

Efecto protector de la raíz

de *Ruellia Tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental

Protective effect of RUELLIA tuberosa L. rooth on renal damage induced by experimental diabetes

^{1,2}Carlos Ciangherotti, Farmacéutico y PhD en Farmacología, ¹Ana María Maldonado, Farmacéutico, ³Giovannina Orsini, Licenciado en Biología, ⁴Lourdes Perdomo, Histotecnóloga, ⁴Marco Álvarez, Biólogo y PhD en Farmacología, ¹María Margarita Salazar-Bookaman, Farmacéutico y PhD en Farmacología, ¹Anita Israel, Farmacéutico y PhD en Farmacología.

¹Laboratorio de Neuropeptidos, ²Unidad de Cultivo celular y ³Herbario "Victor Manuel Ovalles" de la Facultad de Farmacia e ⁴Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela.

Recibido: 20/09/2012

Aceptado: 21/01/2013

Resumen

57

La diabetes es uno de los principales problemas de la salud pública mundial, en parte debido a su asociación con otras enfermedades cardiometabólicas. La nefropatía es una de las principales causas de muerte en esta enfermedad. Se conocen varios mediadores celulares de la nefropatía diabética: la angiotensina II, los productos de glicosilación avanzada, las quinasas activadas por mitógenos, las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre otras, cuya activación conduce a aumento de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular, el ensanchamiento del glomérulo, el daño tubular y la fibrosis. En el campo de 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. En Venezuela son muy pocas las plantas que han sido estudiadas. *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) es una especie de uso etnomédico para la diabetes y para problemas renales. 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. 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 extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT) sobre el daño renal en un modelo de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ). Asimismo, se estudió la relación de la actividad protectora de la RT con su potencial actividad antioxidante. Para ello, se evaluaron las modificaciones de la glicemia, de los marcadores de daño renal y del sistema antioxidante renal. Los resultados demuestran que RT presenta actividad antioxidante y fue capaz de disminuir y/o revertir la alteración de los marcadores del daño renal inducido por la hiperglicemia. Igualmente, RT contrarrestó la disminución de la actividad de la CAT, la SOD, la GPx y la GR inducida por la glucosa in vivo. Todos estos hallazgos establecen al RT como un antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia y del estrés oxidativo. Esto aporta, por primera vez, información acerca de los efectos farmacológicos de la especie, a la vez que contribuye a la validación de su uso tradicional y al desarrollo de este potencial fitofármaco.

Palabras Clave: *Ruellia tuberosa* L., Diabetes, renoprotector.

Diabetes is one of the main problems of global public health, partly because of its association with other cardiometabolic diseases. Nephropathy is one of the leading causes of death in this disease. Various cellular mediators of diabetic nephropathy are known: Angiotensin II, advanced glycation products, mitogen-activated protein kinases, reactive oxygen and nitrogen species, among other, whose activation leads to increased synthesis of extracellular matrix proteins, the widening of the glomerula, tubular damage and fibrosis. In the field of ethnopharmacology several studies have provided new species, herbal and natural products for the treatment of diabetes and its complications. In Venezuela there are very few plants that have been studied. *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) is a species of ethnomedical use for diabetes and kidney problems. The aerial parts of this species have been studied extensively, meeting activities such as: anti-diabetic, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic. However, the root has been little studied. In order to validate its traditional use as an antidiabetic and its protective capacity to know the complications of diabetes, in this work the effect of the aqueous root extract of *R. tuberosa* L. (RT) was assessed on the kidney damage in a rat model with streptozotocin-induced diabetes (ETZ). To do this, the changes of blood glucose, markers of renal damage, renal antioxidant system was evaluated. The result demonstrates that RT has antioxidant activity and was able to reduce and/or reverse the alteration of renal injury markers induced hyperglycemia. Similarly, RT blunted the reduced enzymatic activity of CAT, SOD, GPx and GR induced by glucose. These findings establish RT as an antioxidant with protective effect on the kidney damage in diabetes, via a mechanism that involves the decrease of glycemia and oxidative stress. This provides, for the first time, information about the pharmacological effects of RT, while contributing to the validation of its traditional use.

Key words: *Ruellia tuberosa* L., Diabetes, renoprotector.

Introducción

La diabetes mellitus es uno de los problemas más grandes de la salud pública mundial, en parte debido a su alta morbilidad y a su asociación con otros trastornos como la obesidad, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca e insuficiencia renal^{1,2}. La nefropatía es considerada como una de las complicaciones más importante de esta enfermedad, la condición diabética es la principal causa de insuficiencia renal terminal^{3,4}.

El riñón, al igual que la mayoría de órganos afectados por la hiperglicemia, 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 quinasas activadas por mitógenos (MAPKs, Ej.: las ERK), la angiotensina II (ANG II), la proteína quinasa C (PKC),

el diacilglicerol (DAG), las especies reactivas de oxígeno (EROs), las especies reactivas de nitrógeno (ERN), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B), la janus quinasa (JAK), entre otros mediadores (5,6). La activación de estas moléculas, trae como consecuencia la alteración de la expresión de algunas 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^{6,7}.

Los eventos intracelulares mediados por la vía DAG-PKC-ERK-NF- κ B son el eje central de la nefropatía diabética^{6,7,8}. En general, la activación de esta vía 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 (Ej.: el colágeno I y IV, la fibronectina y la lamina), así como también por la disminución de la actividad de la Na⁺, K⁺ ATPasa^{7,8,9}. Las altas concentraciones de glucosa incrementan la formación de las EROs, tanto en las células mesangiales como en las del epitelio tubular, en donde ocurre una activación recíproca con otras cascadas de señalización, tales como: la PKC, las MAPKs y las JAK^{10,11,12,13}. De manera que aguas abajo se estimula la expresión de algunas proteínas profibróticas por la acción de algunos factores de transcripción, como por ejemplo, el NF- κ B, la AP-1 y la Sp-1¹². Otro evento que contribuye al establecimiento del estrés oxidativo radica en la disminución de las defensas antioxidantes enzimáticas. En pacientes con nefropatía diabética se ha observado una inhibición de la expresión de algunas de estas enzimas, tales como la catalasa (CAT) y la superóxido dismutasa (SOD), favoreciéndose así el desbalance oxidativo celular¹⁴. Asimismo, algunos modelos de animales diabéticos que sobreexpresan la CAT o la SOD, presentan una significativa disminución del daño renal^{15,16,17,18} y de la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en las células renales en cultivo¹⁵.

En la ruta a seguir para el desarrollo de terapias alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, se ha estimulado a nivel mundial 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. En este sentido, 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^{19,20,21}.

Una de las plantas con gran potencial antioxidante es *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae), conocida en Venezuela como escopetera, escopetilla o yuquilla²². Esta especie es utilizada de manera tradicional para el tratamiento de la diabetes, las anemias, como diurético y para el tratamiento de diversos problemas renales^{22,23,24}. Asimismo, sus partes aéreas han

mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, antinociceptiva y nefroprotectora en varios modelos experimentales in vivo e in vitro^{25, 26, 27, 28, 29,30}. Sin embargo, la raíz ha sido poco estudiada, a pesar de que esta parte de la planta es utilizada en la medicina tradicional venezolana. Se ha demostrado que extractos orgánicos de las hojas o partes aéreas de *R. tuberosa* L. producen un efecto hipoglicémico en conejos y en ratas con diabetes inducida por el aloxano^{30,31} y en ratas con diabetes tipo II inducida por la estreptozotocina (ETZ) combinada con la nicotinamida²⁹. Igualmente, el extracto hidroalcohólico de sus hojas frescas fue capaz de revertir, de manera crónica, el daño renal en las ratas con diabetes inducida por el aloxano, evaluado desde el punto de vista de sólo dos marcadores de la función renal: el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina plasmática²⁷.

Al evaluar farmacológicamente el extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT), se ha validado su uso tradicional como antiinflamatorio y antinociceptivo en modelos animales³², y en el tratamiento de la gastritis, utilizando un modelo de ratas con gastritis inducida por etanol³³. Entre los productos naturales aislados de las partes aéreas de *R. tuberosa* L. se encuentran: la apigenina y la apigenina-7- β -D-glucuronido^{34,35}, los cuales han sido señalados como los responsables de la actividad antidiabética en otras especies vegetales^{36,37}. Igualmente, se ha descrito de manera preliminar la presencia de flavonoides, fenoles y saponinas en los extractos de todas las partes de la planta, incluyendo la raíz^{38,39,40}. Los estudios sobre la actividad antioxidante de las partes aéreas de la planta han revelado un potencial efecto atrapador de las EROs y de las ERNs, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el óxido nítrico (ON)^{25,41,42}. Todas estas especies reactivas son mediadores muy importantes del daño renal en la diabetes⁴³.

En vista de la evidencia en el presente estudio, se pretende demostrar si el extracto acuoso 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 diabética. Para ello, se propone utilizar modelos preclínicos de diabetes in vivo, en donde se evaluará cómo afecta el RT los cambios fisiológicos y bioquímicos renales inducidos por un ambiente hiperglicémico. Los resultados permitirán consolidar un nuevo y potencial fitofármaco, de utilidad para el tratamiento de los pacientes diabéticos, con o sin nefropatía. Además, nuestros hallazgos contribuirán 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 en la diabetes.

Material botánico. La planta fue recolectada en los jardines de la Facultad de Ingeniería, Universidad Central de Venezuela, 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, recolectados por el Dr. Stephen Tillett.

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (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 la cepa NIH bajo las mismas características antes mencionadas. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio⁴⁴ y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

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 en medio de cultivo para los diferentes ensayos.

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 col.⁴⁵. Este método se basa en la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por el $O_2^{\cdot-}$ generado a partir de la oxidación de la xantina a ácido úrico a través de la xantina oxidasa. Brevemente, se coloca en una celda de cuarzo 782 μ L de la mezcla de reacción (xantina 0,3 mM; $NaCO_3$ 0,4 mM y NBT 150 μ L en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7,0), 170 μ L de extracto (concentraciones crecientes) y 170 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7,0). La reacción se inicia con el añadido de 48 μ L de xantina oxidasa (8U). Se cuantifica la actividad atrapadora de $O_2^{\cdot-}$ mediante la lectura simultánea de la absorbancia a 295 nm y a 560 nm, cada minuto durante 3 minutos. Para el cálculo del 100% de reducción se agregó 170 μ L del amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7,0) en lugar de la muestra. La lectura a 295 nm (ác. úrico), permitió asegurar que el extracto no afecta la actividad de la xantina oxidasa. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de $O_2^{\cdot-}$ atrapado.

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

Toxicidad aguda y subcrónica. Para evaluar la toxicidad del RT se usó el método observacional⁴⁶. Toxicidad aguda: Los animales fueron divididos en grupos de 8 animales cada uno y se les administró dosis crecientes de RT hasta 1500 mg/Kg, p.o. Posterior al tratamiento, el comportamiento y/o

muerte de los ratones fueron evaluados 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, p.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.

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

Diseño para experimento crónico. Los animales fueron divididos en cuatro (4) grupos de siete (7) animales cada uno: 1) Grupo Control, ratas tratadas con agua destilada p.o. (0,1 mL/100g de peso corporal/día), 2) Grupo ETZ, ratas diabéticas tratadas con agua destilada p.o.; 3) Grupo RT, ratas tratadas con 10 mg/kg/día, p.o. de RT y 4) Grupo ETZ + RT, ratas diabéticas tratadas con 10 mg/kg/día, p.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. Se realizó el control de la función renal al final de cada semana, durante cuatro (4) semanas. Al término de la última semana, los animales fueron sacrificados por decapitación y los riñones fueron extraídos y pesados.

Determinación de la creatinina en el suero. La determinación se llevó a cabo usando un kit comercial de creatinina directa (Laboratorios Biogamma C.A., Caracas, Venezuela). 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. La cuantificación de la creatinina sérica se realizó espectrofotométricamente a una absorbancia de 510 nm y los resultados se expresaron en mg/dL.

Determinación del nitrógeno ureico en sangre (BUN). La determinación del BUN se llevó a cabo por el método descrito por Sampson y col.⁴⁷, empleando un kit comercial (Stanbio Laboratory, Boerne, TX, USA). Tanto la muestra como el estándar de urea (30 mg/dL) se cuantificaron a una λ de 340 nm (región de absorción del NADH). 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.

Determinación de la Proteinuria. La cuantificación de las proteínas en la orina se llevó a cabo mediante el método turbidimétrico descrito por Pesce y Strande⁴⁸, en donde se

forma un complejo coloreado con el Rojo de Ponceau S. La cuantificación de las proteínas totales se realizó a una λ de 560 nm, usando 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).

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. Los resultados se expresaron en mL/100g de peso corporal.

Determinación de las proteínas totales en la corteza renal. Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col.⁴⁹, utilizando albúmina sérica de bovino como patrón.

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 microtomo se obtuvo cortes de 4 mm de grosor y fueron teñidos con tricómico 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.

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:

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 oxidasa⁵⁰. En un tubo de ensayo se añade 2,45 mL de la mezcla de reacción (xantina 0,122 mM, EDTA 0,122 mM, NBT 30,6 μ M, albúmina 0,006% y bicarbonato de sodio 4 mM), a 27 °C. Se añaden 500 μ L de muestra, diluida 1:100 en amortiguador de fosfatos 50 mM (pH 7) y se inicia la reacción con la adición de 50 μ L de xantina oxidasa (8,4 unidades). El blanco consistió de los mismos reactivos, pero sin xantina oxidasa, y el tubo de 100% de reducción consistió de xantina oxidasa sin muestra. Después de 30 minutos, se adicionó 1 mL de cloruro de cobre (II) 0,8 mM y se cuantificó la actividad a 560 nm de absorbancia. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, la cual se define como la cantidad de SOD necesaria para inhibir en un 50 % la reducción del NBT. Para determinar la actividad de las isoformas de la SOD, en paralelo se utilizó el N, N-dietilisotiocianato de sodio, un inhibidor de la isoforma CuZn-SOD; por lo tanto, se cuantificó directamente la isoforma Mn-SOD e indirectamente, la CuZn-SOD.

Actividad de la Catalasa (CAT). Se basa en la disminución de la absorbancia del H_2O_2 debido a su degradación por la catalasa presente en la muestra de acuerdo al método de Aebi⁵¹. En una celda de cuarzo se colocaron 25 μ L de homogeneizado del tejido de interés diluido 1:33 en amortiguador de fosfatos 10 mM (pH 7), se adicionó 725 μ L de H_2O_2 7,7 mM e inmediatamente se midió el cambio de absorbancia a 240 nm a los 15 y 30 segundos de reacción. De acuerdo a Aebi⁵¹, se utilizó la constante de reacción de primer orden (κ) como la unidad de actividad de la CAT, la cual quedó definida de acuerdo a la siguiente fórmula: $\kappa = (1/t) (2,3 \times \log A1 / A2)$, donde t es el intervalo de tiempo medido (seg), A1 y A2 son las absorbancias del H_2O_2 en los tiempos t1 y t2. Los resultados se expresaron como κ /mg de proteína.

Actividad de la Glutación Peroxidasa (GPx). La actividad de la GPx se mide de manera indirecta por una reacción acoplada a la glutación reductasa⁵² 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 se consume el glutación reducido, el cual es regenerado por la glutación reductasa a partir del glutación oxidado, proceso que consume NAD(P)H. La muestra de corteza renal se diluyó 1:10 con amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7,0). A 100 μ L de esta dilución se le adicionaron 800 μ L 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 de amortiguador de fosfatos. Se preparó un tubo de actividad inespecífica con 100 μ L 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 μ L de H_2O_2 0,25 mM y la absorbancia se midió inmediatamente a 340 nm, cada minuto, durante 3 minutos. Los resultados se expresaron como U/mg de proteína, siendo una unidad de GPx la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NAD(P)H por minuto.

Actividad de la Glutación Reductasa (GR). Se siguió el método de Carlberg y Mannervik⁵³, en el cual se mide la desaparición de NAD(P)H a 340 nm de una mezcla de reacción que contiene: glutación oxidado (GSSG), EDTA, NAD(P)H y la fuente de la enzima (homogeneizado de tejido). Se colocó en un tubo, 950 μ L de la mezcla de reacción (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) y 50 μ L de tejido homogeneizado (diluido 1:5) en amortiguador de fosfatos. Los tubos se agitaron e inmediatamente se midió la absorbancia a 340 nm cada minuto por 3 minutos. La actividad de la GR se determinó promediando los cambios de absorbancia por minuto de la muestra y multiplicando este valor por 0,16 (el inverso del coeficiente de absorción milimolar del NAD(P)H = 6,22). Los resultados se expresaron como U/mg de proteína. Una unidad de GR se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol de NAD(P)H por minuto.

Análisis estadístico. Los resultados obtenidos tanto in vivo como in vitro se presentan como la media \pm el error estándar de la media ($X \pm E.E.M.$). Los datos se analizaron con el pro-

grama Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante el 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.

Resultados

Efecto del extracto del RT sobre la producción de $O_2^{\cdot -}$

El extracto de *R. tuberosa* L. mostró actividad antioxidante, como lo evidencia su capacidad de atrapar al $O_2^{\cdot -}$ generado in vitro por el sistema: xantina-xantina oxidasa. El efecto antioxidante fue dependiente de la concentración (Figura 1).

Efecto del extracto del RT sobre el cambio del volumen urinario, el curso temporal de la glicemia, la excreción urinaria de proteínas y otros marcadores de la función renal

Como potencial fitofármaco, el RT fue capaz de disminuir y/o revertir todas las alteraciones de los marcadores de daño renal, tanto los sistémicos como los tisulares, en la diabetes.

Los ensayos de toxicidad en ratones (no se muestra) permitieron establecer un buen perfil de seguridad del RT, ya que ninguna de las dosis utilizadas produjo alteraciones tóxicas en los animales evaluados de manera aguda y subcrónica.

En la figura 2 se muestra el curso temporal de la glicemia en ratas tratadas o no con RT. Como puede observarse, la ETZ incrementó significativamente la glicemia a los 7, 14, 21 y 28 días; el tratamiento con RT no alteró per se los valores de glicemia, pero mostró actividad antidiabética al producir un efecto antihiper glucémico parcial en los animales con diabetes inducida por la ETZ.

En lo que respecta a los marcadores sistémicos de la función renal (urinarios y plasmáticos), el tratamiento con 10 mg/kg/día de RT durante 28 días, previno parcialmente el aumento del volumen urinario (Figura 2) y de la creatinina sérica (Tabla I). Asimismo, se observó que la ETZ incrementó significativamente la excreción urinaria de proteínas y este efecto fue completamente prevenido por el tratamiento con RT (Figura 3). Tal y como se muestra en la Tabla I, RT fue capaz de prevenir el incremento del BUN y el decremento de la excreción urinaria de creatinina inducidos por la hiper glucemia (Tabla I).

Efecto del RT sobre la fibrosis renal

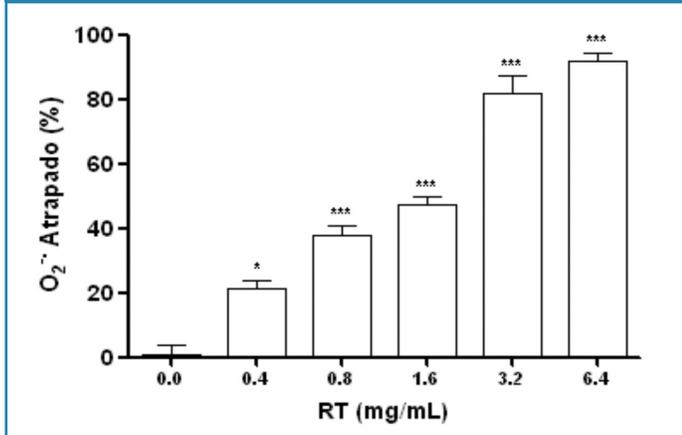
Los daños tisulares, los cuales involucran la fibrosis y el daño oxidativo en la corteza renal, también fueron alterados en los animales diabéticos y revertidos total o parcialmente por el tratamiento crónico con el RT. Efectivamente, tal y como se muestra en las figuras 4 y 5, el tratamiento con el RT durante 28 días, fue capaz de prevenir totalmente el incremento del peso del riñón y del contenido de colágeno I inducido por la diabetes experimental, pero solo parcialmente el incremento del contenido de proteínas totales de la corteza renal.

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 (Tabla II). El tratamiento con el RT previno par-

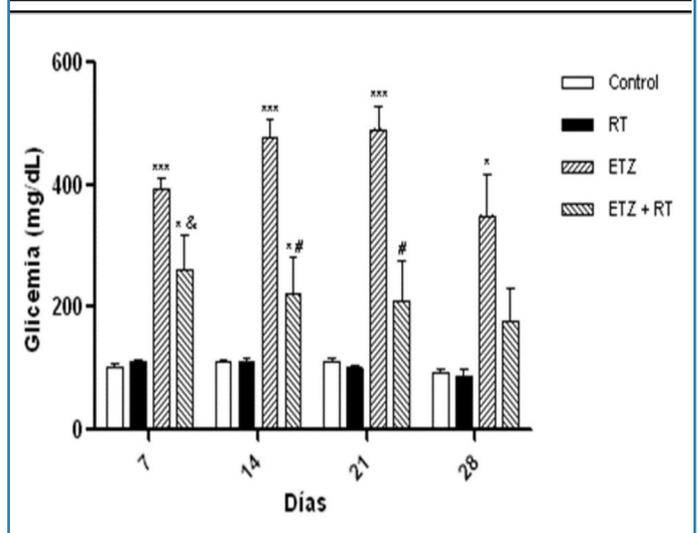
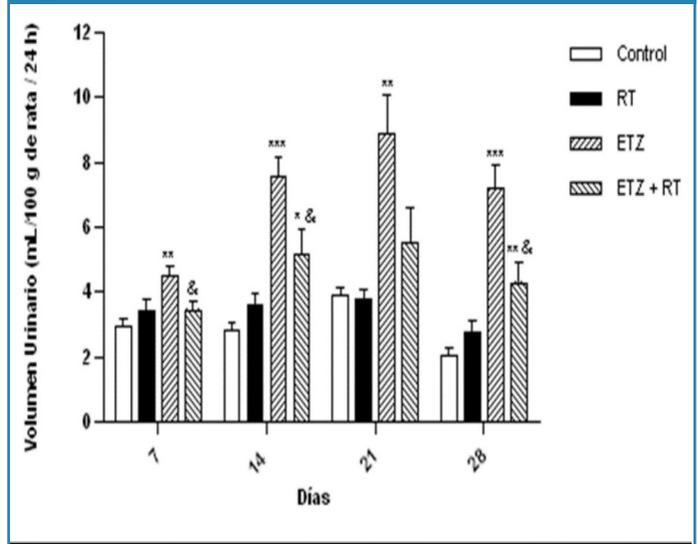
cialmente la disminución en la actividad de la CAT, de la CuZn-SOD y de la SOD total, mientras que abolió totalmente la disminución inducida por la diabetes en la actividad de la GPx. Por el contrario, el tratamiento con RT no alteró la disminución de la actividad de la GR y de la Mn-SOD inducida por la ETZ.

Figura 1



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 ± E.E.M. *p<0,05 y ***p< 0,001 con respecto al control. N=4 por grupo.

Figura 2



Curso temporal de los cambios en el volumen urinario (izquierda) y de la glicemia (derecha) 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 ± E.E.M. *p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,001 con respecto al control. &p<0,05 con respecto al grupo ETZ. &p<0,05 y #p<0,01 con respecto al grupo ETZ. N=7 por grupo.

Figura 3

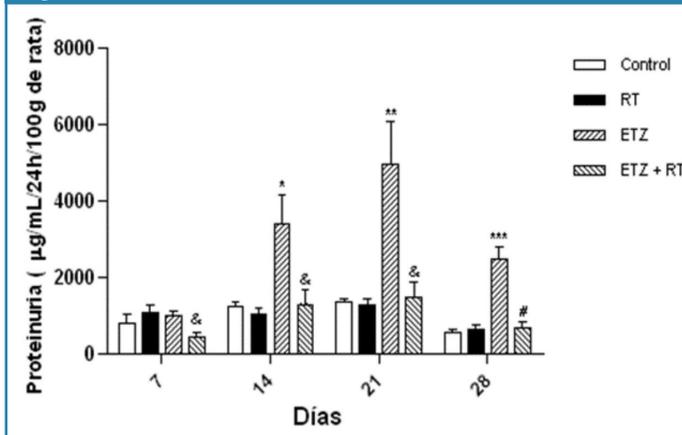


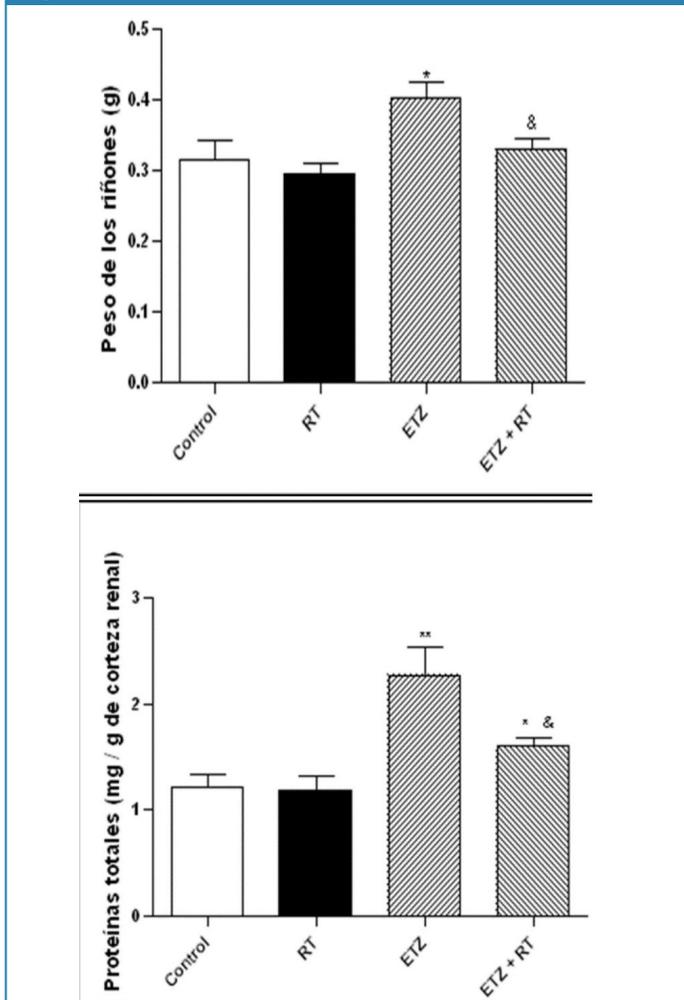
Figura 3. Curso temporal de la excreción urinaria de proteínas en ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) tratadas con 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) durante 28 días. Los valores se muestran como la media ± E.E.M. *p<0,05, **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.

Tabla I. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre algunos marcadores de la función renal

	Control	Ratas tratadas con el RT	Ratas diabéticas	Ratas diabéticas tratadas con el RT
BUN (mg/dL)	17,08±1,31	14,16±1,17	46,5±6,06**	23,14±5,93&
Creatinina en suero (mg/dL)	33,60± 4,43	49,44 ± 8,05	170.4 ± 24,78***	82,25 ± 21,36&
Excreción urinaria de creatinina (mg/dL)	123,3 ± 10,75	135,9 ± 12,40	79,11 ± 2,06**	99,29 ± 7,58&

Los valores representan la media ± E.E.M. *p<0,05; **p< 0,01 y ***p<0,001 con respecto al control. &p<0,05 con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

Figura 4



Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el peso (izquierda) y las proteínas totales (derecha) 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 E.E.M. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control. [§] $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=5 por grupo.

Tabla II. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en la corteza renal

	Control	Ratas tratadas con el RT	Ratas diabéticas	Ratas diabéticas tratadas con el RT
Actividad de la CAT (μ mg de proteína)	0,041 \pm 0,004	0,040 \pm 0,007	0,009 \pm 0,003***	0,024 \pm 0,004* [§]
Actividad de la GPx (U/mg de proteína)	0,38 \pm 0,06	0,37 \pm 0,05	0,21 \pm 0,03*	0,45 \pm 0,08 [§]
Actividad de la GR (U/mg de proteína)	0,041 \pm 0,005	0,042 \pm 0,003	0,021 \pm 0,003*	0,034 \pm 0,005
Actividad de la CuZn-SOD (U/mg de proteína)	6,04 \pm 0,72	4,35 \pm 0,39	-0,16 \pm 0,83***	2,99 \pm 0,90* [§]
Actividad de la Mn-SOD (U/mg de proteína)	3,53 \pm 0,32	3,45 \pm 0,27	5,29 \pm 1,05	4,26 \pm 0,37
Actividad de la SOD total (U/mg de proteína)	6,43 \pm 0,42	5,80 \pm 0,28	2,60 \pm 0,52***	5,01 \pm 0,23* [§]

Los valores representan la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ 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=5 por grupo.

Discusión

Uno de los mecanismos propuestos para el daño endotelial y renal por la hiperglicemia es la formación de EROs¹². Recientes estudios sugieren que la hiperglicemia induce estrés oxidativo y disminuye los mecanismos de defensa antioxidante^{54,55}. Entonces la acción de las EROs representa un fenómeno crucial involucrado en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad microvascular. Además de las EROs, la hiperglicemia conduce al daño renal a través de varios mediadores importantes, tales como: los AGEs, la ANG-II y las ERNs^{4,56}. Estos mediadores, a su vez, están íntimamente relacionados con la activación de la vía de señalización DAG/PKC/MAPK/NF- κ B en condiciones de alta concentración de glucosa^{8,9,57}. Es por ello que se ha sugerido que los antioxidantes podrían prevenir las complicaciones de la diabetes. Al respecto, nuestros resultados apuntan a esa posibilidad ya que demuestran que el RT es antioxidante y precisamente contra la especie reactiva más involucrada en la nefropatía diabética, el O₂^{-•}.

Unos de los modelos animales más utilizados en el estudio del daño renal en la diabetes es aquel inducido por la ETZ en la rata^{58,59}. Éste representa principalmente un modelo de diabetes tipo 1, debido al enorme daño apoptótico que sufren

Figura 5

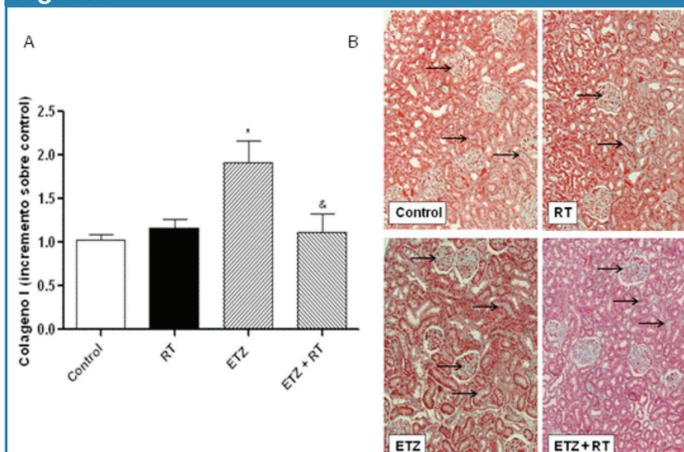


Figura 5. A. Efecto de 10 mg/kg/día del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre el contenido de colágeno I en el riñón de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento. Los valores se muestran como la media \pm E.E.M. * $p < 0,05$ con respecto al control. [§] $p < 0,05$ con respecto al grupo ETZ. N=4 por grupo. B. Microfotografía representativa de la microscopía óptica del colágeno I. Las flechas indican la tinción de colágeno I por el tricrómico de Masson (en verde) a 160x.

las células β pancreáticas y, por ende, el agotamiento de la insulina⁵⁹. Algunos signos comunes de la diabetes en humanos son fielmente reproducidos en las ratas con diabetes inducida por la ETZ; 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^{58, 60}. Todas estas alteraciones están relacionadas con el establecimiento de la nefropatía diabética. Nuestros hallazgos permiten pronosticar el posible papel terapéutico de RT, ya que demuestran que el tratamiento crónico con el RT en ratas con diabetes inducida por la ETZ fue capaz de prevenir, parcial o totalmente, algunas de las alteraciones típicas de la diabetes experimental, sin producir efectos tóxicos. Estos resultados relativos a la toxicidad son similares a los reportados recientemente por Rajan y col.³⁰, 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.

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 antihiperglicemiante, lo cual concuerda con los trabajos de Chothani y col.⁶¹, de Ullah y col.³¹ y de Rajan y col.³⁰, 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 hipoglicemiante en animales diabéticos^{62, 63, 64} 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 sugieren esa posibilidad ya que el tratamiento crónico con el extracto RT fue capaz de revertir la alteración de los marcadores de daño renal como son: el incremento del volumen urinario, la proteinuria, el incremento de la creatinina plasmática y el BUN. Resultados similares fueron reportados por Manikandan y Arokia²⁷, quienes utilizando el extracto hidro-alcohólico de las hojas frescas de *R. tuberosa* L. revertieron 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^{64, 65, 66, 67, 68}. Los cambios en estos marcadores se acompañan 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 y 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^{7, 69, 70}. 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.

Seyer-Hansen⁷¹ 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, lo que apoya aun más el papel renoprotector del RT. Este efecto protector del RT podría ser directo a nivel renal o, alternativamente, un efecto indirecto por su acción hipoglicemiante. El hallazgo de Seyer-Hansen⁷¹ con respecto a la proporcionalidad de la hiperglicemia con el daño renal apoya la acción indirecta reportada en este estudio. Aun más, el perfil antioxidante del RT también podría estar relacionado con la inhibición de la fibrosis, tal como ha sido descrito para otros importantes antioxidantes como el tempol y el tirón⁷².

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 sistema oxidante y el nitrante se encuentran elevados^{73, 74, 75}. Efectivamente, se ha observado una disminución de la actividad de la CAT en los riñones de las ratas con diabetes inducida por la ETZ^{54, 76, 77, 78}. Asimismo, la expresión de esta enzima se ha visto disminuida, tanto en pacientes con nefropatía diabética¹⁴ como en el riñón de las ratas diabéticas^{76, 77, 78}. Nuestros resultados son consistentes con la evidencia reportada en la literatura ya que se observa una reducción de la actividad de la CAT en la corteza renal de ratas tratadas con ETZ. En relación a la actividad SOD y la GPx en la diabetes, los resultados reportados son variables. Así, Limaye y colaboradores⁷⁶ han reportado incrementos de la actividad de la GPx, mientras que nuestros hallazgos junto con los reportados por Sadi⁷⁸ y Luo y colaboradores⁷⁷ demuestran una importante disminución de la actividad de la GPx. En cuanto a la expresión de esta enzima en el riñón, algunos autores han encontrado aumentos^{76, 78}, mientras que Luo y colaboradores⁷⁷ han reportado una disminución del ARNm de la enzima. En el caso de la SOD los resultados han sido controversiales, la relación entre la actividad y la expresión

obtenida por algunos investigadores señala lo siguiente: ambas permanecen sin cambios⁷⁸, aumentan^{54,76} o disminuyen⁷⁷. En el presente estudio los hallazgos mostraron que la actividad de la SOD total mostró reducción 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 se apoya en los de Kakkar y col.⁵⁴ quienes demostraron que 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 diabéticas, donde ha sido descrito un aumento de la expresión de la Mn-SOD sin alteración de la CuZn-SOD⁷⁹. 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^{80,81,82,83}. Con respecto a la actividad de la GR, existen resultados contradictorios sobre la actividad en el riñón de ratas con diabetes inducida por la ETZ, encontrándose sin alteración⁸⁴ o disminuida (85 y resultados presentes). Ahora bien, interesantemente los efectos sobre la actividad del sistema antioxidante inducidos por la hiperglicemia fueron prevenidos por el RT, lo que permite inferir un nuevo mecanismo protector frente al daño renal, tanto para esta especie como para el género *Ruellia*. Este efecto ha sido descrito también para otros extractos ricos en polifenoles, tales como el de *Ichnocarpus frutescens* y el de *Hibiscus sabdariffa* L.^{86,87} o algunos compuestos polifenólicos como el resveratrol y la mangiferina^{88,89} en ratas con diabetes inducida por la ETZ.

En conclusión, los hallazgos permiten establecer al RT como un extracto antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia, del estrés oxidativo, y de la vía de señalización de la PKC-NF- κ B, aportando por primera vez las bases de los efectos farmacológicos de la especie *R. tuberosa* L., a la vez que contribuye tanto a la validación de su uso tradicional como a la caracterización farmacológica de su género. Hasta la fecha sólo se conocía el efecto inhibitorio de la enzima convertidora de angiotensina, la actividad contráctil sobre la musculatura lisa del íleon de cobayo, la actividad colinérgica y la actividad estrogénica de *Ruellia praetermissa*. Sceinf.ex.Lindau^{90,91,92}, por lo que la falta de información etnofarmacológica sobre el género, hace más valiosos nuestros hallazgos y sienta las bases para el estudio fitoquímico y tecnológico de este potencial fitofármaco.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado por los Proyectos: Misión Ciencia, Sub-proyecto 7, ECCV-2007001585, PEII-20122000760, el CDCH-UCV proyectos PG-06-7349-2008-1/2 y AIA-06.8402.2012.

Referencias

- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes. *Diabetes Care*. 2004; 27:1047-1053.
- Gilbert R, Connelly K, Kelly D, Pollock C, Krum H. Heart failure and nephropathy: Catastrophic and interrelated complications of diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol*. 1:193-208.
- Bloomgarden Z. Diabetes complications. *Diabetes Care*. 2004; 27:1506-14.
- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 30(Suppl1):S4-S41; 2007^a.
- Schrijvers B, De Vriese A, Flaybjerg A. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: The role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocrine Rev*. 2004; 25:971-1010.
- Kanwar Y, Akagi S, Sun L, Nayak B, Xie P, Wada J, Chugh S, Danesh F. Cell Biology of Diabetic Kidney Disease. *Nephron Exp Nephrol*. 2005; 101:100-10.
- Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Am Soc Nephrol*. 2003; 14:1358-73.
- Haneda M, Koya D, Kikkawa R. Cellular mechanisms in the development and progression of diabetic nephropathy: activation of the DAG-PKC-ERK pathway. *Am J Kidney Dis*. 2001; 38:S178-81.
- Koya D, Jirousek M, Lin Y, Ishii H, Kuboki K, King G. Characterization of protein kinase C isoform activation on the gene expression of transforming growth factor- β , extracellular matrix components, and prostanooids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest*. 1997; 100:115-26.
- Ha H, Yang Y, Lee H.. Mechanisms of reactive oxygen species generation in LLC-PK1 cells cultured under high glucose. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13:531A.
- Ha H, Yu M, Choi Y, Kitamura M, Lee H. Role of high glucose-induced nuclear factor-kappaB activation in monocyte chemoattractant protein-1 expression by mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13:894-902.
- Lee H, Yu M, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive Oxygen Species-Regulated Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14: S241-5.
- Marrero M, Banes-Berceli A, Stern D, Eaton D. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006; 290:F762-8.
- Hodgkinson A, Bartlett T, Oates P, Millward B, Demaine A. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2003; 52:846-51.
- Craven P, Melhem M, Phillips S, De Rubertis F. Overexpression of Cu²⁺/Zn²⁺ superoxide dismutase protects against early diabetic glomerular injury in transgenic mice. *Diabetes*. 2001; 50:2114-25.
- DeRubertis F, Craven P, Melhem M, Salah E. Attenuation of renal injury in db/db mice overexpressing superoxide dismutase: evidence for reduced superoxide-nitric oxide interaction. *Diabetes*. 2004; 53:762-8.
- Brezniceanu M, Liu F, Wei C, Chénier I, Godin N, Zhang S, Filep JG, Ingelfinger J, Chan J. Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells. *Diabetes*. 2008; 57:451-9.
- Craven P, Phillips S, Melhem M, Liachenko J, DeRubertis F. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses increases in collagen accumulation induced by culture of mesangial cells in high-media glucose. *Metabolism*. 2001; 50:1043-1048.
- Uma Makheswari M, Sudarsanam D. Phytomedicine for Diabetes mellitus: An overview. *Res Pharm*. 2001; 1(4):28-37.
- Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M, Pillai KK A. Pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012; 4(1):27-42.
- Hung HY, Qian K, Morris-Natschke SL, Hsu CS, Lee KH.. Recent discovery of plant-derived anti-diabetic natural products. *Nat Prod Rep*. 2012; 29(5):580-606.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Varela M, López-Gramcko JT, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Israel A. Propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Acta Científica Venezolana*. 2007; 58(Sup. 1):252.
- Gil R, Mejías R, Carmona J, Mejías R, Rodríguez M. Estudio etnobotánico de algunas plantas expendidas en los herbolarios de Mérida, Ejido y Tabay (Estado Mérida-Venezuela). *Rev Fac Far*. 2003; 45(1):69-76.
- Giraldo D, Baquero E, Bermúdez A, Oliveira M. 2009. Caracterización del comercio de plantas medicinales en los mercados populares de Caracas-Venezuela. *Acta Bot Venez*. 2006; 32(2):267-301.
- Chen F-A, Wu A-B, Shieh P, Kuo D-H, Hsieh C-Y. Evaluation of the antioxidant activity of *Ruellia tuberosa*. *Food Chem*. 2006; 94:14-8.
- Ashrafal A, Subhan N, Sarder M, Nahar L, Sarker S. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Ruellia*. *Pharmaceutic Biol*. 2009; 47(3):209-14.
- Manikandan A, Arokia V. 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*. 2010; 2(3):190-201.
- Manikandan A, Arokia V. 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*. 2010; 1(2):142-6.
- Chothani DL, Patel MB, Vaghasiya H, Mishira SH. Review on *Ruellia tuberosa* (cracker plant). *Pharmacognosy J*. 2010; 2(12):506-12.
- Rajan M, Kishor V, Sathesh Kumar P, Reddy Swathi K, Sangam Haritha. Antidiabetic, antihyperlipidaemic and hepatoprotective activity of methanolic extract of *Ruellia tuberosa*

- Linn leaves in normal and alloxan induced diabetic rats J Chem Pharmaceutical Res. 2012; 4(6):2860-8.
31. Ullah S, Shahwar D, Ullah S, Ahmad M. Hypoglycemic activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in normal and alloxan-induced diabetic rabbits. J Chem Soc Pak. 2012; 34(2):436-41.
 32. Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López J, Orsini G, Israel A. Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. Rev Fac Far. 2012; 75(2):1-16.
 33. Arambewela L, Thambugala S, Ratnasooriya W. Gastroprotective activity of *Ruellia tuberosa* root extract in rats. Trop Med Plants. 2003; 4(2):191-9.
 34. Behari M, Goyal M y Streibl M. Natural Products From *Ruellia tuberosa* L. J Indian Chem Soc. 1981; LVIII:176-7.
 35. Singh R, Pandey H, Pandey R y Singh B. A Triterpenoid from *Ruellia tuberosa* Linn. Indian J Chem. 2002; 41B:1754-1756.
 36. Esmaeili MA, Zohari F, Sadeghi H. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucrium polium* on beta-cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes. Planta Med. 2009; 75(13):1418-20.
 37. Bansal P, Paul P, Mudgal J, G Nayak P, Thomas Pannakal S, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK. 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. 2012; 64 (6): 651-8.
 38. Arirudran A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical. Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). Pharmacognosy J. 2011; 3(2):29-34.
 39. Chothani D, Patel M, Mishra S. Phytochemical screening and physicochemical evaluation on various parts of *Ruellia tuberosa* linn. Ethnopharmacol. 2011. <http://www.inventi.in/Article/ep/228/10.aspx>.
 40. Chothani DL, Patel MB, Mishra SH. HPTLC Fingerprint Profile and Isolation of Marker Compound of *Ruellia tuberosa*. Chromatography Res Inter. 2012; 2012:1-6.
 41. Arirudran A, Saraswathy M, Vijayalakshmi K. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using in-vitro model. J Pharmacy Res. 2011; 4(12):4344-7.
 42. Kensa M, Neelamegam A. Comparison of free radical scavenging activities in the extracts of *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. Plant Archives. 2012; 12(1): 69-74.
 43. Stanton RC. Oxidative stress and diabetic kidney disease. Curr Diab Rep. 2011; 11(4):330-6.
 44. National Institutes of Health (NIH). Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ED. The National Academies Press. Studies. 2006. <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>.
 45. Bielski BHJ, Shlue GG, Bajuk S. Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂- and O₂ radicals. J Phys Chem. 1980; 84: 830-3.
 46. Irwin S. Drug screening and evaluative procedures. Science. 1962; 136:123-8.
 47. Sampson E, Baird M, Burtis C, Smith E, Witte D, Bayse D. 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. 1980; 26(7): 816-26.
 48. Pesce MA, Strande CS. A new micro method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. Clin Chem. 1973; 19(11):1265-7.
 49. Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Arosorough A, Farr L, Randall R. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. J Biol Chem. 1951; 193:265-75.
 50. Oberley L, Spitz D. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. Meth Enzymol. 1984; 105:457-64.
 51. Aebi H. Catalase, in Methods of Enzymatic Analysis (vol III), 3 ed., Weinheim, Verlag Chemie. pp. 273-286; 1982.
 52. Lawrence R, Burk R. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem Biophys Res Commun. 1976; 71:952-8.
 53. Carlberg I, Mannervik B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J Biol Chem. 1975; 250:5475-80.
 54. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Antioxidant defense system in diabetic kidney: a time course study. Life Sci. 1997; 60(9):667-79.
 55. McGrowder D, Anderson-Jackson L, Crawford T. Biochemical Evaluation of Oxidative Stress in Type 1 Diabetes. Capitulo 9 en: Escher A y Li A. Type 1 Diabetes. 2013; DOI: 10.5772/45927. <http://www.intechopen.com/books/type-1-diabetes/biochemical-evaluation-of-oxidative-stress-in-type-1-diabetes>.
 56. Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl R, Wolf G. 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. 2000; 11:1387-97.
 57. Ohshiro Y, Ma R, Yasuda Y, Yamamoto J, Clermont A, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern T, King G. Reduction of Diabetes-Induced Oxidative Stress, Fibrotic Cytokine Expression, and Renal Dysfunction in Protein Kinase C₂ Null Mice. Diabetes. 2006; 55:3112-20.
 58. Jensen PK, Christiansen JS, Steven K, Parving HH. Renal function in streptozotocin-diabetic rats. Diabetologia. 1981; 21(4):409-14.
 59. Verspohl E. Recommended testing in diabetes research. Planta Med. 2002; 68:581-90.
 60. Jim B, Santos J, Spath F, Cijiang He J. Biomarkers of diabetic nephropathy, the present and the future. Curr Diabetes Rev. 2012; 8(5):317-28.
 61. Chothani DL, Patel MB, Mishra SH. Hypoglycemic activity of *Ruellia tuberosa* on nicotinamide-streptozotocin induced type-II diabetic rats. Inventi Rapid: Ethnopharmacol. 2010^o. <http://www.inventi.in/Article/ep/124/10.aspx>.
 62. Panda S, Kar A. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. J Pharm Pharmacol. 2007; 59(11):1543-8.
 63. Grace MH, Ribnick DM, Kuhn P, Poulev A, Logendra S, Yousef GG, Raskin I, Lila MA. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. Phytomedicine. 2009; 16(5):406-15.
 64. Wang GG, Lu XH, Li W, Zhao X, Zhang C. Protective Effects of Luteolin on diabetic nephropathy in STZ-induced diabetic rats. Evid Based Complement Alternat Med. 2011; 2011:323171.
 65. Anjaneyulu M, Chopra K. Quercetin, an anti-oxidant bioflavonoid, attenuates diabetic nephropathy in rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2004; 31(4):244-8.
 66. Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, Kim M. Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. J Pharmacol Exp Ther. 2006; 319(1):228-36.
 67. Lu Q, Yin XX, Wang JY, Gao YY, Pan YM. Effects of Ginkgo biloba on prevention of development of experimental diabetic nephropathy in rats. Acta Pharmacol Sin. 2007; 28(6):818-28.
 68. Sawires F. Effect of Ginseng extract supplementation on renal functions in diabetic rats. J Agricul Sci. 2011; 3(2):17-31.
 69. Steffes M, Osterby R, Chavers B, Mauer M. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. Diabetes. 1984; 38: 1077-1081.
 70. Shah S, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca V. Oxidants in chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2007; 18:16-28.
 71. Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. Clin Sci Mol Med Suppl. 1976; 51(6):551-5.
 72. Xia L, Wang H, Goldberg H, Munk S, Fantus G, Whiteside C. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. Am J Physiol Renal Physiol. 2006; 290: F345-56.
 73. Mora A, Aragón D, Ospina L. Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. Vitae Rev Fac Quim Far. 2009; 16(3):2145-2660.
 74. Raza H, Prabu SK, John A, Avadhani NG. Impaired mitochondrial respiratory functions and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Int J Mol Sci. 2011; 12(5):3133-47.
 75. Belviranli M, Gökbek H, Okudan N, Büyükbakış S. Oxidative stress and anti-oxidant status in diabetic rat liver: Effect of plant polyphenols. Arch Physiol Biochem. 2012; 1:32-45.
 76. Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Cell Biochem. 2003; 243(1-2):147-52.
 77. Luo ZF, Qi W, Feng B, Mu J, Zeng W, Guo YH, Pang Q, Ye ZL, Liu L, Yuan FH. Prevention of diabetic nephropathy in rats through enhanced renal antioxidative capacity by inhibition of the proteasome. Life Sci. 2011; 88(11-12):512-20.
 78. Sadi G, Eryilmaz N, Tütüncüoğlu E, Cingir Ş, Güray T. Changes in expression profiles of antioxidant enzymes in diabetic rat kidneys. Diabetes Metab Res Rev. 2012; 28(3):228-35.
 79. Dobashi K, Asayama K, Hayashibe H, Uchida N, Kobayashi M, Kawaoi A, Kato K. 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. 1991; 60(1):67-72.
 80. Rister M, Baehner RL. 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. 1976; 58(5):1174-84.
 81. Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. Arch Biochem Biophys. 1985; 240(2):500-8.
 82. Padmaja S, Squadrito GL, Pryor WA. Inactivation of glutathione peroxidase by peroxynitrite. Arch Biochem Biophys. 1998; 349(1):1-6.
 83. Kim YS, Han S. Superoxide reactivates nitric oxide-inhibited catalase. Biol Chem. 2000; 381(12):1269-71.
 84. Li XM. Protective effect of Lycium barbarum polysaccharides on streptozotocin-induced oxidative stress in rats. Int J Biol Macromol. 2007; 40(5):461-5.
 85. Erejuwa O, Sulaiman S, Wahab M, Sirajudeen K, Salleh M, Gurtu S. 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. 2011; 12(3):1888-907.
 86. Kumarappan C, Mandal S. Polyphenolic extract of *Ichnocarpus frutescens* attenuates diabetic complications in streptozotocin-treated diabetic rats. Ren Fail. 2008; 30(3):307-22.
 87. Lee WC, Wang CJ, Chen YH, Hsu JD, Cheng SY, Chen HC, Lee HJ. Polyphenol extracts from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus attenuate nephropathy in experimental type 1 diabetes. J Agric Food Chem. 2009; 57(6):2206-10.
 88. Li X, Cui X, Sun X, Li X, Zhu Q, Li W. Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression in streptozotocin-induced diabetic rats. Phytother Res. 2010; 24(6):893-9.
 89. Schmatz R, Perreira L, Stefanello N, Mazzanti C, Spanevello R, Gutierrez J, Bagatini M, Martins C, Abdalla F, Daci da Silva Serres J, Zanini D, Vieira J, Cardoso A, Schetinger M, Morsch V. Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. Biochimie. 2012; 94(2):374-83.
 90. Salah A, Dongmo A, Kamanyi A, Bopelet M, Wagner H. Angiotensin-converting enzyme-inhibitory effect by *Ruellia praetermissa*. Pharma Biol. 2001; 39(1): 16-9.
 91. Salah AM, Dongmo AB, Kamanyi A, Bopelet M, Vierling W, Wagner H. In vitro purgative effect of *Ruellia praetermissa*. Scaief. ex. Lindau (Acanthaceae). J Ethnopharmacol. 2000; 72(1-2):269-72.
 92. Salah AM, Gathumbi J, Vierling W, Wagner H. Estrogenic and cholinergic properties of the methanol extract of *Ruellia praetermissa* Scaief. ex. Lindau (Acanthaceae) in female rats. Phytomedicine. 2002; 9(1):52-5.