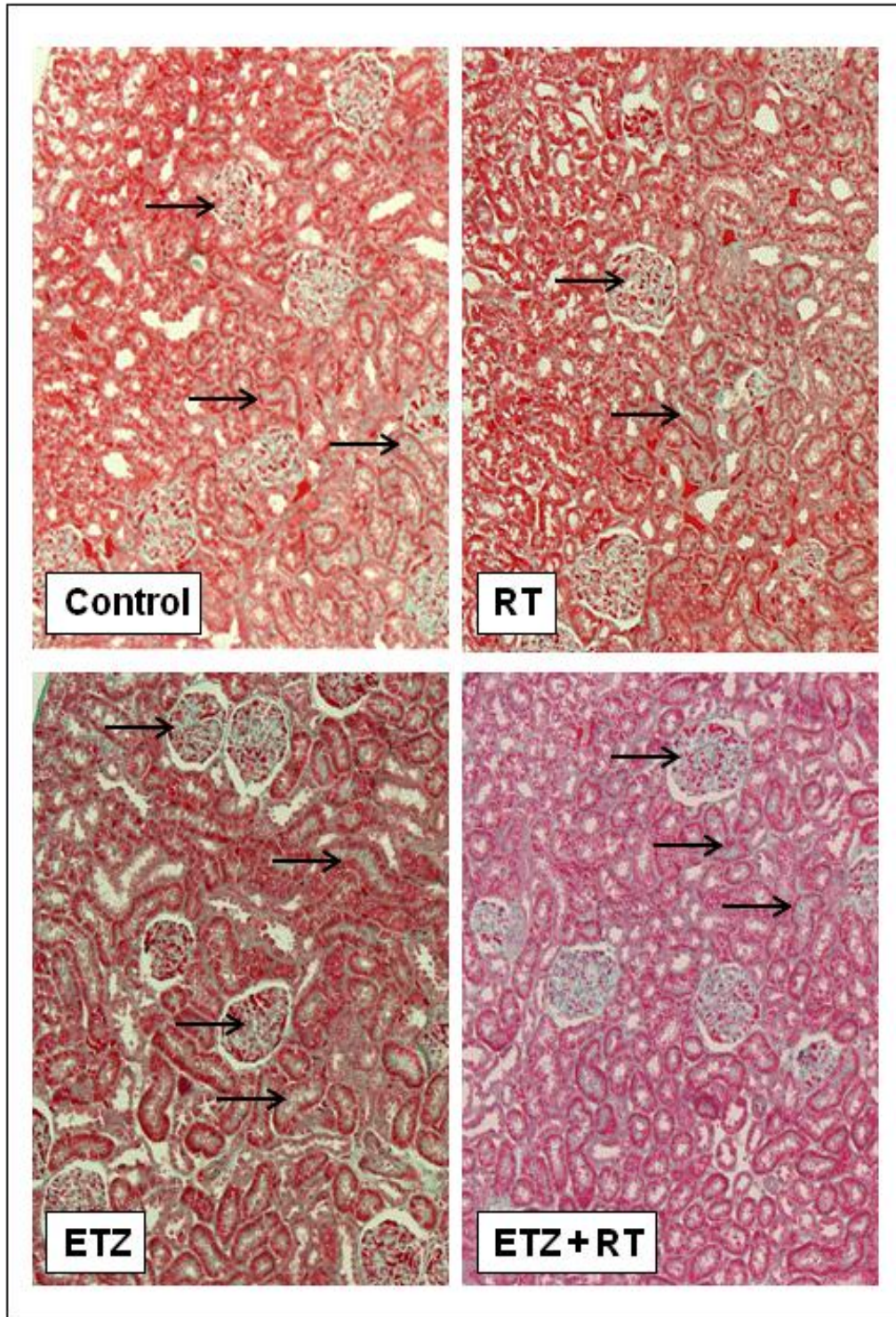


Figura 28. Foto representativa de microscopía óptica del efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el contenido de colágeno I en el riñón de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ), al día 28 de tratamiento. Las flechas indican la tinción del colágeno I por el tricrómico de Masson (en verde) a160x.

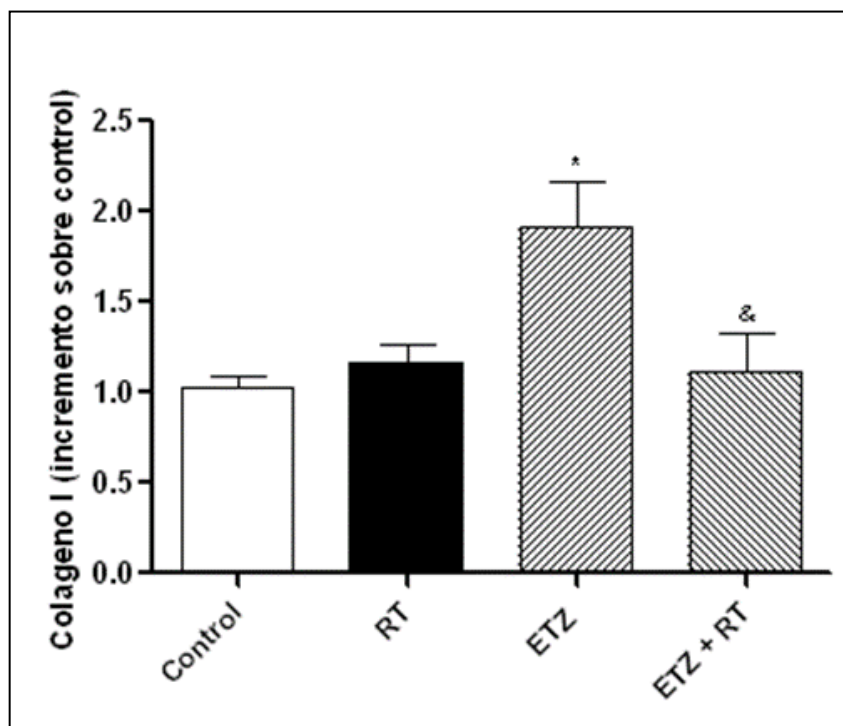


Figura 29. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el contenido de colágeno I en el riñón de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ), al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=4 por grupo.

4.3.6. Efecto del RT sobre el estrés oxidativo en la corteza renal

4.3.6.1. Efecto del RT sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal

En general, el tratamiento con ETZ redujo significativamente la actividad de todas las enzimas antioxidantes evaluadas en la corteza renal (figuras 30, 31, 32 y 33). El tratamiento con el RT revirtió parcialmente la disminución en las actividades de la CAT y la SOD total (figuras 30 y 33), mientras que abolió totalmente el decremento

inducido por la diabetes en las actividades de la GPx y fallo en revertir el efecto sobre la GR (figuras 31 y 32).

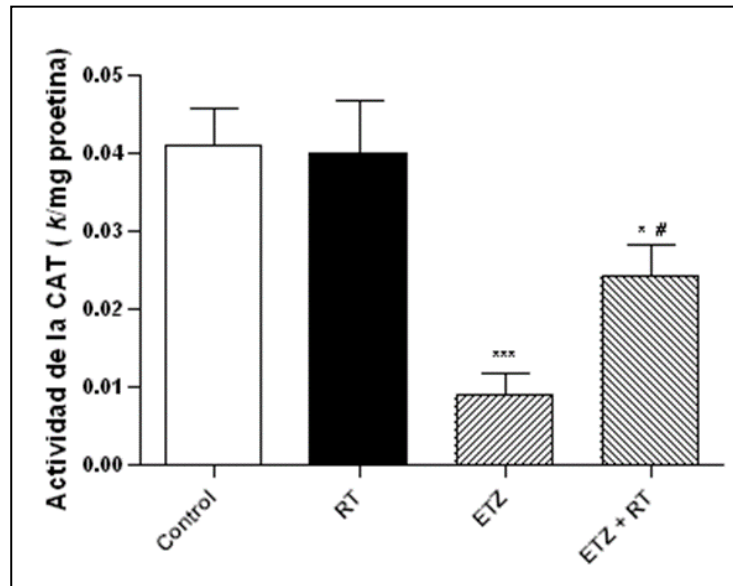


Figura 30. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la actividad de la catalasa (CAT) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control. # $p < 0,01$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

Al evaluar la actividad de las isoformas de la SOD, la CuZn-SOD (citoplasmática y extracelular) y la Mn-SOD (mitocondrial), se observó que el RT revirtió parcialmente la disminución de la actividad de la CuZn-SOD inducida por la diabetes, pero no alteró la actividad de la Mn-SOD (figuras 34, A y B). Más aún sobre esta última isoforma, la condición diabética mostró una fuerte tendencia hacia el incremento de la actividad de la enzima ($p=0,1$). En conjunto se muestra que el tratamiento con el RT ejerce un efecto renoprotector del daño oxidativo en la diabetes a través de la recuperación de la actividad de las enzimas CuZn-SOD, CAT y GPx.

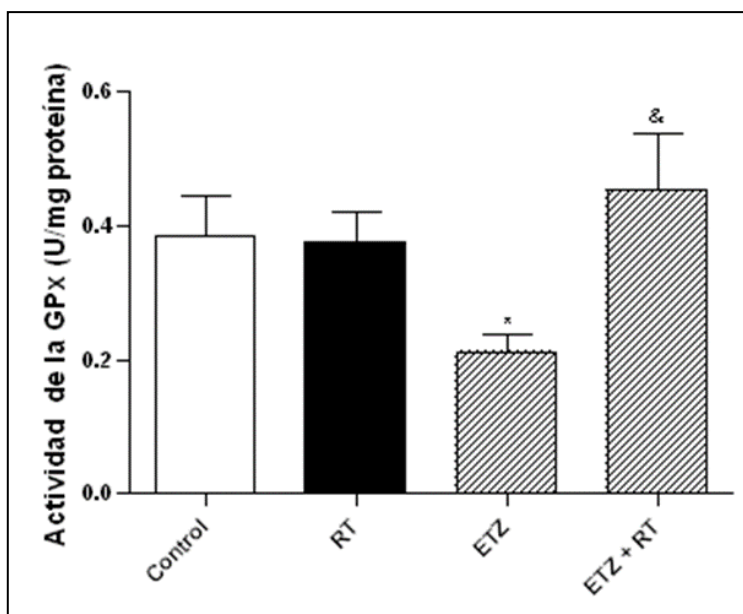


Figura 31. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

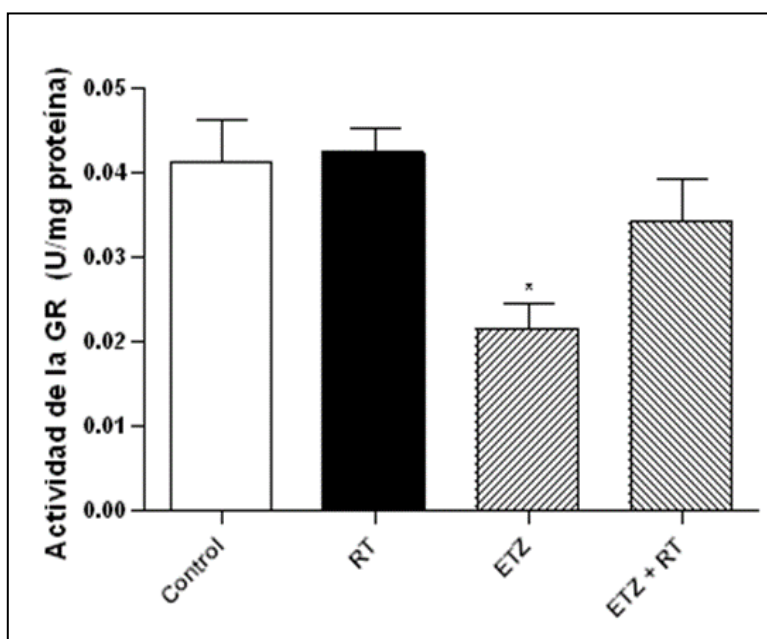


Figura 32. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ con respecto al control. N=5 por grupo.

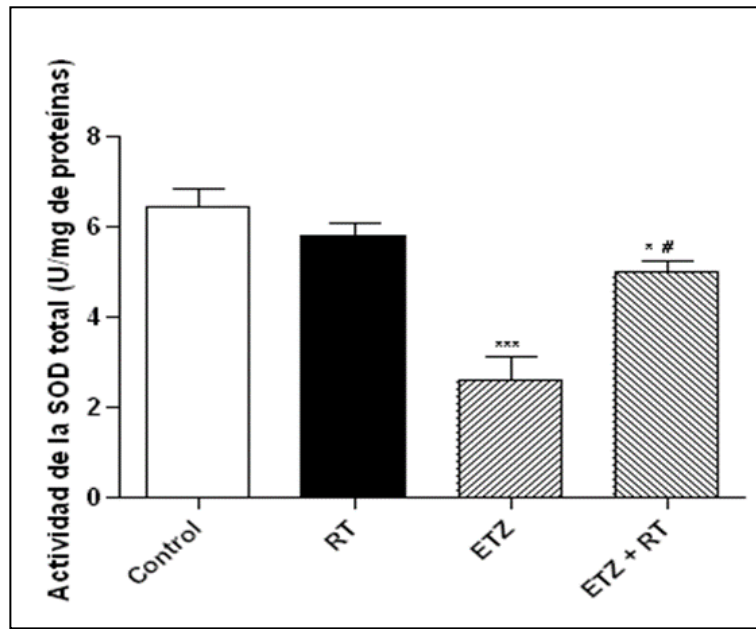


Figura 33. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la actividad de la superóxido dismutasa total (SOD) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control. # $p < 0,01$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

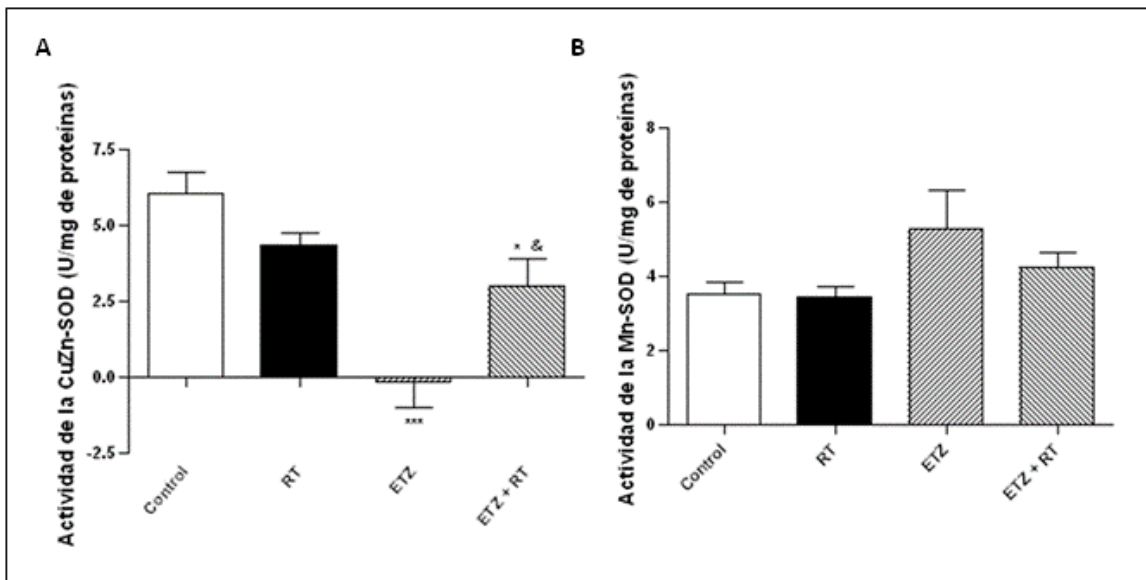


Figura 34. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la actividad de: A. la superóxido dismutasa dependiente de cobre y zinc (CuZn-SOD) y B. la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD) en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ con respecto al control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

4.3.6.2. Efecto del RT sobre los cambios oxidativos totales en la corteza renal

De los posibles daños oxidativos celulares finales, se evaluaron dos de los más importantes: las proteínas oxidadas y los lípidos oxidados. En cuanto a este último daño, se determinó el contenido de malondialdehído como marcador de la peroxidación lipídica, mientras que el contenido de los grupos carbonilos totales fue el indicador de la oxidación de las proteínas.

En los animales con diabetes inducida por la ETZ se observó un incremento significativo de ambos indicadores del estado oxidativo (figuras 35 y 36), reflejando de esta manera que en este modelo experimental la hiperglicemia es capaz de aumentar el estrés oxidativo renal.

El tratamiento con el RT durante 28 días bloqueó el aumento tanto del contenido de malondialdehído como de las proteínas oxidadas totales. Más aún, el tratamiento con el RT redujo el estrés oxidativo basal, analizado desde el punto de vista de la oxidación de proteínas (figura 36). Estos resultados guardan estrecha relación con la capacidad antioxidante de este extracto, así como del efecto sobre el sistema enzimático de defensa antioxidante.

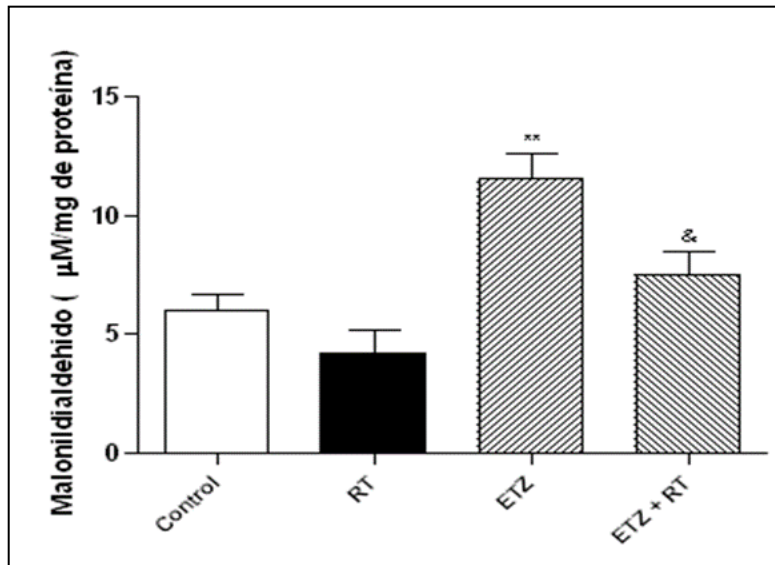


Figura 35. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la peroxidación lipídica en la corteza renal de ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. ** $p < 0,01$ con respecto al control. & $p < 0,01$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

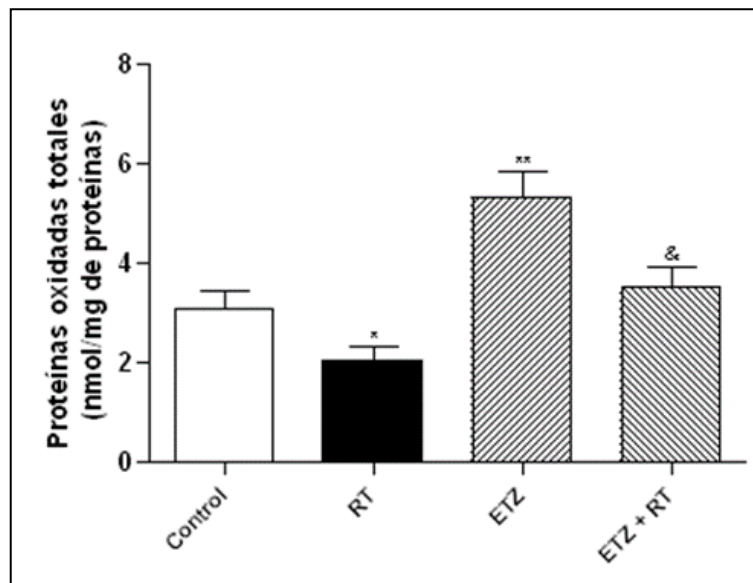


Figura 36. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el contenido de grupos carbonilos de las proteínas en la corteza renal de ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control. & $p < 0,01$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

4.4. Efectos del RT sobre el daño inducido por las altas concentraciones de glucosa en células de epitelio renal (Vero) en cultivo

4.4.1. Efecto del RT sobre la viabilidad y la proliferación celular

Para la validación del modelo y para establecer la concentración de RT a emplearse en los todos los experimentos *in vitro*, se evaluó el efecto del RT sobre la viabilidad de las células Vero en cultivo mediante la prueba del MTT. En la figura 37 se puede observar que ninguna de las concentraciones de RT evaluadas (10-400 $\mu\text{g/mL}$) produjo modificación de la viabilidad celular.

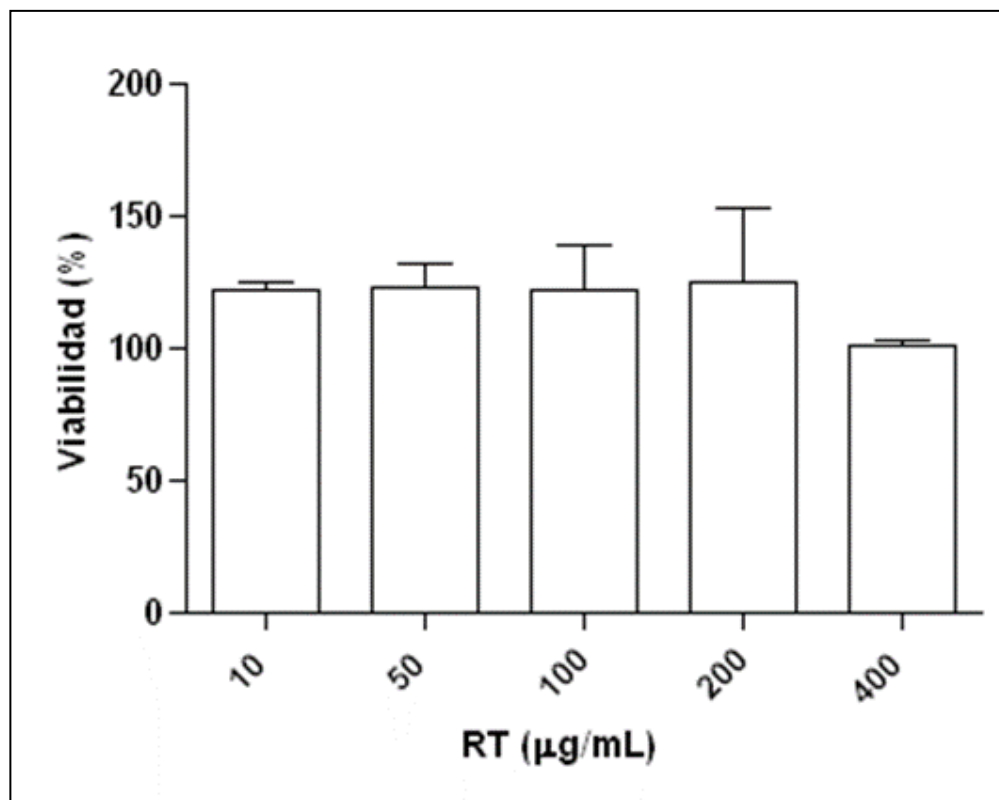


Figura 37. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la viabilidad de las célula Vero en cultivo. N=7 por grupo.

El tratamiento por 96 horas, de las células Vero con medio que contenía una alta concentración de glucosa (grupo HG, 35 mM), produjo un efecto citotóxico significativo ($p < 0,001$) en comparación con el grupo NG (8 mM de glucosa). Este efecto fue parcialmente abolido por el tratamiento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del RT (Figura 38), por lo que queda establecido que este extracto inhibe el efecto glucotóxico sobre las células renales *in vitro* en las condiciones experimentales utilizadas.

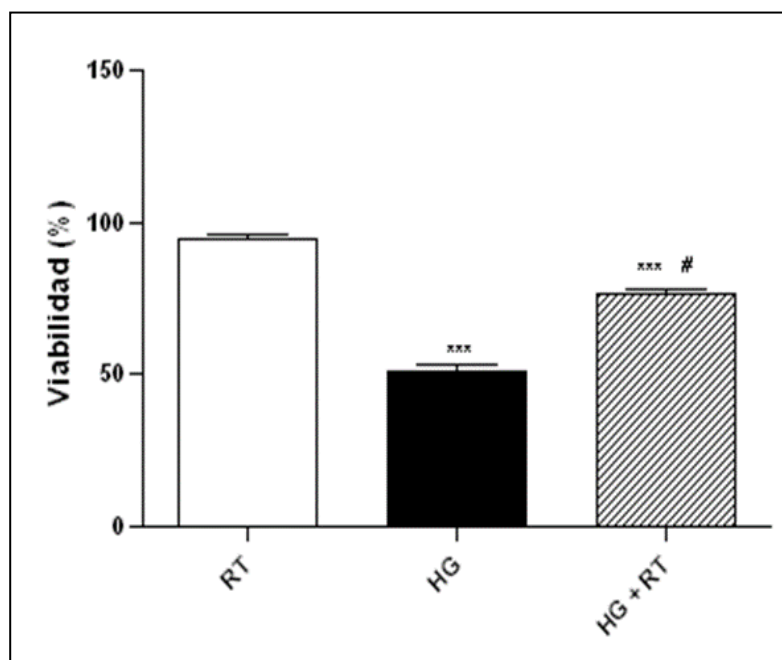


Figura 38. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. # $p < 0,001$ con respecto al grupo HG. N=13-20.

La reducción de la muerte celular inducida por el RT (efecto protector) resultó ser un efecto dependiente de la concentración del extracto (figura 39).

Asimismo, se evaluó la proliferación de las células Vero mediante un método de exclusión por azul de tripano. En este modelo la condición de alta concentración de glucosa trajo como consecuencia una disminución de la proliferación celular a partir de las 72 horas, efecto que fue parcialmente revertido por el tratamiento con el RT, mejorando de esta manera la tasa de crecimiento. Por si mismo, el RT produjo un efecto pro-proliferativo significativo ($p < 0,01$) a las 96 y 120 horas de experimentación cuando se compara con el grupo NG, disminuyendo el tiempo de duplicación de 35,3 a 25,7 horas (figura 40).

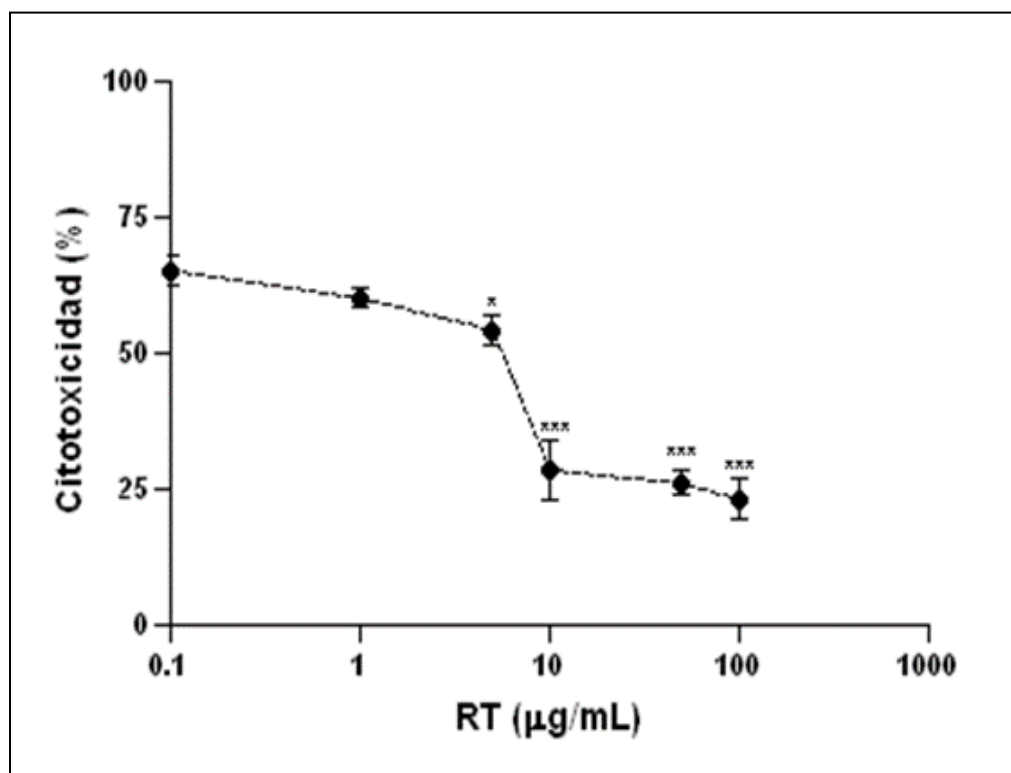


Figura 39. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 µg/mL) sobre la citotoxicidad inducida por la glucosa en células Vero. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,005$ y *** $p < 0,001$ con respecto al grupo HG. N=5 por grupo.

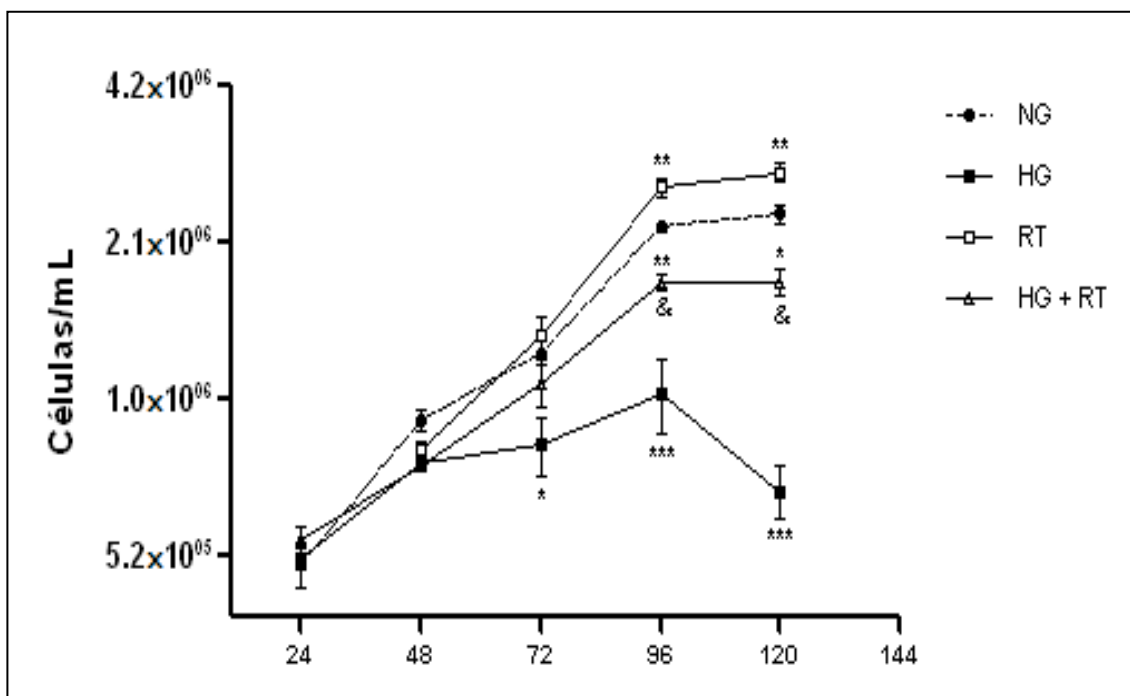


Figura 40. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 μ g/mL) sobre la proliferación de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ con respecto al grupo NG. & $p < 0,005$ con respecto al grupo HG. N=5 por grupo.

4.4.2. Efecto de la inhibición de la SON 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 ON sobre la respuesta protectora del RT sobre la citotoxicidad inducida por la glucosa. Como se observa en la figura 41, en células Vero en condiciones de glucosa normal, el bloqueo de la 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 ($p < 0,001$).

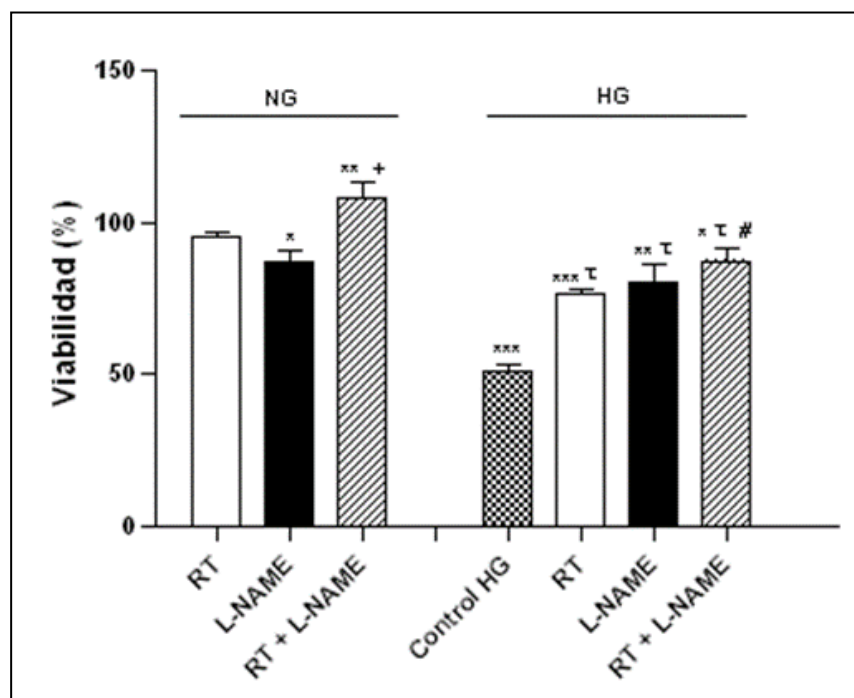


Figura 41. Efecto de la inhibición de la SON por el L-NAME (1mg/mL) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 µg/mL) frente a disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,005$, ** $p < 0,01$ 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 por grupo.

En la figura 42 se puede observar que la combinación del RT con el NPS, un donador de ON, 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 ON 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.

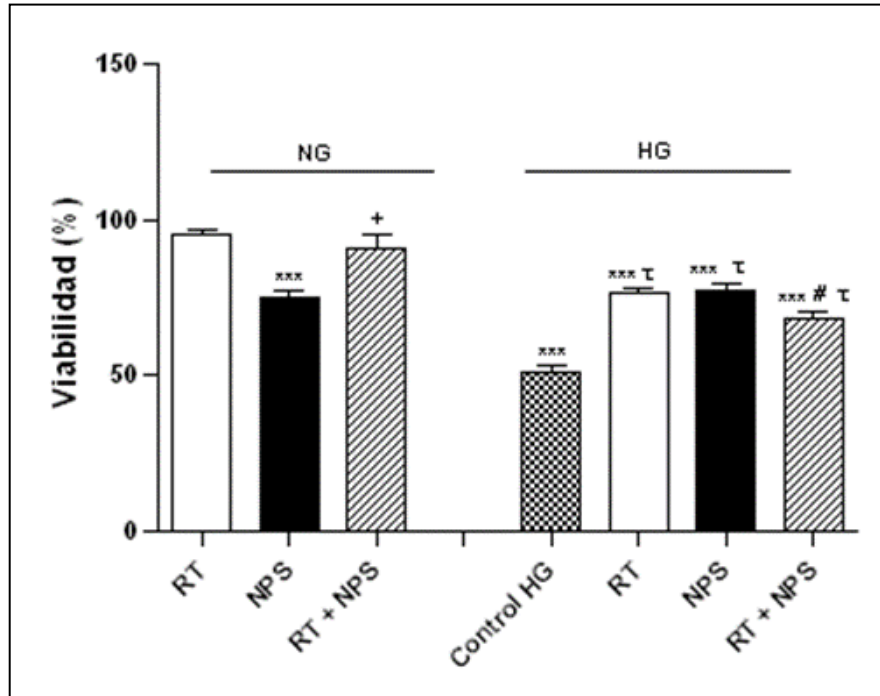


Figura 42. Efecto del nitroprusiato de sodio (NPS, 100 μ M) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 μ g/mL) frente a la disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. *** $p < 0,001$ 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 por grupo.

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

En la figura 43 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 co-tratamiento con el RT, mostrando un importante efecto protector en otro modelo de estrés oxidativo adicional al del ambiente HG. En este último, el H₂O₂ 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).

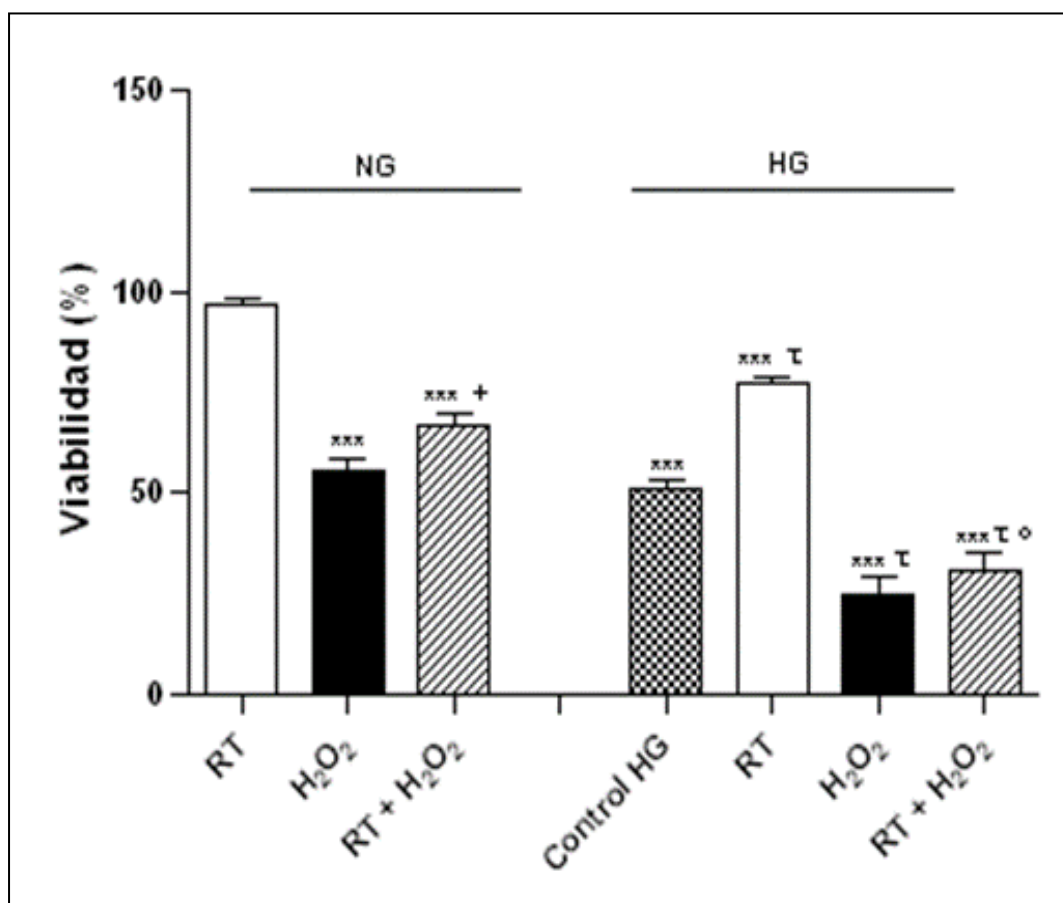


Figura 43. Efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 100 µM) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 µg/mL) frente a la disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media ± EEM. ***p<0,001 con respecto al grupo RT. +p<0,01 con respecto al grupo H₂O₂. T p<0,001 con respecto al control HG. ° p<0,01 con respecto al grupo RT en HG. N=8-16 por grupo.

4.4.4. Efecto del RT sobre la actividad de las enzimas antioxidantes

De manera similar a lo observado en la corteza renal de los animales hiperglicémicos, la condición de alta concentración de glucosa *in vitro*, también disminuyó la actividad de todas las enzimas antioxidantes evaluadas (figuras 44 al 47). El tratamiento *in vitro* con RT incrementó significativamente (figura 44, $p < 0,05$) 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 (figura 44 a 47). Estos efectos se relacionan con la actividad protectora frente al daño oxidativo y nitrosativo.

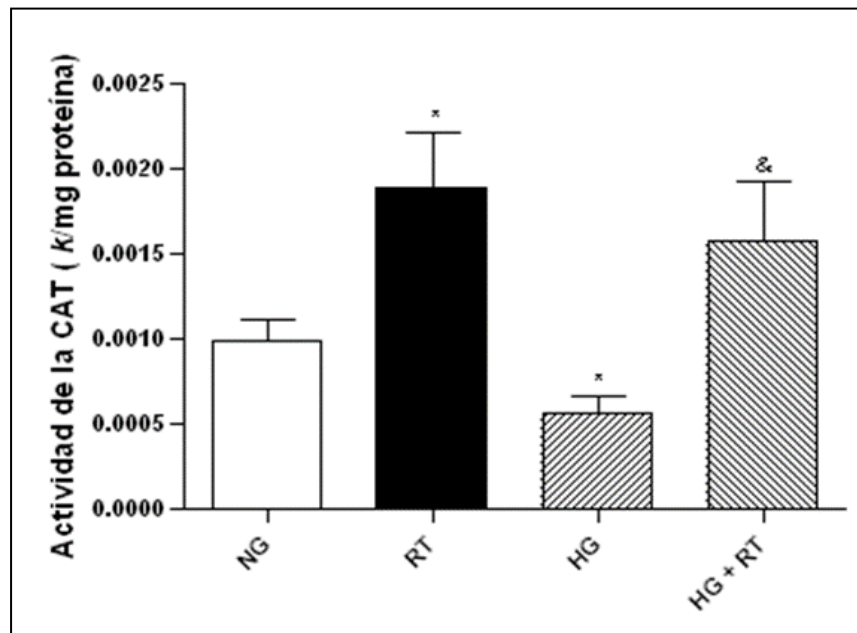


Figura 44. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la actividad de la catalasa (CAT) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ con respecto al grupo NG. & $p < 0,05$ con respecto al grupo HG. N=5 por grupo.

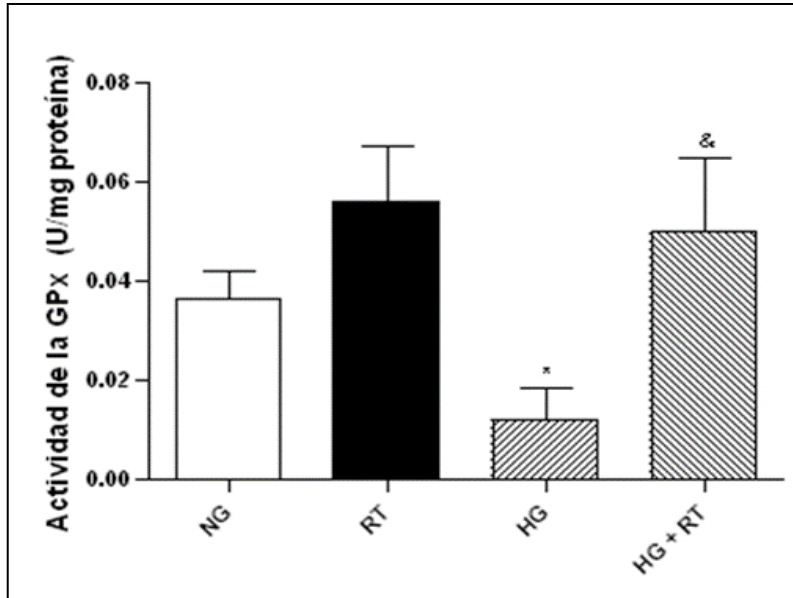


Figura 45. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 µg/mL) sobre la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media ± EEM. *p<0,05 con respecto al grupo NG. &p<0,05 con respecto al grupo HG. N=5 por grupo.

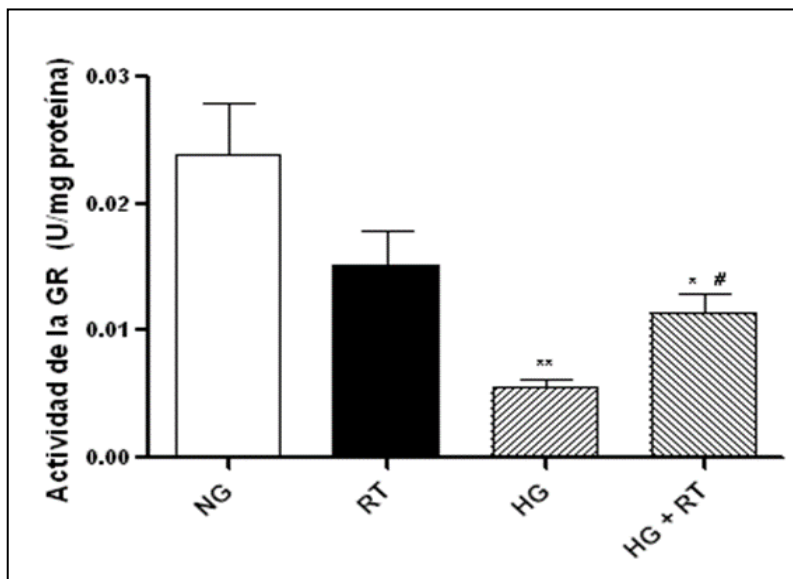


Figura 46. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 µg/mL) sobre la actividad de la glutatión reductasa (GR) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media ± EEM. *p<0,05 **p<0,01 con respecto al grupo NG. #p<0,01 con respecto al grupo HG. N=5 por grupo.

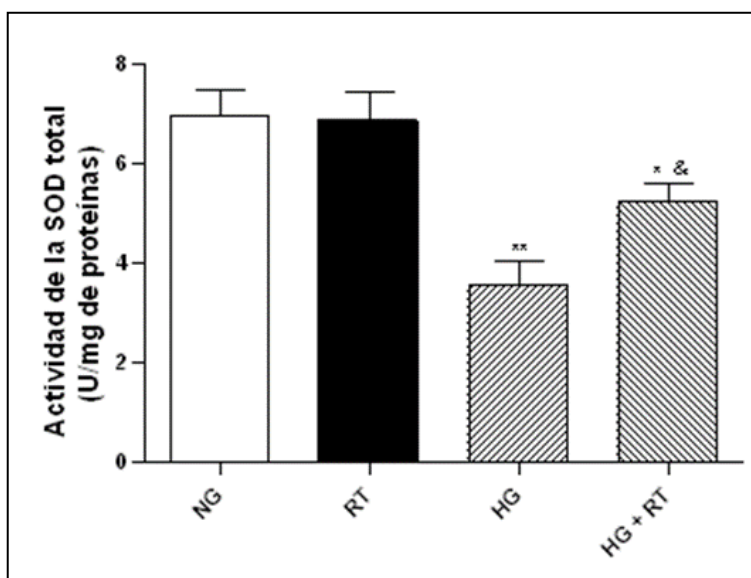


Figura 47. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la actividad de superóxido dismutasa total (SOD) en células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ con respecto al grupo NG. & $p < 0,05$ con respecto al grupo HG. N=5 por grupo.

5.4.5. Efecto de la señalización de la PKC sobre la acción del RT

Se evaluó el papel de la señalización de la PKC en el aumento del estrés oxidativo. En la figura 48 se observa la modulación del efecto protector del RT sobre la disminución de la viabilidad celular en HG por acción de un estimulante de la PKC, el éster de forbol (PMA). En condiciones de glucosa normal, el PMA disminuyó discretamente ($p < 0,05$) la viabilidad basal del RT. Sin embargo, en ambiente de alta glucosa, el PMA redujo por sí mismo la viabilidad celular y bloqueó completamente el efecto protector del RT ($p < 0,001$), a niveles citotóxicos similares al HG solo.

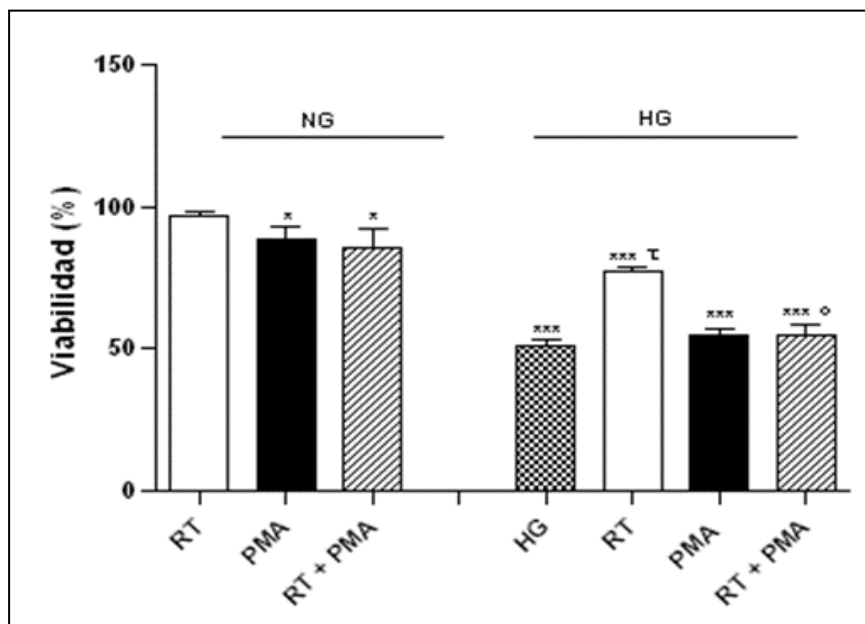


Figura 48. Efecto de la inducción de la PKC por el 12-miristato-13 acetato de forbol (PMA, 10 nM) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 µg/mL) frente a disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG respectivamente). Los valores se muestran como la media ± EEM. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ con respecto al grupo RT. ^T $p < 0,01$ con respecto al grupo H_2O_2 . ^o $p < 0,01$ con respecto al grupo RT en HG. N=8-16 por grupo.

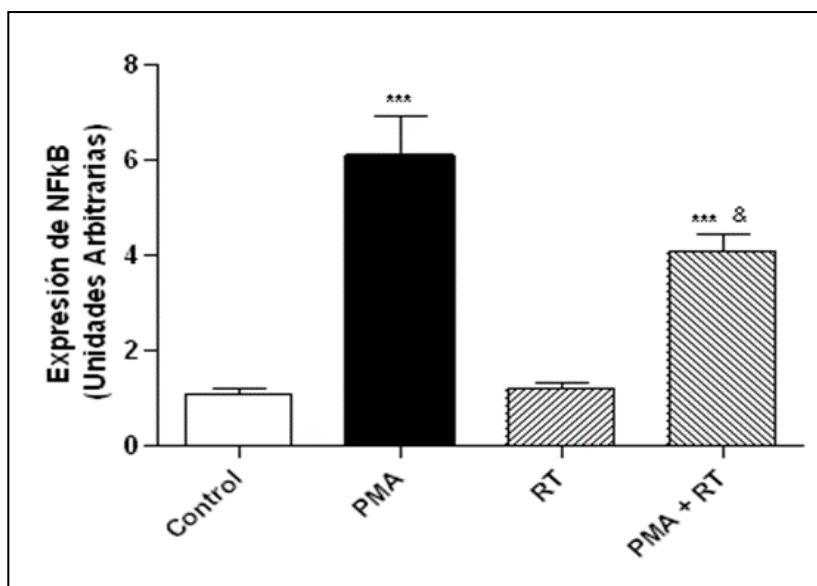


Figura 49. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 µg/mL) sobre la expresión del factor NF-κB, basal y estimulada por el PMA (10 nM) en células de cáncer de cuello uterino (HeLa) transfectadas con el gen reportero luciferasa. Los valores se muestran como la media ± EEM. *** $p < 0,001$ con respecto al grupo control. & $p < 0,05$ con respecto al grupo PMA. n=4.

Ya que los efectos del PMA sobre la acción del RT en el modelo de glucotoxicidad renal *in vitro* se relacionan con el efecto inhibitor del RT sobre la expresión del NF- κ B, se evaluó el efecto del extracto de RT sobre la expresión de NF- κ B en células HeLa, estimuladas o no con PMA (figura 49). Como se observa el PMA incrementó la expresión del NF- κ B, y RT redujo significativamente el efecto del PMA sobre la expresión del NF- κ B en células HeLa. Lo que indica un efecto contraregulatorio a la acción de la PKC, un importante inductor de la expresión y la actividad de este factor relacionado con el estrés.

5. DISCUSIÓN

La diabetes es una enfermedad metabólica responsable del metabolismo anómalo de los hidratos de carbono, caracterizada por una hiperglicemia resultante de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas (American Diabetes Association, 2007^{a,b}; Organización Mundial de la Salud, 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, artereoscleróticas, 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 DM2 (US Renal Data System, 2003).

Uno de los mecanismos propuestos para el daño endotelial y renal por la hiperglicemia es la formación de EROs (Brownlee, 2001; Sen y col., 1996). Recientes estudios sugieren que la hiperglicemia induce estrés oxidativo y disminuye los mecanismos de defensa antioxidante (Nishikawa y cols.2000). Estas especies reactivas inician la modificación de lípidos, proteínas, carbohidratos y 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.

Entonces la acción de la EROs representa un fenómeno crucial involucrado en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad microvascular. Además de las ROS, 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 DAG/PKC/MAPK/NF- κ B en condiciones de alta concentración de glucosa (Koya y col., 1997; Haneda y col., 2001; Kawan y col., 2005; 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 pro-fibróticos, 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).

Es por ello que 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., 2012)

Se sabe que los flavonoides constituyen uno de los ya bien conocidos polifenoles en las plantas superiores. En esta planta se han descrito varios tipos de

polifenoles, como la apigenina, luteolina, 3, 5-diglucósido, apigenina 7-O-glucurónido, apigenina glucósido, apigenina rutinósido, luteolina glucósido, pedalitina, flavona glucósido, cirsimaritina, malvinina, cirsimarina, cirsioliola 4'-glucósido, sorbifolina, pedalitina, entre otros. Los compuestos polifenólicos, no solo se caracterizan por ser antioxidantes sino también por inhibir la activación de moléculas tales como: las MAPK, el NF- κ B, TGF- β , entre otros (Santagelo y col., 2007; Han y col., 2007). Es por ello que resulta plausible la evaluación del RT como posible arma farmacológica de origen natural para el tratamiento de la nefropatía asociada a la DM1.

Unos de los modelos animales más utilizados para el estudio del daño renal en la diabetes es aquel inducido por la ETZ en la rata (Jensen y col., 1981; Verspohl, 2002). Éste representa principalmente un modelo de diabetes tipo 1, debido al enorme daño apoptótico que sufren las células β pancreáticas y, por ende, el agotamiento de la insulina (Verspohl, 2002). Algunos signos comunes de la diabetes en humanos son fielmente reproducidos en las ratas con diabetes inducida por la EZT, entre ellos destacan: la hiperglicemia, la pérdida de peso, la proteinuria, el aumento de la diuresis, del BUN, de la creatinina plasmática, el ensanchamiento del glomérulo y la fibrosis renal (Jensen y col., 1981; Jim y col., 2012).

Todas estas alteraciones están relacionadas con el establecimiento de la nefropatía diabética. Adicionalmente este modelo ha resultado atractivo, por el bajo daño renal inducido por la ETZ *per se*, por lo que los cambios de la

bioquímica y la función renal se le adjudican a la condición hiperglicémica, en comparación con otros modelos como el de la diabetes inducida por el aloxano, en el cual el compuesto inductor de la diabetes contribuye de manera importante al daño renal (Evan y col., 1984).

El posible papel terapéutico del extracto del RT se evidencia en los resultados obtenidos en el presente estudio donde se demuestra que el tratamiento crónico con el RT en ratas con diabetes inducida por la ETZ fue capaz de reducir o abolir algunas de las alteraciones típicas de la diabetes experimental, sin producir efectos tóxicos. Nuestros hallazgos se confirman con los reportados recientemente por Rajan y col. (2012) quienes demostraron que dosis tan elevadas como 5000 mg/kg de las hojas de *R. tuberosa* L., no produjeron toxicidad en la rata. En conjunto, estos resultados contribuyen al establecimiento del uso seguro de esta especie en ensayos *in vivo*.

Una de las características más evidentes en la diabetes es, sin lugar a dudas, la pérdida de peso corporal, lo cual ha sido ampliamente evidenciado en los animales con diabetes inducida por la ETZ (Zafar y col., 2010). De manera similar a otras plantas antidiabéticas, tales como, *Aloe vera* L., *Momordica charantia* L. y *Phyllanthus niruri* L., el RT inhibió la pérdida de peso corporal inducido por la diabetes (figura 19). Un aspecto importante que relaciona a estas especies antidiabéticas entre sí, es su capacidad antioxidante, lo cual también guarda relación con sus actividades hipoglicemiantes y antihiperglicemiantes (Bavarva y col., 2007; Teoh y col., 2010; Madhavi y col., 2012). El RT mostró no solamente

que parte de sus constituyentes son compuestos polifenólicos, sino que también es capaz de atrapar el O_2^- , estableciéndose así su capacidad antioxidante (figura 16 y 17). Nuestros resultados son similares a los obtenidos con el tratamiento con extractos de las partes aéreas de *R. tuberosa* L., los cuales fueron capaces de atrapar tanto a el O_2^- como al H_2O_2 y al ON (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011 b; Kensa y col., 2012).

La pérdida de peso en la diabetes se ha atribuido a la deficiencia de insulina, razón por la cual la terapia con insulina es capaz de revertir el efecto y aumentar la ganancia de peso de los pacientes diabéticos (Russel-Jonesy Khan, 2006). Algunos polifenoles han mostrado que ejercen efectos similares a la insulina (insulino-mimético), tal es el caso del resveratrol, las catequinas y la naringenina, los cuales no sólo estimulan la captación tisular de glucosa sino también restablecen algunas vías metabólicas alteradas, tales como la glicólisis y la glucogénesis (Su y col., 2006; Daisy y col., 2010; Zygmunt y col., 2010).

Adicionalmente, el polifenol luteonina, el cual está presente en las partes aéreas (Chothani y col., 2010), pero se desconoce si se encuentra en el RT, ha mostrado también capacidad de prevenir la pérdida de peso de las ratas con diabetes inducida por la ETZ (Wang y col., 2011). De la misma manera, el atrapador de O_2^- mimético de la SOD, el tempol, se ha reportado como supresor de la acción de la diabetes sobre el peso corporal en este modelo experimental (Luan y col., 2012).

A pesar que no se ha estudiado si el RT tiene un efecto sobre la captación de glucosa o sobre la secreción de insulina, este extracto produjo un importante efecto antihiperlicemiantes, tanto agudo como crónico (Tabla III, figura 18), lo cual concuerda con los trabajos de Chothani y col. (2010b), de Ullah y col. (2012) y de Rajan y col. (2012), quienes demostraron que las hojas y partes aéreas de *R. tuberosa* L. disminuyen la glucosa sanguínea en un modelo de diabetes tipo II en ratas, en conejos con diabetes inducida por el aloxano y en ratas con diabetes inducida por el aloxano, respectivamente. Algunos componentes químicos de esta especie tales como: la apigenina, la luteolina, la malvidina han mostrado actividad hipoglicemiantes en animales diabéticos (Panda y Kar, 2007; Grace y col., 2009; Wang y col., 2011) sugiriendo la posibilidad que estos compuestos o sus glicósidos, sean los responsables del efecto antidiabético del RT.

La evidencia sugiere que el RT podría ejercer un efecto protector del daño renal inducido por la hiperglicemia. Nuestros resultados apuntan a esa posibilidad ya que el tratamiento crónico con el extracto fue capaz de revertir la aparición de los marcadores de daño renal como son: la diuresis, la proteinuria, el incremento de la creatinina plasmática, el BUN y la GPx plasmática (figura 20, 21, 22, 23 y 25). Resultados similares fueron reportados por Manikandan y Arokia (2010^a), quienes utilizando el extracto hidroalcohólico de las hojas frescas de *R. tuberosa* L. revirtieron el incremento del BUN y la creatinina plasmática en ratas con diabetes inducida por el aloxano, reforzando aún más la idea que estos extractos comparten componentes químicos similares. En apoyo a estos resultados, existe evidencia que otras especies antiabéticas y antioxidantes, tales como: *Panax*

ginseng C. A. Meyer y *Ginkgo biloba* L., así como también polifenoles, tales como: la mangiferina, el galato de epigallocatequina, la quercetina y la luteonina, son capaces de inhibir la alteración de estos marcadores del daño renal en las ratas con diabetes inducida por la ETZ (Anjaneyulu y col., 2004; Yamabe y col., 2006; Lu y col., 2007; Sawiress, 2011; Wang y col., 2011).

Los cambios en estos marcadores están acompañados de eventos fibróticos que se reflejan en el incremento del peso del riñón, el aumento de la síntesis de proteínas totales y, en particular, de la expresión de proteínas de la matriz extracelular, tales como, el colágeno I, IV, la fibronectina y la laminina, que conducen al ensanchamiento de la membrana basal glomerular, a la glomérulo esclerosis, a la hiperfiltración, a la proteinuria, entre otros, estableciéndose así la nefropatía diabética (Steffes y col., 1992; Lane y col., 1993; Craven y col., 1997; Ha y Lee; 2003; Iglesias y col., 2002; Mason y Wahab, 2003; Skill y col., 2004; Kamalakkannan y col., 2006; Shah y col., 2007). Se ha asociado el incremento de la expresión de colágeno I al desarrollo del daño renal en la diabetes, tanto *in vivo* (Tan y col., 2005; Taita y col., 2008) como *in vitro* (Han y col., 1999; Wu y col., 2009). Nuestros resultados sugieren que el RT protege al riñón del daño asociado a la hiperglicemia por impedir el aumento de la deposición de colágeno a nivel glomerular y tubular, lo cual guarda estrecha relación con la reversión de los efectos de la diabetes sobre los marcadores de daño renal en nuestro modelo animal.

Sever-Hansen (1976) evaluó los cambios en el peso, el contenido de proteínas, de ARN y de ADN en riñones de ratas con diabetes inducida por la ETZ, reportando que el riñón aumenta de peso en un 15 y 90% a los 3 y 42 días de inducción de la diabetes, respectivamente. Asimismo, el contenido de proteínas y de ARN mostró un aumento de similar magnitud. Estos cambios fueron revertidos por el tratamiento con la insulina, lo que sugiere que estas alteraciones fibróticas son responsabilidad de la hiperglicemia. Al respecto, en el presente trabajo se demostró que el tratamiento con el RT disminuye significativamente tanto el peso del riñón como el contenido de proteínas totales en la rata con diabetes inducida por la ETZ (figuras 26 y 27), lo que apoya aun más el papel renoprotector de la RT. Hay que destacar que este extracto también disminuye la glicemia, guardando relación de esta manera con las observaciones de Sever-Hansen (1976) con respecto a la proporcionalidad de la hiperglicemia con el daño renal. Por otro lado, su perfil como antioxidante también podría estar relacionado con la inhibición de la fibrosis, tal como ha sido descrito para otros importantes antioxidantes tales como: el tempol y el tirón (Xia y col., 2006).

Se sabe que algunas de las alteraciones renales observadas en la diabetes, como la proteinuria y la fibrosis, son mediadas a nivel genómico por el TGF- β y el VEGF-A, los cuales son estimulados en la diabetes por la sobreactivación del sistema renina angiotensina y el incremento del $O_2^{\cdot-}$, todo esto acompañado de activación de la vía de señalización DAG/PKC/MAPK/NF- κ B (Asaba y col., 2005; Wolf y Ziyadeh., 2007; Gnudi, 2008; Sahib y col., 2009), de manera que la capacidad antioxidante del RT podría estar implicada en su efecto protector sobre el daño

renal, tal como en el caso del tempol, cuyo efecto nefroprotector es atribuido en gran parte a la disminución de la expresión del TGF- β_1 en ratas con diabetes inducida por la ETZ (Luan y col., 2012).

Otro posible blanco de acción del RT precisamente se enfoca en la vía de señalización DAG/PKC/MAPK/NF- κ B, esto se plantea por los hallazgos en los que se muestra a este extracto como inhibidor de la expresión del NF- κ B inducida por el PMA, un activador de la PKC, en células HeLa en cultivo (figura 49). Yang y colaboradores (2008) demostraron que las altas concentraciones de glucosa inducen la expresión y la activación de este factor en las células del endotelio glomerular en cultivo, lo cual fue asociado a la fosforilación del I κ -B α (proteína inhibidora específica del NF- κ B) inducida por la activación de la PKC y subsiguiente formación de las EROs (Yang y col., 2008).

Indudablemente, estos hallazgos guardan relación con el efecto inhibitorio sobre la actividad del NF- κ B de tienen algunos antioxidantes, tales como: los polifenoles de la uva y el ácido lipóico en células del epitelio renal cultivadas bajo un alta concentración de glucosa (Fujii y col., 2006; Kim y col., 2009; Kin y col., 2010) y la curcumina, el tocoferol, el tocotrienol, la S-alil-cisteína, la S-propil-cisteína y el tempol, en modelos animales de diabetes (Chiu y col., 2009; Ebenezer y col., 2009; Kuhad y Chopra, 2009; Mong y Yin, 2012). Adicionalmente, el RT en un modelo de citotoxicidad inducido por la glucosa en células de epitelio renal (células Vero) en cultivo, demostró que es capaz de bloquear la reducción de la viabilidad celular, efecto que fue abolido por el co-tratamiento con el PMA (figura 48). Esto

indica que la activación de la señalización de la PKC es contraregulatoria a las acciones del RT y que por esta razón, puede existir una producción adicional de EROs, distinta a la inducida por la alta concentración de glucosa, que agotaría la actividad reductora del extracto.

En conjunto, es probable que el RT, a través de su capacidad de disminuir el estrés oxidativo, proteja al riñón del daño glucotóxico al inhibir el aumento de la expresión del NF- κ B en la diabetes.

Esta idea es consistente con la evidencia reciente que señala al RT como un potente antiinflamatorio en el modelo del edema de la pata de la rata inducido por la carragenina (Pastorello y col., 2012), modelo de inflamación ligado al aumento de la señalización del NF- κ B (Belky y col., 2011; Huang y col., 2012; Wang y col., 2012).

Bajo un ambiente prolongado de alta concentración de glucosa las células tanto de epitelio tubular como las mesangiales sufren inhibición de la proliferación y apoptosis asociada a un incremento de la formación de las EROs (Park y col., 2001; Ha y col., 2002^{a,b} ; Allen y col., 2003; Verzola y col., 2004, Samikkannu y col., 2006; Khera; 2006). Kannan y Jain (1994) demostraron que concentraciones de glucosa entre 20 y 100 mM causan una reducción de alrededor del 50% de la viabilidad celular en comparación con el control de 8 mM de glucosa. Ya que este efecto glucotóxico se acompaña de un aumento del estrés oxidativo, este modelo constituye una herramienta útil para el estudio de los efectos de la glucosa sobre

las células renales. En este sentido, nuestros resultados apoyan estos hallazgos en cuanto a que el tratamiento con 35 mM de glucosa produjo una reducción de la viabilidad de las células Vero del $50,94 \pm 2,48$ % (figura 36), siendo este efecto inhibido significativamente por el RT de manera dependiente de la concentración (figura 37). Estos resultados se confirman por los obtenidos en el ensayo de proliferación celular a través de un método de exclusión (figura 38), en el cual se muestra por un lado, un efecto pro-proliferativo del RT en condiciones basales y por otro un bloqueo parcial de la disminución del número de células inducida por el ambiente glucotóxico. Todos estos resultados sugieren un efecto protector del extracto sobre daño renal inducido por la alta glucosa *in vitro*.

La respuesta del RT sobre la viabilidad de las células Vero, no solo fue modificada por el tratamiento con el PMA, sino también por el aumento del estrés oxidativo y nitrosativo inducido por el H₂O₂ y el NPS, respectivamente (figuras 42,43 y 48).

La activación de la PKC por ésteres de forból como el PMA favorece la activación de de las MAPKs y del TGF- β (Craven y col., 1990; Haneda y col., 2001; Idris y col., 2001; Parker y Murria, 2004). La actividad de la PKC se ha visto amentada en modelos animales de diabetes y en células del endotelio vascular, del endotelio glomerular, del epitelio tubular renal y en células mesangiales cultivadas en presencia de alta concentración de glucosa (Craven y DeRubertis, 1989, Studer y col., 1997; Quagliaro y col., 2003; Xia y col., 2006; Yang y col., 2008; Li y col., 2010). Tanto el PMA como la HG inducen, de manera equiparable, la producción de las EROs en células del músculo liso vascular en cultivo, ambas a través de

la activación de la NAD(P)H oxidasa (Inoguchi y col., 2000). Asimismo, se ha descrito que el PMA (100 nM) induce apoptosis en varias líneas celulares, incluyendo a las células de epitelio tubular renal (Ragolia y col., 2003; Tahara y col., 2009; Chen y col., 2011) y el aumento de la activación de la isoforma PKC- δ ha sido asociada a la apoptosis tubular renal y a la proteinuria en ratones con diabetes inducida por la ETZ (Li y col., 2010) y al incremento de la expresión de colágeno I y IV en células mesagiales cultivadas en la HG (Baccora y col., 1997). Sin embargo, nuestros resultados reflejan que el PMA a concentraciones de 10 nM produce solo un leve efecto citotóxico sobre las células Vero tratadas durante 96 horas bajo concentraciones normales de glucosa, sin modificar el efecto de la HG sobre estas células (figura 48). Esto podría ser atribuido a una posible disminución de la señal del NF- κ B, lo cual ha sido reportado en células de epitelio de colon sometidas a una activación sostenida de la PKC (Park y col., 2007).

El efecto del PMA no es revertido por el RT bajo ninguna condición, mientras que la del HG si fue suprimida, mostrándose así el impacto de la activación conjunta de las señales bajo ambas condiciones sobre la muerte celular. No obstante, es conocido que parte del mecanismo protector de los antioxidantes tales como: el α -tocoferol, la taurina, la N-acetil-cisteína, el tirón y el tempol, frente al daño inducido por la HG, involucra la reducción de la activación de la PKC y del estrés oxidativo (Studer y col., 1997; McCarty, 1998; Xia y col., 2006).

Tanto las EROs como las ERNs cumplen una función importante en el mantenimiento de la homeostasis renal, un desbalance en la producción de alguna

de ellas traería como consecuencia alteraciones de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, conduciendo a la apoptosis y al daño renal (Wagener y col., 2009). Es importante mencionar que el estrés oxidativo ha sido asociado con el aumento de la morbilidad y la mortalidad de pacientes con enfermedad renal terminal (Locatelli y col., 2003).

En la diabetes, el estrés oxidativo es considerado como el principal factor involucrado en la nefropatía diabética (Forbe y col., 2008). Se conoce que en los animales con diabetes inducida por la ETZ el sistema antioxidante, tanto en el riñón como en otros órganos, se encuentra inhibido, mientras que el oxidante y el nitrante se encuentran elevados (Onozato y col., 2002; Mora y col., 2009; Raza y col., 2011; Benviranli y col., 2012).

El incremento del estado oxidativo en este modelo ha sido evidenciado por el aumento de la peroxidación lipídica y de las proteínas oxidadas totales en la corteza renal de las ratas luego de seis (6) semanas de inducción de la diabetes (Limaye y col., 2003), en concordancia con nuestros resultados, en donde se observa un aumento de ambos marcadores de daño oxidativo final en la corteza renal de las ratas después de cinco (5) semanas de la administración de la ETZ (figuras 35 y 36). Este perfil oxidativo ha sido asociado a la sobreexpresión de algunas de las subunidades de la NAD(P)H oxidasa, como la NOX-4, la p22phox y la p47phox tanto en el riñón de la rata con diabetes inducida por la ETZ (Etoh y col., 2003; Luo y col., 2011) como en las células renales sometidas a la HG (Xia y col., 2005). El tratamiento con el RT mostró que impide la instauración de ese

estado oxidativo, ya que revirtió los efectos oxidativos finales en la corteza inducidos por la hiperglicemia.

En cuanto al sistema antioxidante, se conoce que en la nefropatía diabética la actividad y la expresión de algunos de sus componentes enzimáticos se encuentran alteradas. Se ha observado una disminución de la actividad de la CAT en los riñones de las ratas con diabetes inducida por la ETZ (Kakkar y col., 1997; Limaye y col., 2003; Luo y col., 2011; Sadi y col., 2012). Asimismo, la expresión de esta enzima se ha visto disminuida, tanto en pacientes con nefropatía diabética (Hodgkinson y col., 2003), como en el riñón de las ratas diabéticas (Limaye y col., 2003; Luo y col., 2011; Sadi y col., 2012). En este sentido nuestros resultados guardan consistencia con la literatura, al observarse una reducción de la actividad de la CAT en la corteza renal, tanto en el modelo de diabetes inducida por la ETZ, como en las células Vero sometidas a la HG (figuras 30 y 44).

En contraste, en la corteza renal de la rata con diabetes inducida por la ETZ, la actividad SOD y la GPx han mostrado diferencias entre los diferentes investigadores. Así, Limaye y col. (2003), han reportado incrementos de la actividad de la GPx, mientras que nuestros hallazgos junto con los reportados por Sadi (2012) y Luo y col. (2010) demuestran una importante disminución de la actividad de la GPx (figura 31), lo cual también concuerda con la disminución de esta actividad en el modelo de daño renal *in vitro* (figura 45). En cuanto a la expresión de esta enzima en el riñón, algunos autores la han encontrado aumentada (Limaye y col., 2003; Sadi y col., 2012), mientras que Luo y col. (2010)

han reportado una disminución de su ARNm. En el caso de la SOD los resultados han sido controversiales, la relación de la actividad y la expresión entre algunos investigadores ha señalado lo siguiente: permanecen sin cambios (Sadi y col., 2012), aumentadas (Kakkar y col., 1997; Limaye y col., 2003) o ambas disminuyen (Luo y col., 2010). En el presente estudio la actividad de la SOD total mostró ser susceptible a una inhibición de su actividad en las ratas con diabetes inducida por la ETZ, sin afectar la actividad de la Mn-SOD, por lo que esta respuesta refleja solamente la actividad de la CuZn-SOD. Este resultado es apoyado por el trabajo de Kakkar y col. (1997) en donde la actividad de la Mn-SOD no fue modificada por la hiperglicemia de ratas *Sprague-Dawley* con diabetes inducida por la ETZ. Esto podría estar relacionado con la expresión diferencial de estas isoformas en el tejido renal de las ratas diabética, donde ha sido descrito un aumento de la expresión de la Mn-SOD, sin alteración de la CuZn-SOD (Dobashi y col., 1991).

Estas variaciones entre la actividad y la expresión se corresponden con posibles cambios postraduccionales de estas enzimas antioxidantes, asociado al incremento renal de las EROs y las ERNs, lo cual está bien establecido en la literatura. El $O_2^{\cdot-}$ es capaz de inactivar a la CAT y a la GPx (Blum y Fridovich, 1985; Rister y Baehner, 1976), el $ONOO^{\cdot}$ inactiva a la Mn-SOD por nitración de tirosinas (Xu y col., 2006; Filipovic y col., 2007; Sumerli y col., 2010) y a la GPX (Padmaja y col., 1998), el ON induce inactivación de la CAT por formación de un complejo CAT-nitrosilo (Kim y col., 2000; Brunelli, 2002). Con respecto a la GR, la cual no ha sido tan estudiada en la diabetes en comparación con las demás

enzimas antioxidantes, también existen resultados contradictorios sobre la actividad en el riñón de ratas con diabetes inducida por la ETZ, encontrándose sin alteración o disminuida, tal como en nuestro caso, que la actividad de esta enzima mostró una significativa disminución (Li y col., 2007; Erejuwa y col., 2011) (figuras 32 y 46).

Una 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 los cambios de las actividades de estas enzimas inducidos por la glucosa, tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que contribuye la disminución del estrés oxidativo por esta vía, así como ha sido descrito para otros extractos ricos en polifenoles, tales 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) en ratas con diabetes inducida por la ETZ.

La relación entre las especies reactivas es muy compleja. La tasa $\text{NO}^\cdot/\text{O}_2^\cdot$ es decisiva para que ocurran algunos procesos celulares, tales como la proliferación y la apoptosis, siendo uno de los principales atrapadores del O_2^\cdot precisamente el ON. De manera que el incremento o la ausencia de alguna de estas especies determinará el tipo de estrés predominante en la célula y por ende esto podría interferir en los mecanismos antioxidantes de algunas moléculas medicinales

(Wink y Mitchel, 1998; Quijano y col., 2005; Frein y col., 2005; Ullrich y Kissner, 2006; Pacher y col., 2007; Leon y col., 2008; Podeo, 2009; Zielonka y col., 2010).

El papel del ON en la apoptosis es polémico. Por un lado, existe evidencia de que es capaz de inducir la proliferación celular y reprimir la muerte celular a través de la inhibición de las caspasas, el aumento de la Bcl-2, de la señalización de la PI3K/Akt, entre otras, y por el otro lado, que es capaz de inducir la apoptosis a través de la ruta intrínseca mitocondrial y de la extrínseca, produciendo: la liberación de citocromo C y de la endonucleasa G, la activación de caspasas, de la Bcl-2 y de las p38MAPK, entre otras (Genaro y col., 1995; Messmer y Brune, 1996; Nishikawa y col., 1998; Janssen y col., 1998; Ushmorov y col., 1999; Kim y col., 2000; Kim y col., 2001; Cobbs y col., 2001; Choi y col., 2002; Huerta-Yepey y col., 2004; Bonavida y col., 2006; Tarr y col., 2006; Carreras y Podeo, 2007; Azad y col., 2010).

Se ha reportado que el donador de ON, el NPS, es inductor de la apoptosis en las células de epitelio renal, de manera dependiente de la concentración y a través de la activación de la caspasa 8 (Du y col., 2006). Apoyando los resultados de Muhl y col. (1996) en donde se puso en evidencia que varios donadores de ON inducen apoptosis en diferentes tipos de células glomerulares, tales como: las endoteliales, las epiteliales y las mesangiales. Tiwari y col. (2006) demostraron que tanto el NPS como la inducción de la iNOS causaban la apoptosis de las células epiteliales del túbulo proximal en cultivo. Estos resultados aportan una valiosa información acerca del papel del ON en la fisiopatología renal y concuerdan con los obtenidos

en nuestro modelo experimental, en donde el NPS indujo un importante decremento de la viabilidad de las células Vero en cultivo, lo cual fue revertido por el tratamiento con el RT, sugiriendo así un efecto protector sobre el estrés nitrosativo (figura 42). En condiciones de HG, el NPS no modificó el efecto glucotóxico, pero sí disminuyó parcialmente la acción de RT sobre el daño inducido por la glucosa. Posiblemente, esto se deba a un aumento de la tasa NO/O_2^- sin alejarse de manera importante de la condición de estrés o más sencillamente, esté asociado a un aumento del atrapamiento del ON debido al incremento significativo de la actividad de la enzima CAT por acción del RT en las células Vero. Cabe destacar que esta enzima antioxidante es capaz de unirse al ON y formar un complejo nitrosil-catalasa (Brunelli, 2001) y también de atrapar catalíticamente al ONOO (Gebcka y Didik, 2009).

Por otra parte, hay que tomar en cuenta la posible presencia de algún componente atrapador de ON en el extracto, tal como está reportado para las partes aéreas de la planta (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011 b; Kensa y col., 2012). Recientemente uno de estos compuestos, un glucósido de la malvidina, mostró proteger de la apoptosis inducida por el ONOO \cdot a las células del endotelio vascular en cultivo (Paixao y col., 2012).

Estos resultados guardan relación a los obtenidos con el tratamiento con el L-NAME en este mismo modelo de glucotoxicidad (figura 41). Aquí se observa que a diferencia del efecto del aumento del estrés nitrosativo inducido por el NPS, la ausencia del ON favorece el efecto proliferativo del RT al mismo tiempo que

aumenta su efecto protector sobre la muerte celular inducida por la HG. A pesar de que el L-NAME *per se* mostró un leve efecto tóxico sobre las células renales en cultivo, éste fue capaz de revertir significativamente la glucotoxicidad. Es altamente conocido que la hiperglicemia induce la sobreexpresión de todas las isoformas de la NOS en el riñón de los animales de experimentación, lo que contribuye al daño renal (Choi y col., 1997; Shin y col., 2000; Komers y Anderson, 2003). Askwith y col. (2012) demostraron que la HG incrementa la expresión de la nNOS y de la iNOS en células nerviosas en cultivo. Es debido a todo esto, que la administración de inhibidores de las sintasas tales como el L-NAME, disminuyen: la hiperglicemia, la diuresis, la proteinuria, la hipertrofia y mejoran la función renal en general, de los animales diabéticos (Catanzaro y col., 1994; Costa y col., 1998; Ito y col., 2001; Levin-Iaina y col., 2011). Tomando todo en conjunto, se puede decir que el ON es un mediador importante de la muerte de las células Vero, de manera que su presencia disminuye y su ausencia incrementa los efectos de este extracto antioxidante.

El incremento del H₂O₂ ha sido asociado al daño renal en la diabetes, en modelos experimentales *in vitro*, esta especie reactiva ha inducido apoptosis en varios tipos de células renales, tales como los fibroblastos, la células mesangiales y del 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 H₂O₂ 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 H₂O₂ (figura 43). 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 H₂O₂ puede explicarse de dos maneras: 1). que el incremento basal de la actividad de la CAT inducida por el RT, aumente la degradación del H₂O₂, 2). el RT a través de su actividad atrapadora de O₂^{·-}, contribuya al aumento de la actividad de la CAT por disminución de su inhibición por el O₂^{·-}, de manera que se degrade más H₂O₂, y 3). que alguno de los componente químicos del RT presente actividad atrapadora del H₂O₂ tal como ha sido demostrado con las partes aéreas de la planta (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011 b; Kensa y col., 2012). Como era de esperarse, en condiciones de glucotoxicidad, el tratamiento con el H₂O₂ 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 vivo* como *in vitro*, 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-kB. Esto aporta por primera vez, información acerca de estos efectos farmacológicos de la especie *R. tiberosa* 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 inhibidor de la ECA, la actividad contráctil sobre la musculatura lisa del íleo de cobayo, la actividad colinérgica y la actividad estrogénica de *Ruellia praetermissa*. Scieinf.ex.Lindau (Salah y col., 2000; Salah y col., 2001; Salah y col., 2002). Este desconocimiento etnofarmacológico del género, hace aún más valioso a este trabajo y sienta las bases para el estudio fitoquímico y tecnológico de este potencial fitofármaco.

6. CONCLUSIONES

- 6.1. El RT contiene polifenoles y produjo una actividad antioxidante *in vitro*.
- 6.2. El RT produjo un efecto hipoglicemiante, antihiperglicemiante y disminuyo el daño renal en un modelo de diabetes tipo 11 en ratas.
- 6.3. El RT inhibe el daño oxidativo renal y revierte la inhibición de las enzimas del sistema antioxidante renal en un modelo de diabetes tipo 1 en ratas, así como también en células de epitelio renal cultivadas bajo un ambiente de alta concentración de glucosa.
- 6.4. El RT aumenta la proliferación celular y contrarresta la disminución de la proliferación y de la viabilidad celular inducida por la glucosa en células de epitelio renal en cultivo.
- 6.5. El RT disminuye el daño de las células de epitelio renal inducido por el estrés nitrosativo y oxidativo.
- 6.6. El ON y el H₂O₂ producen un efecto inhibitorio a la acción del RT sobre la viabilidad de las células de epitelio renal cultivadas bajo un ambiente de alta concentración de glucosa.
- 6.7. La expresión del NF-κB inducida por la PKC es inhibida por el RT en células HeLa, así como la activación de la PKC contrarresta la acción del RT sobre

la viabilidad de las células de Vero cultivadas bajo un ambiente de alta concentración de glucosa.

- 6.8. La actividad protectora del RT sobre el daño renal en la diabetes *in vivo* e *in vitro*, en parte es posiblemente mediada por la reducción del estado oxidante, el incremento del antioxidante y la inhibición de la señalización de la PKC-NF-kB.

En la figura 50 y 51 se resume los efectos del RT sobre las células renales en nuestros modelos experimentales de daño renal en la diabetes.

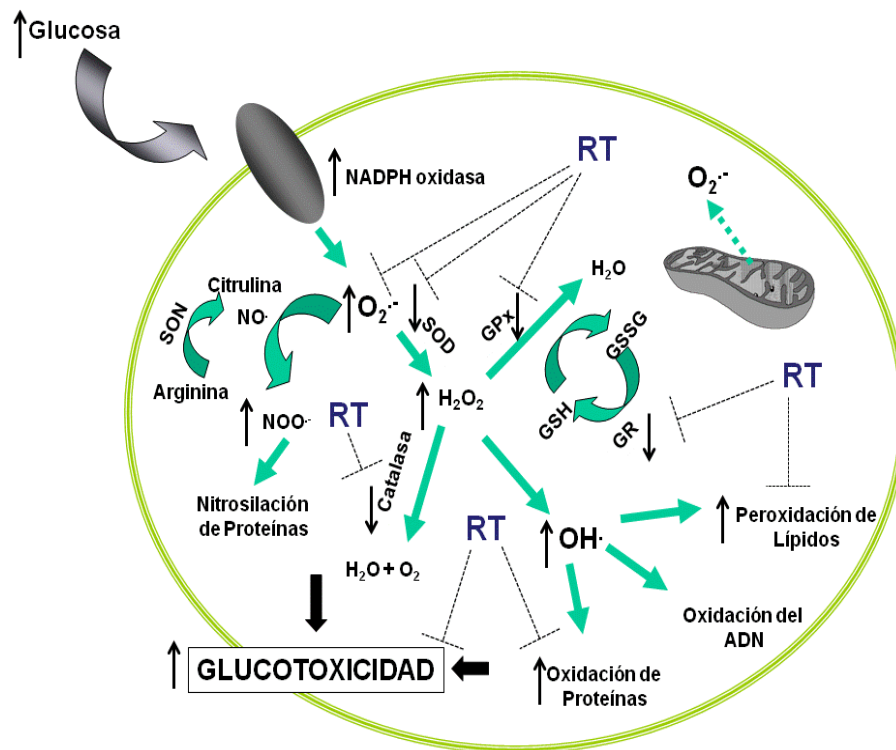


Figura 50. Papel del estrés oxidativo y nitrosativo en el efecto protector el extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el daño renal en la diabetes. Las líneas discontinuas indican disminución o bloqueo.

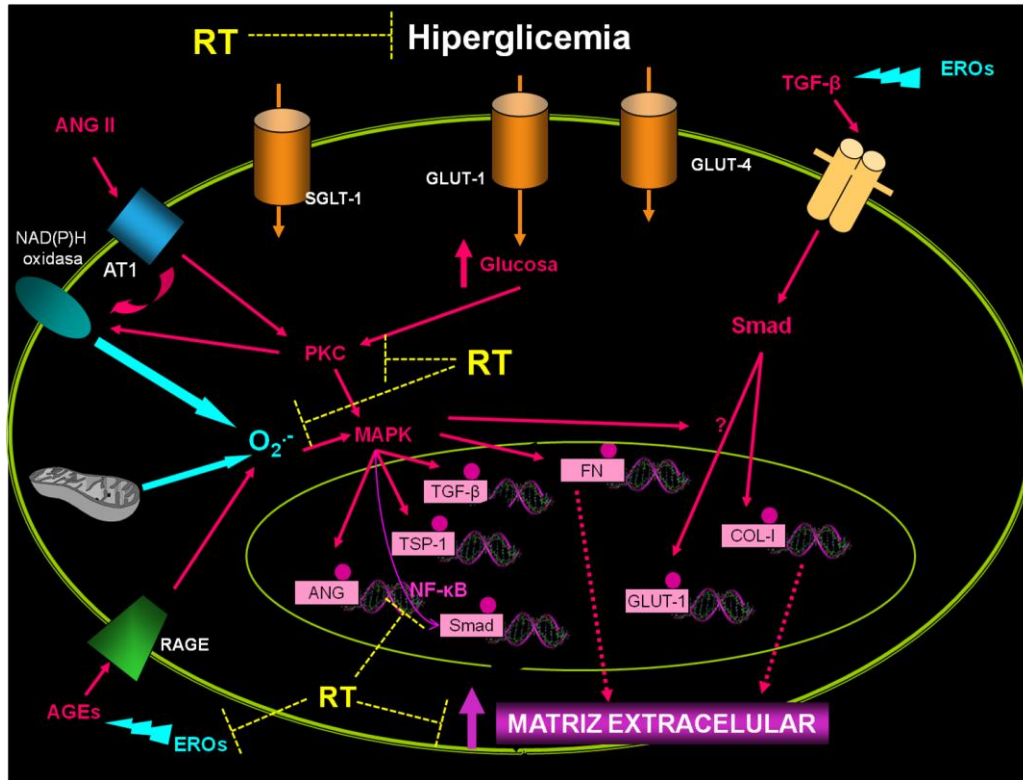


Figura 51. Mecanismo propuesto del efecto protector el extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el daño renal en la diabetes. Las líneas discontinuas indican disminución o bloqueo.

7. Referencias Bibliográficas

Aebi H. 1982. Catalase, in *Methods of Enzymatic Analysis* (vol III), 3 ed., Weinheim, Verlag Chemie. pp. 273-286.

Allen D, Harwood S, Varagunam M, Raftery M, Yaqoob M. 2003. High glucose-induced oxidative stress causes apoptosis in proximal tubular epithelial cells and is mediated by multiple caspases *FASEB J.* 17:908-910.

Ambroz C, Clark AJ, Catt KJ. 1991. The mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1133:107-11.

American Diabetes Association . 2007a. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care.* 30(Suppl1):S4-S41.

American Diabetes Association. 2004. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care.* 27:S79-S83.

American Diabetes Association. 2007. Diagnosis and clasification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 30:S42-S47.

Andreatta–Van Leyen S, Romero M, Khosla M, Douglas J. 1993. Modulation of phospholipase A2 activity and sodium transport by angiotensin-(1-7). *Kidney Int.* 44:932-936.

Anjaneyulu M, Chopra K. 2004. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 31(4):244-8.

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 A, Saraswathy M, Vijayalakshmi K. 2011. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using in-vitro model. *J Pharmacy Res.* 4(12):4344-4347.

Arirudran^b A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. 2011. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical. Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). *Pharmacognosy J.* 3(22):29-34.

Asaba K, Tojo A, Onozato ML, Goto A, Quinn MT, Fujita T, Wilcox CS. 2005. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 67(5):1890-1898.

Asghar M, Lokhandwala MF. 2004. Antioxidant supplementation normalizes elevated protein kinase C activity in the proximal tubules of old rats. *Exp Biol Med (Maywood).* 229(3):270-5.

Ashraful A, Subhan N, Sarder M, Nahar L, Sarker S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Ruellia*. *Pharmaceutic Biol* 47(3):209-214.

Askwith T, Zeng W, Eggo MC, Stevens MJ. 2012. Taurine reduces nitrosative stress and nitric oxide synthase expression in high glucose-exposed human Schwann cells. *Exp Neurol*. 233(1):154-62.

Avissar N, Ornt D, Yagil Y, Horowitz S, Watkins R, Kerl E, Takahashi K, Palmer I, Cohen H. 1994. Human kidney proximal tubules are the main source of plasma glutathione peroxidase. *Am J Physiol*. 266:C367-375.

Azad N, Iyer A, Vallyathan V, Wang L, Castranova V, Stehlik C, Rojanasakul Y. 2010. Role of oxidative/nitrosative stress-mediated Bcl-2 regulation in apoptosis and malignant transformation. *Ann N Y Acad Sci*. 1203:1-6.

Aziz N, Hassan Y. 2009. Pathogenesis of diabetic kidney disease: Review of cellular pects of renal lesions Mohanad Naji Sahib*, Shaymaa Abdalwahed Abdulameer, *African J Pharmacy Pharmacol*. 3(11): 507-514.

Bailey C, Day C. 1989. Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. *Diabetes Care* 12:553-64.

Balkau B, Deanfield J, Despres J, Bassand J, Fox K, Smith S Jr, Barter P, Tan C, Van Gaal L, Wittchen H, Massien C, Haffner S. 2007. International day for the evaluation of abdominal obesity (IDEA): a study of waist circumference, cardiovascular disease, and diabetes mellitus in 168,000 primary care patients in 63 countries. *Circulation*. 116:1942-1951.

Bansal P, Paul P, Mudgal J, G Nayak P, Thomas Pannakal S, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. *Exp Toxicol Pathol*. 64 (6): 651–658.

Basturk T, Altuntaş Y, Kurklu A, Aydin L, Eren N, Unsal A. 2006. Urinary N-acetyl B glucosaminidase as an earlier marker of diabetic nephropathy and influence of low-dose perindopril/indapamide combination. *Ren Fail*. 28:125-8.

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.

Baynes K. 2006. Introduction to Diabetes Mellitus. En *Traditional Herbal Medicine for Modern Times, Antidiabetic Plants*. CRC Press Taylor & Francis Group. United State of America. p. 2-99.

Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, Napodano P, Paparella M, D'Amico G. 2002. Urinary N-acetyl-b-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*. 17:1890–1896.

Behari M, Goyal M y Streibl M. 1981. Natural Products From *Ruellia tuberosa* L. *J Indian Chem Soc*. LVIII:176-177.

- Belsky YP, Ivanova AN, Danilets MG, Belska NV, Ligatcheva AA, Uchasova EG, Reikhart DV. 2011. Study of anti-inflammatory action of aurothiomalate, an inhibitor of NF- κ B. *Bull Exp Biol Med.* 151(2):190-3.
- Belviranlı M, Gökbel H, Okudan N, Büyükbaş S. 2012. Oxidative stress and anti-oxidant status in diabetic rat liver: Effect of plant polyphenols. *Arch Physiol Biochem.* 1:32-45.
- Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 65:1865-1874.
- Bielski, B.H.J., Shlue, G.G. and Bajuk, S. 1980. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO_2^- and O_2^- radicals, *J. Phys. Chem.*, 84, 830-833.
- Bloomgarden Z. 2004. Diabetes complications. *Diabetes Care.* 27:1506-1514.
- Blum J, Fridovich I. 1985. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys.* 240(2):500-8.
- Bohlender J, Franke S, Stein G, Wolf G. 2005. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physio.* 289:F645–F659.
- Boyle P. 2007. Diabetes Mellitus and Macrovascular Disease: Mechanism and Mediators. *American J Med.* 120:S12-S17.
- Bredt D, Snyder S. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:682-685.
- Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S; 2001. RENAAL Study Investigators. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 20;345:861-9.
- 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.
- Brunelli L, Yermilov V, Beckman JS. 2001. Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 30(7):709-14.
- Buege J, Aust S. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-10.
- Carey R, Siragy H. 2003b. The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Trends Endocrinol Metab.* 14:274–281.
- Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem.* 250:5475-5480.

- Carven P, Melhem M, Phillips S, De Rubertis F. 2001a. Overexpression of Cu²⁺ /Zn²⁺ superoxide dismutase protects against early diabetic glomerular injury in transgenic mice. *Diabetes*. 50:2114–2125.
- Catanzaro OL, Marina-Prendes MG, Hope SI, Zuccollo A, Dominguez A. 1994. Streptozotocin-induced hyperglycemia is decreased by nitric oxide inhibition. *Braz J Med Biol Res*. 27(8):2043-7.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Varela M, López-Gramcko JT, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Israel A. 2007. Propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Acta Científica Venezolana*. 58(Sup. 1):252.
- Cobbs C, Samanta M, Harkins L, Gillespie G, Merrick B, MacMillan-Crow L. 2001. Evidence for peroxynitrite-mediated modifications to p53 in human gliomas: possible functional consequences. *Arch Biochem Biophys*. 394:167–172.
- Correa-Rotter R, Hostetter T, Rosenberg M. 1992. Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int*. 41:796–804.
- Costa MA, Balaszczuk AM, Domínguez A, Catanzaro O, Arranz C. 1998. Effects of L-NAME and L-Arg on arterial blood pressure in normotensive and hypertensive streptozotocin diabetic rats. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam*. 48(2):59-63.
- Craven P, Davidson C, DeRubertis F. 1990. Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes* 39:667–674.
- Craven P, DeRubertis F, Kagan V, Melhem M, Studer R. 1997. Effect of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF- β and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 8:1405–1411.
- Craven P, DeRubertis F. 1989. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest* 83:1667–1675.
- 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.
- Chan CH, Ngoh GC, Yusoff R. 2012. A brief review on anti diabetic plants: Global distribution, active ingredients, extraction techniques and acting mechanisms. *Pharmacogn Rev*. 6(11):22-8.
- Chen F-A, Wu A-B, Shieh P, Kuo D-H, Hsieh C-Y. 2006. Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa*. *Food Chemistry* 94, 14-18.
- 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.

- Chiu J, Khan ZA, Farhangkhoei H, Chakrabarti S. 2009. Curcumin prevents diabetes-associated abnormalities in the kidneys by inhibiting p300 and nuclear factor-kappaB. *Nutrition*. 25(9):964-72.
- Choi BM, Pae HO, Jang SI, Kim YM, Chung HT. 2002. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol*. 35:116-26.
- Choi KC, Kim NH, An MR, Kang DG, Kim SW, Lee J. 1997. Alterations of intrarenal renin-angiotensin and nitric oxide systems in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 52(Suppl 60): S23–S27.
- Chothani D, Patel M, Mishra S. 2010. Hypoglycemic activity of ruellia tuberosa on nicotinamide-streptozotocin induced type-ii diabetic rats. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology*. <http://www.inventi.in/Article/ep/124/10.aspx>.
- Chothani D, Patel M, Mishra S. 2011. phytochemical screening and physicochemical evaluation on various parts of ruellia tuberosa linn. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology*. <http://www.inventi.in/Article/ep/228/10.aspx>.
- Chothani D, Patel M, Mishra S. 2012. HPTLC Fingerprint Profile and Isolation of Marker Compound of Ruellia tuberosa. *Chromatography Res Inter*. 2012:1-6.
- Chothani D, Patel M, Vaghasiya H, Mishra S. 2010. Review on Ruellia tuberosa (cracker plant). *Pharmacognosy J*. 2(12):506–512.
- Chuang L, Guh J, Wang K, Huang Y, Huang J. 2006. Role of nitric oxide in high glucose-induced mitogenic response in renal fibroblasts. *Molecular Endocrinology*. 20:2548–2558.
- Chung S, Ho EC, Lam KS, Chung SK. 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*. 14:S233-S236.
- 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.
- de Haan JB, Stefanovic N, Nikolic-Paterson D, Scurr LL, Croft KD, Mori TA, Hertzog P, Kola I, Atkins RC, Tesch GH. 2005. Kidney expression of glutathione peroxidase-1 is not protective against streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 289(3):F544-51.
- De Pesce M, Strande D. 1973. A New micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem*. 19:1265-1267.
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J*. 15;324 (Pt 1):1-18.
- 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.

Deuschländer MS, van de Venter M, Roux S, Louw J, Lall N. 2009. Hypoglycaemic activity of four plant extracts traditionally used in South Africa for diabetes. *J Ethnopharmacol.* 124(3):619-24.

Dobashi K, Asayama K, Hayashibe H, Uchida N, Kobayashi M, Kawaoi A, Kato K. 1991. Effect of diabetes mellitus induced by streptozotocin on renal superoxide dismutases in the rat. A radioimmunoassay and immunohistochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 60(1):67-72.

Dodge J, Mitchell C, Hanahan D. 1963. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys.* 100:119-130.

Dröge W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1):47-95.

Du C, Guan Q, Diao H, Yin Z, Jevnikar AM. 2006. Nitric oxide induces apoptosis in renal tubular epithelial cells through activation of caspase-8. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290(5):F1044-54.

Ebenezer PJ, Mariappan N, Elks CM, Haque M, Francis J. 2009. Diet-induced renal changes in Zucker rats are ameliorated by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL. *Obesity (Silver Spring).* 17(11):1994-2002.

Eidi A, Eidi M, Esmaeili E. 2006. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L.) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine.* 13(9-10):624-9.

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.

Erejuwa OO, Sulaiman SA, Wahab MS, Sirajudeen KN, Salleh MS, Gurtu S. 2011. Differential responses to blood pressure and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic wistar-kyoto rats and spontaneously hypertensive rats: effects of antioxidant (honey) treatment. *Int J Mol Sci.* 12(3):1888-907.

Erusalimsky JD, Moncada S. 2007. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:2524-31.

Esmaeili MA, Zohari F, Sadeghi H. 2009. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucrium polium* on beta-cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes. *Planta Med.* 75(13):1418-20.

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. *Diabetologia.* 46:1428-1437.

Evan AP, Mong SA, Gattone VH, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC. 1984. The effect of streptozotocin and streptozotocin-induced diabetes on the kidney. *Ren Physiol.* 7(2):78-89.

- Feest T. 2007. Epidemiology and Causes Chronic Renal Failure. *Medicine*. 35:438-441.
- Filipović MR, Stanić D, Raicević S, Spasić M, Niketić V. 2007. Consequences of MnSOD interactions with nitric oxide: nitric oxide dismutation and the generation of peroxynitrite and hydrogen peroxide. *Free Radic Res*. 41(1):62-72.
- Finocchietto PV, Franco MC, Holod S, Gonzalez 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
- Forbes J, Cooper M, Oldfield M, Thomas M. 2003. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 14:S254–S258.
- Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. 2008. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes*. 57(6):1446-54.
- Frein D, Schildknecht S, Bachschmid M, Ullrich V. 2005. Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem Pharmacol*. 70:811-23.
- Frein D, Schildknecht S, Bachschmid M, Ullrich V. 2005. Redox regulation: a new challenge for pharmacology. *Biochem Pharmacol*. 70:811-23.
- Fujii H, Kono K, Nakai K, Goto S, Komaba H, Hamada Y, Shinohara M, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M. 2010. Oxidative and nitrosative stress and progression of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. *Am J Nephrol*. 31(4):342-52.
- Fujii H, Yokozawa T, Kim YA, Tohda C, Nonaka G. 2006. Protective effect of grape seed polyphenols against high glucose-induced oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem*. 70(9):2104-11.
- Gebicka L, Didik J. 2009. Catalytic scavenging of peroxynitrite by catalase. *J Inorg Biochem*. 103(10):1375-9.
- Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martínez C, Boscá L. 1995. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest*. 95:1884-90.
- 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.
- Gilbert R, Connelly K, Kelly D, Pollock C, Krum H. 2006. Heart failure and nephropathy: Catastrophic and interrelated complications of diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 1:193-208.
- 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.

- Gnudi L, Thomas S, Viberti G. 2007. Mechanical forces in diabetic kidney disease: a trigger for impaired glucose metabolism. *J Am Soc Nephrol.* 18:2226-2232.
- 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.
- Grace MH, Ribnicky DM, Kuhn P, Poulev A, Logendra S, Yousef GG, Raskin I, Lila MA. 2009. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine.* 16(5):406-15.
- Grobe J, Der Sarkissian S, Stewart J, Meszaros J, Raizada M, Katovich M. 2007b. ACE2 overexpression inhibits hypoxia-induced collagen production by cardiac fibroblasts. *Clin Sci (Lond).* 113:357-64.
- Guerrero J, Hersch P, Pedraza J, Navarrete A y Mata R. 2009. Antihyperglycemic Effect of Constituents from *Hintonia standleyana* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Planta Med.* 71:1-7.
- Gurley S y Coffman T. 2007. The Renin-angiotensin system and diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 27:144-52.
- HA H, Lee H. 2003. Reactive oxygen species and matrix remodeling in diabetic kidney. *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.
- Habib S, Ali A. 2011. Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem.* 26:3-17.
- Han X, Shen T, Lou H. 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int. J. Mol. Sci.* 8:950-988.
- Han DC, Isono M, Hoffman BB, Ziyadeh FN. 1999. High glucose stimulates proliferation and collagen type I synthesis in renal cortical fibroblasts: mediation by autocrine activation of TGF-beta. *J Am Soc Nephrol.* 10(9):1891-9.
- Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. 1997. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes.* 46:847-53.

Haneda M, Koya D, Kikkawa R. 2001. Cellular mechanisms in the development and progression of diabetic nephropathy: activation of the DAG-PKC-ERK pathway. *Am J Kidney Dis.* 38S178-181.

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 angiotensinII-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol.* 11:1387–1397.

Harrington JT, Cohen JJ. 1973. Clinical disorders of urine concentration and dilution. *Arch Intern Med.* 131(6):810-25.

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.

Hsieh T, Fustier P, Zhang S, Filep J, Tang S, Ingelfinger J, Fantus I, Hamet P, Chan JS. 2003. High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology.* 144:4338–4349.

Huang GJ, Huang SS, Deng JS. 2012. Anti-inflammatory activities of inotilone from *Phellinus linteus* through the inhibition of MMP-9, NF-κB, and MAPK activation in vitro and in vivo. *PLoS One.* (5):e35922.

Huerta-Yepe S, Vega M, Jazirehi A, Garban H, Hongo F, Cheng G, Bonavida B. 2004. Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of Bcl-xl expression. *Oncogene.* 23:4993-5003.

Hung HY, Qian K, Morris-Natschke SL, Hsu CS, Lee KH. 2012. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Nat Prod Rep.* 29(5):580-606.

Idris I, Gray S, Donnelly R. 2001. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia.* 44:659–673.

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.

Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H. 2000. High glucose level and free fatty acid

stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*. 49(11):1939-45.

Iqbal J y Whitney P. 1991. Use of Cyanide and Diethyldithiocarbamate in the assay of superoxide dismutases. *Free Radic Biol Med*. 10:69-77.

Irwin S. 1962. Drug screening and evaluative procedures. *Science*. 136:123-128.

ISO 14502-1: 2005. Determination of substances characteristic of green and black tea. Part 1: Content of total polyphenols in tea. Colorimetric method using Folin-Ciocalteu reagent.

Ito A, Uriu K, Inada Y, Qie YL, Takagi I, Ikeda M, Hashimoto O, Suzuka K, Eto S, Tanaka Y, Kaizu K. 2001. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase ameliorates renal hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetic rat. *J Lab Clin Med*. 138(3):177-85.

Jackson TR, Hanley MR. 1989. Tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate inhibits mas/angiotensin receptor-stimulated inositol phosphate production and intracellular Ca²⁺ elevation in the 401L-C3 neuronal cell line. *FEBS Lett*. 251:27-30.

Jaimes E, Galceran J, Raij L. 1998. Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells. *Kidney Int*. 54:775-784.

Jaiswal N, Jaiswal R, Tallant E, Diz D, Ferrario C. 1993a. Alterations in prostaglandin production in spontaneously hypertensive rat smooth muscle cells. *Hypertension*. 21:900-905.

Janssen Y, Soultanakis R, Steece K, Heerdt E, Singh R, Joseph J, Kalyanaraman B. 1998. Depletion of nitric oxide causes cell cycle alterations, apoptosis, and oxidative stress in pulmonary cells. *Am J Physiol*. 275:L1100-L1109.

Jensen PK, Christiansen JS, Steven K, Parving HH. 1981. Renal function in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*. 21(4):409-14.

Jim B, Santos J, Spath F, Cijiang He J. 2012. Biomarkers of diabetic nephropathy, the present and the future. *Curr Diabetes Rev*. 1;8(5):317-28.

Jung K, Priem F, Klotzek S, Becker S, Henke W. 1991. Methods compared for determining activity of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine without pretreatment of sample: different sensitivity and species effect. *Enzyme*. 45:215-21.

Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK. 2006. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem*. 13(10):1203-18.

Kamalakkannan N, Stanely P. 2006. The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *J Pharm Pharmacol*. 58:1091-1098.

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^a M, Neelamegam A. 2012. 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^b M, Neelamegam R. 2012. Analysis of antioxidants in *ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Archives.* 12(1): 125-128.
- Keynan S, Hirshberg B, Levin N, Wexler I, Dahan R, Reinhartz E, Ovadia H, Wollman, Chernihovskoy T, Iaina A, Raz I. 2000. Renal nitric oxide production during the early phase of experimental diabetes mellitus. *Kidney International.* 58:740–747.
- Khamaisi M, Keynan S, Bursztyn M, Dahan R, Ovadia H, Raz I. 2006. Role of Renal Nitric Oxide Synthase in Diabetic Kidney Disease during the Chronic Phase of Diabetes. *Nephron Physiol.* 102:72–80.
- Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M, Pillai KK A. 2012. Pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(1):27-42.
- Khera T, Martin J, Riley S, Steadman R, Phillips AO. 2006. Glucose enhances mesangial cell apoptosis. *Lab Invest.* 86(6):566-77.
- Kikkawa R, Umemura K, Haneda M, Arimura T, Ebata K, Shigeta Y 1987 Evidence for existence of polyol pathway in cultured rat mesangial cells. *Diabetes* 36:240–243.
- Kim HY, Oi Y, Kim M, Yokozawa T. 2008. Protective effect of lipoic acid against methylglyoxal-induced oxidative stress in LLC-PK(1) cells. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2008 Feb;54(1):99-104.
- 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.
- Kim PK, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR. 2001. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol.* 1:1421-41.
- Kim Y, Chung M, Simmons H, Billiar T. 2000. Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J Biol Chem.* 275:10954-10961.
- Kim YJ, Kim YA, Yokozawa T. 2010. Attenuation of oxidative stress and inflammation by gravinol in high glucose-exposed renal tubular epithelial cells. *Toxicology.* 270(2-3):106-11.
- Kim YS, Han S. 2000. Superoxide reactivates nitric oxide-inhibited catalase. *Biol Chem.* 381(12):1269-71.

Kobayashi M, Sugiyama H, Wang DH. 2005. Catalase deficiency renders remnant kidneys more susceptible to oxidant tissue injury and renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 68:1018–1031.

Kobori H, Nangaku M, Navar L, Nishiyama A. 2007. The intrarenal renin-angiotensin system: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 59:251-87.

Kohzuki M, Yasujima M, Kanazawa M, Yoshida K, Fu LP, Obara K, Saito T, Abe K. 1995. Antihypertensive and renal-protective effects of losartan in streptozotocin diabetic rats. *J Hypertens.* 13(1):97-103.

Komers R, Anderson S. 2003. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 284(6):F1121-37.

Konoshita T, Wakahara S, Mizuno S, Motomura M, Aoyama C, Makino Y, Kawai Y, Kato N, Koni I, Miyamori I, Mabuchi H. 2006. Tissue gene expression of renin-angiotensin system in human type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Care.* 29:848-52.

Koya D, Haneda M, Nakagawa H, Isshiki K, Sato H, Maeda S, Sugimoto T, Yasuda H, Kashiwagi A, Ways DK, King GL, Kikkawa R. 2000. Amelioration of accelerated diabetic mesangial expansion by treatment with a PKC inhibitor in diabetic db/db mice, a rodent model for type 2 diabetes. *FASEB J.* 14:439–447.

Koya D, Jirousek M, Lin Y, Ishii H, Kuboki K, King G. 1997. Characterization of protein kinase C isoform activation on the gene expression of transforming growth factor- α , extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 100:115–126.

Kuhad A, Chopra K. 2009. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NF κ B signaling pathway. *Life Sci.* 84(9-10):296-301.

Kumarappan CT, Mandal SC. 2008. Polyphenolic extract of *Ichnocarpus frutescens* attenuates diabetic complications in streptozotocin-treated diabetic rats. *Ren Fail.* 30(3):307-22.

Kwan J, Wang H, Munk S, Xia L, Globerg H, Whiteside C. 2005. In high glucose protein kinase C- α activation is required for mesangial cell generation of reactive oxygen species. *Kidney Int.* 68:2526–2541.

Laboratorios Vita Plant. <http://www.vitaplant.com/producto.php?Palo-de-Arco-Frasco/-/45-cap.&cod=57&opc=19&ruta=>. 20/07/2012.

Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.

Lane P, Steffes M, Fioretto P, Mauer S. 1993. Renal interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int.* 43:661–667.

- 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.
- 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.
- Levin-Iaina N, Iaina A, Raz I. 2011. The emerging role of NO and IGF-1 in early renal hypertrophy in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes Metab Res Rev.* 27(3):235-43
- 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-delta promotes renal tubular cell apoptosis associated with proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 21(7):1115-24.
- Li XM. 2007. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. *Int J Biol Macromol.* 10;40(5):461-5.
- Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. 2003. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 243(1-2):147-52.
- Litchfield J T& Wilcoxon F A. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96:99-113.
- 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 Y. 2004. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol.* 15: 1–12.
- Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. 2003. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 18(7):1272-80.

- Long R. 1976. Biosystematics of *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae). *Am J Botany*. 63(7):951-959.
- Lowry, O, Rosebrough N, Farr A, aroserough A, Farr L, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin-.phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lu Q, Yin XX, Wang JY, Gao YY, Pan YM. 2007. Effects of *Ginkgo biloba* on prevention of development of experimental diabetic nephropathy in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 28(6):818-28.
- Luan J, Li W, Han J, Zhang W, Gong H, Ma R. 2012. Renal protection of in vivo administration of tempol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Sci.* 119(2):167-76.
- Luo ZF, Qi W, Feng B, Mu J, Zeng W, Guo YH, Pang Q, Ye ZL, Liu L, Yuan FH. 2011. Prevention of diabetic nephropathy in rats through enhanced renal antioxidative capacity by inhibition of the proteasome. *Life Sci.* 88(11-12):512-20.
- Manikandan^a A, Arokia V. 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 A, Arokia V. 2010. Effect of 50% hydroethanolic leaf extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) on AST, ALT, ACP and ALP levels in serum, liver and kidney of alloxan induced diabetic rats. *Annals Pharmacy Pharmaceutical Sci.* 1(2):142-146.
- Mariee AD, Abd-Allah GM, El-Yamany MF. 2009. Renal oxidative stress and nitric oxide production in streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats: the possible modulatory effects of garlic (*Allium sativum* L.). *Biotechnol Appl Biochem.* 52(Pt 3):227-32.
- Maritim A, Dene BA, Sanders RA, Watkins JB. 2003. Effects of pycnogenol treatment on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol.* 17(3):193-9.
- 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.
- Martin KA, Grant SG, Hockfield S. 1992. The mas proto-oncogene is developmentally regulated in the rat central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 68:75-82.
- Mason RM, Wahab NA. 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Am Soc Nephrol.* 14:1358-1373.
- McCarty MF. 1998. A central role for protein kinase C overactivity in diabetic glomerulosclerosis: implications for prevention with antioxidants, fish oil, and ACE inhibitors. *Med Hypotheses.* 50(2):155-65.

Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem.* 91:571–577.

Messmer UK, Brüne B. 1996. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J.* 319:299-305.

Mezzano S, Aros C, Droguett A, Burgos ME, Ardiles L, Flores C, Schneider H, Ruiz-Ortega M, Egido J. 2004. NF-kappaB activation and overexpression of regulated genes in human diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 19(10):2505-12.

Ministerio del Poder Popular para la Salud, Gobierno Bolivariano de Venezuela. Epidemiología, Anuarios de Mortalidad (1995-2005). www.mpps.gob.ve/ms/direcciones_msds/Epidemiologia/Estadistica/Archivos/Anuarios.htm. 10/11/2007.

Ministerio para el Poder Popular para la Salud. MPPS. 2012. http://www.mpps.gob.ve/index.php?option=com_content&view=article&id=428&Itemid=690&showall=1 15/07/2012.

Misra T, Singh R, Pandey R, Pandey R y Singh B. 1997. Two New Aliphatic Compounds from *Ruellia tuberosa* Linn. *Indian J Chem.* 36B:1194-1197.

Miyazato J, Horio T, Takiuchi S, Kamide K, Sasaki O, Nakamura S, Nakahama H, Inenaga T, Takishita S, Kawano Y. Miyazato J, Horio T, Takiuchi S, Kamide K, Sasaki O, Nakamura S, Nakahama H, Inenaga T, Takishita S, Kawano Y. 2005. Left ventricular diastolic dysfunction in patients with chronic renal failure: Impact of diabetes mellitus. *Diabet Med.* 22:730-736.

Mong MC, Yin MC. 2012. Nuclear factor κ B-dependent anti-inflammatory effects of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine in kidney of diabetic mice. *J Agric Food Chem.* 60(12):3158-65.

Mora A, Aragón D, Ospina L. 2009. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. *Vitae Rev Fac Quim Far.* 16(3):2145-2660.

Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65:55-63.

Mühl H, Sandau K, Brüne B, Briner VA, Pfeilschifter J. 1996. Nitric oxide donors induce apoptosis in glomerular mesangial cells, epithelial cells and endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 317(1):137-49.

Narayanan S, Appleton HD. 1980. Creatinine: a review. *Clin Chem* 26:1119-1126.

Nayak B, Xie P, Akagi S, Yang Q, Sun L, Wada J, Thakur A, Danesh FR, Chugh SS, Kanwar Y. 2005. Modulation of renal-specific oxidoreductase/myo-inositol oxygenase by high-glucose ambience. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:17952-17957.

Nerlich A, Schleichert E. 1991. Immunohistochemical Localization of Extracellular Matrix Components in Human Diabetic Glomerular Lesions. *American J Pathol.* 139:889-899.

Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* ;66(7):1022-37.

Newman DJ, Cragg GM. 2012. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 23;75(3):311-35.

Nishikawa M, Takeda K, Sato EF, Kuroki T, Inoue M. 1998. Nitric oxide regulates energy metabolism and Bcl-2 expression in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol.* 274:G797–801.

Oberley L y 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.

Oldfield M, Bach L, Forbes J, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, Atkins R, Osicka T, Jerums G, Cooper M. 2001. Advanced glycation end products cause epithelialmyofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest.* 108:1853–1863.

Onozato ML, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox CS. 2002. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effects of ACEI and ARB. *Kidney Int.* 61(1):186-94.

Oudit G, Herzenberg A, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R, Crackower M, Park S, Choi H, Lee J, Woo C, Kim J, and Han H. 2001. High glucose inhibits renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC oxidative stress, and TGF- α 1. *Kidney Int.* 59:1695–1705.

Owen PL, Johns T. 1999. Xanthine oxidase inhibitory activity of northeastern North American plant remedies used for gout. *J Ethnopharmacol.* 64(2):149-60.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87:315-424.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. 2007. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 87:315-424.

Padmaja S, Squadrito GL, Pryor WA. 1998. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys.* 1998 Jan 1;349(1):1-6.

Paixão J, Dinis TC, Almeida LM. 2012. Protective role of malvidin-3-glucoside on peroxynitrite-induced damage in endothelial cells by counteracting reactive species formation and apoptotic mitochondrial pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2012:428538.

Panda S, Kar A. 2007. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. *J Pharm Pharmacol.* 59(11):1543-8.

Park KA, Byun HS, Won M, Yang KJ, Shin S, Piao L, Kim JM, Yoon WH, Junn E, Park J, Seok JH, Hur GM. 2007. Sustained activation of protein kinase C downregulates nuclear factor-kappaB signaling by dissociation of IKK-gamma and Hsp90 complex in human colonic epithelial cells. *Carcinogenesis*. 28(1):71-80.

Parker P, Murray-Rust J. 2004. PKC at a glance. *J Cell Sci*. 117: 131–132.

Parving HH, Lehnert H, Bröchner-Mortensen J, Gomis R, Andersen S, Arner P. 2001. Irbesartan in Patients with Type 2 Diabetes and Microalbuminuria Study Group. The effect of irbesartan on the development of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 345(12):870-8.

Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López J, Orsini G, Israel A. 2012. Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Far UCV*. 75(2):1-16.

Patel MB, Mishra SH. 2011. Hypoglycemic activity of C-glycosyl flavonoid from *Enicostemma hyssopifolium*. *Pharm Biol*. 49(4):383-91.

Patel S, Santani D. 2009. Role of NF-kappa B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications. *Pharmacol Rep*. 61(4):595-603.

Patel^a DK, Kumar R, Laloo D, Hemalatha S. 2012. Diabetes mellitus: An overview on its pharmacological aspects and reported medicinal plants having antidiabetic activity. *Asian Pacific J Trop Biomed*. 411-420.

Patel^b 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.

Pesce MA, Strande CS. 1973. A new micromethod for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem*. 19(11):1265-7.

Phakeovilay C, Disadee W, Sahakitpichan P, Sitthimonchai S, Kittakoop P, Ruchirawat S, Kanchanapoom T. J. 2012. Phenylethanoid and flavone glycosides from *Ruellia tuberosa* L. *Nat Med*. 2012/25. DOI 10.1007/s11418-012-0658-7.

Poderoso JJ. 2009. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 484:214-20.

Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R. 2007. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. *J Am Soc Nephrol*. 18:2945-2952.

Prabhu K, Arner R, Vunta H, Reddy C. 2005. Up-regulation of human myo-inositol oxygenase by hyperosmotic stress in renal proximal tubular epithelial cells. *J Biol Chem*. 280:19895-19901.

Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A. 2003. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes*. 52(11):2795-804.

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 Radic Biol Med.* 39:728-41.

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 Radic Biol Med.* 39:728-41.

Radha M, Yeggnisetty R, Swapna R, Pradeepkiran J, Ismail S, Madhuri E. 2012. Protective role of ethanolic extract of *aloe vera* antioxidant properties on liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Digest J Nanomaterials Biostructures.* 7(1):175 - 184

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.

Ragolia L, Palaia T, Paric E, Maesaka JK. 2003. Elevated L-PGDS activity contributes to PMA-induced apoptosis concomitant with downregulation of PI3-K. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284(1):C119-26.

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.

Raza H, Prabu SK, John A, Avadhani NG. 2011. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Mol Sci.*12(5):3133-47.

Reyes A, Karl I, Kissane J, Klahr S. 1993. L-Arginine administration prevents glomerular hyperfiltration and decreases proteinuria in diabetic rats. *J Am Soc Nephrol.* 4:1039–1045.

Reznick AZ, Packer L. 1994. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 233:357-63.

Rister M, Baehner RL. 1976. The alteration of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and NAD(P)H cytochrome c reductase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages during hyperoxia. *J Clin Invest.* 58(5):1174-84.

Ross D, Cotgreave I, Moldéus. 1985. P.The interaction of reduced glutathione with active oxygen species generated by xanthine-oxidase-catalyzed metabolism of xanthine. *Biochim Biophys Acta.* 841(3):278-82.

Ross J, Goldman JK. 1971. Effect of streptozotocin-induced diabetes on kidney weight and compensatory hypertrophy in the rat. *Endocrinology.* 88(4):1079-82.

Russell-Jones D, Khan R. 2007. Insulin-associated weight gain in diabetes--causes, effects and coping strategies. *Diabetes Obes Metab.* 9(6):799-812.

Sadi G, Eryilmaz N, Tütüncüoğlu E, Cingir Ş, Güray T. 2012. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. *Diabetes Metab Res Rev.* 28(3):228-35.

Sahooa N, Manchikantia P, Hari S. 2011. Herbal drug patenting in India: IP potential. *J Ethnopharmacol.* 137:289– 297.

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 Ethnopharmacol.* 72(1-2):269-72.

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.

Samikkannu T, Thomas J, Bhat G, Wittman V, Thekkumkara T. 2006. Acute effect of high glucose on long-term cell growth: a role for transient glucose increase in proximal tubule cell injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 291:F162–F175.

Sampson E, Baird M, Burtis C, Smith E, Witte D, Bayse D. 1980. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clin Chem.* 26:816-826.

Sampson E, Baird M. 1979. Chemical inhibition used in a kinetic urease/ glutamate dehydrogenase method for urea in serum. *Clin Chem.* 25:1721-1729.

Sanai T, Sobka T, Johnson T, el-Essawy M, Muchaneta-Kubara EC, Ben Gharbia O, el Oldroyd S, Nahas AM. 2000. Expression of cytoskeletal proteins during the course of experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia.* 43:91-100.

Santangelo C, Vari R, Scazzocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. 2007. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita.* 43(4):394-405.

Sawiress F. 2011. Effect of Ginseng Extract Supplementation on Renal Functions in Diabetic Rats. *J Agricul Sci.* 3(2):17-31.

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.

Schiffer M, von Gersdorf G, Bitzer M, Susztak K, Bottinger E. 2000. Smad proteins and transforming growth factor- β -signaling. *Kidney Int.* 58:S45–S52.

Schleicher E, Weigert C. 2000. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 77:S13-18.

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.

- Schor N, Ichikawa I, Rennke H, Troy J, Brenner B. 1981. Pathophysiology of altered glomerular function in aminoglycoside-treated rats. *Kidney Int.* 19:288-96.
- Schrijvers B, De Vriese A, Flayvbjerg A. 2004. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: The role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocrine Reviews.* 25:971–1010.
- Seyer-Hansen K. 1976. Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 51(6):551-5.
- Shah S, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca V. 2007. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 18:16–28.
- Shin SJ, Lai FJ, Wen JD, Hsiao PJ, Hsieh MC, Tzeng TF, Chen HC, Guh JY, Tsai JH. 2000. Neuronal and endothelial nitric oxide synthase expression in outer medulla of streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Diabetologia* 43: 649–659.
- Simonson M. 2007. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic Nephropathy. *Kidney Int.* 71:846–854.
- Singh L, Cheng D, Kowluru R, Levi E, Jiang Y. 2007. Hexosamine induction of oxidative stress, hypertrophy and laminin expression in renal mesangial cells: effect of the anti-oxidant alpha-lipoic acid. *Cell Biochem Funct.* 25:537-50.
- Singh L, Green K, Alexander M, Bassly S, Crook E. 2004. Hexosamines and TGF-beta1 use similar signaling pathways to mediate matrix protein synthesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286:F409-416.
- Singh R, Pandey H, Pandey R y Singh B. 2002. A Triterpenoid from *Ruellia tuberosa* Linn. *Indian J Chem.* 41B:1754-1756.
- Skill N, Johnson T, Coutts I, Saint R, Fisher M, Huang L, Nahas A, Collighan R, Griffin M. 2004. Inhibition of Transglutaminase Activity Reduces Extracellular Matrix Accumulation Induced by High Glucose Levels in Proximal Tubular Epithelial Cells. *J Biol Chem.* 279:47754–47762.
- Soltész G, Patterson CC, Dahlquist G: EUROLAB study group. 2007. Worldwide childhood type 1 diabetes incidence what can we learn from epidemiology? *Pediatr Diabetes.* 8:6-14.
- 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.
- Stadtman ER. 2006. Protein oxidation and aging. *Free Radic Res.* 40(12):1250-8.
- Stanton RC. 2011. Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep.* 11(4):330-6.
- 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* 33: 1077–1081.

- Steffes MW, Bilous RW, Sutherland DER, Mauer SM. 1992. Cell and matrix components of the glomerular mesangium in type I diabetes mellitus. *Diabetes* 41:679–684.
- Studer RK, Craven PA, DeRubertis FR. 1997. Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Metabolism*. 46(8):918-25.
- Su HC, Hung LM, Chen JK. 2006. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 290(6):E1339-46.
- Surmeli NB, Litterman NK, Miller AF, Groves JT. 2010. Peroxynitrite Mediates Active Site Tyrosine Nitration in Manganese Superoxide Dismutase. Evidence of a Role for the Carbonate Radical Anion. *J Am Chem Soc*.
- Tahara E, Kadara H, Lacroix L, Lotan D, Lotan R. 2009. Activation of protein kinase C by phorbol 12-myristate 13-acetate suppresses the growth of lung cancer cells through KLF6 induction. *Cancer Biol Ther*. 2009 May;8(9):801-7.
- Taira M, Toba H, Murakami M, Iga I, Serizawa R, Murata S, Kobara M, Nakata T. 2008. Spironolactone exhibits direct renoprotective effects and inhibits renal renin-angiotensin-aldosterone system in diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 589(1-3):264-71.
- Tan Y, Wang B, Keum JS, Jaffa AA. 2005. Mechanisms through which bradykinin promotes glomerular injury in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 288(3):F483-92.
- Tang WH, Martin KA, Hwa J. 2012. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol*. 2012;3:87.
- Tarr JM, Eggleton P, Winyard PG. 2006. Nitric oxide and the regulation of apoptosis in tumour cells. *Curr Pharm Des*. 12:4445-68.
- Thamilselvan V, Menon M, Thamilselvan S. 2009. Oxalate-induced activation of PKC-alpha and -delta regulates NADPH oxidase-mediated oxidative injury in renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 297(5):F1399-410.
- Tiwari MM, Messer KJ, Mayeux PR. 2006. Inducible nitric oxide synthase and apoptosis in murine proximal tubule epithelial cells. *Toxicol Sci*. Jun;91(2):493-500.
- Toyoda M, Suzuki D, Honma M, Uehara G, Sakai T, Umezono T, Sakai H. 2004. High expression of PKC-MAPK pathway mRNAs correlates with glomerular lesions in human diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 66:1107-1114.
- Tsian E, Lekas P, Fantus G, 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.
- Ullaah S, Shahwar D, Ullah S, Ahmad M. 2012. Hypoglycemic Activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in Normal and Alloxan-Induced Diabetic Rabbits. *J Chem Soc Pak*. 34(2):436-441.

- Ullaha S, Ahmadb M, Ullaha S, Ahmada N, Akmal M. 2011. Hypoglycemic Activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in Normal and Alloxan-Induced Diabetic Rabbits. *IJPS Spring*. 7(2): 1107-115 108.
- Ullrich V, Kissner R. 2006. Redox signaling: bioinorganic chemistry at its best. *J Inorg Biochem*. 100:2079-86.
- Uma Makheswari M, Sudarsanam D. 2001. Phytomedicine for Diabetes mellitus: An overview. *Research in Pharmacy*. 1(4):28-37.
- Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, Droge W, Schirrmacher V, Umansky V. 1999. Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome c release. *Blood*. 93:2342–52.
- Varela M, Lopez-Gramcko J, Ciangherotti C, Orsini G, Israel A. 2007. Atrapamiento del radical superóxido por el extracto acuoso de *Ruellia tuberosa* L. (ACANTHACEAE). XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina. La Plata, Argentina.
- Verspohl E. 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med*. 68:581-590.
- Verzola D, Bertolotto M, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F, Berruti V, Gandolfo MT, Garibotto G, and Deferrari G. 2004. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol*. 15:S85–S87.
- Vidotti D, Casarini D, Cristovam P, Leite C, Schor N, Boim M. 2004. High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 286:1039-1045.
- Wagener FA, Dekker D, Berden JH, Scharstuhl A, van der Vlag J. 2009. The role of reactive oxygen species in apoptosis of the diabetic kidney. *Apoptosis*. 14(12):1451-8.
- Wahab N, Harper K, Mason R. 1996. Expression of extracellular matrix molecules in human mesangial cells in response to prolonged hyperglycaemia. *Biochem J*. 316:985-992.
- Wang GG, Lu XH, Li W, Zhao X, Zhang C. 2011. Protective Effects of Luteolin on Diabetic Nephropathy in STZ-Induced Diabetic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011:323171
- Wang L, Zhang Y, Wang Z, Li S, Min G, Wang L, Chen J, Cheng J, Wu Y. 2012. Inhibitory effect of ginsenoside-Rd on carrageenan-induced inflammation in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 90(2):229-36.
- Wellwood JM, Price RG, Ellis BG, Thompson AE. 1976. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl-beta-glucosaminidase in human urine. *Clin Chim Acta*. 69(1):85-91.
- Whiteside C, Dlugosz J. 2002. Mesangial cell protein kinase C isozyme activation in diabetic milieu. *Am J Physiol Renal Physiol*. 282:F975–F980.

Whitin J, Tham D, Bhamre S, Ornt D, Scandling J, Tune B, Salvatierra O, Avissar N, Cohen H. 1998. Plasma glutathione peroxidase and its relationship to renal proximal tubule function. *Mol Genet Metab.* 65:238-45.

WHO. 2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>. 07/06/2011.

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.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care.* 27:1047-1053.

Wink DA, Mitchel JB. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 25:434–56.

Wolf G, Ziyadeh F. 1999. Molecular mechanism of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int.* 56:393-405.

Wolf G, Ziyadeh F. 2007. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol.* 106:26-31.

World Health Organization (WHO). Prevalence of Diabetes in the WHO Region of the Americas. http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index3.html. 10/11/2007.

World Health Organization (WHO). Prevalence of Diabetes in the WHO Region of the Americas. http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/index3.html. 10/11/2007.

Wu D, Peng F, Zhang B, Ingram AJ, Kelly DJ, Gilbert RE, Gao B, Kumar S, Krepinsky JC. 2009. EGFR-PLC γ 1 signaling mediates high glucose-induced PKC β 1-Akt activation and collagen I upregulation in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 297(3):F822-34.

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.

Xu S, Jiang B, Maitland KA, Bayat H, Gu J, Nadler JL, Corda S, Lavielle G, Verbeuren TJ, Zuccollo A, Cohen RA. 2006. The thromboxane receptor antagonist S18886 attenuates renal oxidant stress and proteinuria in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Diabetes.* 55(1):110-9.

Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, Kim M. 2006. Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 319(1):228-36.

Yan H, Li X, Xie J, Li M. 2007. Effects of advanced glycation end products on renal fibrosis and oxidative stress in cultured NRK-49F cells. *Chinese Med J.* 120:787-793.

- Yang J, Dai C, Liu Y. 2002. Hepatocyte Growth Factor Gene Therapy and Angiotensin II Blockade Synergistically Attenuate Renal Interstitial Fibrosis in Mice. *J Am Soc Nephrol.* 13: 2464–2477.
- Yang J, Liu Y. 2001. Dissection of Key Events in Tubular Epithelial to Myofibroblast Transition and Its Implications in Renal Interstitial Fibrosis. *Am J Pathol.* 159:1465–1475.
- Yang WS, Seo JW, Han NJ, Choi J, Lee KU, Ahn H, Lee SK, Park SK. 2008. High glucose-induced NF- κ B activation occurs via tyrosine phosphorylation of I κ B α in human glomerular endothelial cells: involvement of Syk tyrosine kinase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294(5):F1065-75.
- Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. 1986. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell.* 45:711-9.
- Young Rhyu D, Yang Y, Ha H, Lee G, Song J, Uh S, Bahl Lee H. 2005. Role of reactive oxygen species in TGF- β 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 16: 667–675.
- Yu B. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 74:139-62.
- Zafar M, Naeem-ul-Hassan S. 2010. Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study. *Int J Morphol.* 28(1):135-142.
- 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.
- Zhuang S, Yan Y, Daubert RA, Han J, Schnellmann RG. 2007. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292(1):F440-7.
- 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.
- Ziyadeh F. 2004. Mediators of Diabetic Renal Disease: The Case for TGF- β as the Major Mediator. *J Am Soc Nephrol.* 15:S55–S57.
- Zygmunt K, Faubert B, MacNeil J, Tsiani E. 2010. Naringenin, a citrus flavonoid, increases muscle cell glucose uptake via AMPK. *Biochem Biophys Res Commun.* 398(2):178-83.