

# Papel de la vía de señalización proteína kinasa C - NF- $\kappa$ B en la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L.

Role of protein kinase C- NF-  $\kappa$ B signaling pathway  
on the nephroprotector activity of aqueous extract  
of *Ruellia tuberosa* L. root

CARLOS CIANGHEROTTI<sup>A,\*</sup>, ADRIANA PIMENTEL<sup>B</sup>, GUSTAVO BENAİM<sup>B</sup>, GIOVANNINA  
ORSINI<sup>C</sup>, MARGARITA SALAZAR-BOOKAMAN<sup>D</sup>, ANITA ISRAEL<sup>A,\*</sup>

## Resumen

La diabetes es uno de los principales problemas de salud pública mundial. 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. Muchos grupos de investigación se han enfocado en la búsqueda de fármacos de origen natural que sean capaces de abolir, disminuir o prevenir la nefropatía diabética. *Ruellia tuberosa* L. (RT), perteneciente a la familia Acanthaceae, es una de estas plantas de uso etnomédico y cuyas partes aéreas han sido estudiadas de manera exhaustiva, encontrándose actividad antidiabética, antioxidante, anti-inflamatoria y analgésica. Aunque su raíz ha sido muy poco estudiada, hemos establecido su efecto antidiabético y protector del daño renal *in vivo*. Con el fin comprender los mecanismos celulares y moleculares que puedan contribuir a la protección de RT frente a las complicaciones de la diabetes, se estudió la relación de la actividad protectora del extracto acuoso de la raíz de RT con su potencial inhibición de la vía de señalización de la PKC-NF- $\kappa$ B *in vitro*. Para ello, se evaluó la modulación del efecto protector de RT sobre la disminución de la viabilidad celular en ambiente de alta glucosa (HG) y en presencia de un estimulante de la PKC, el éster de forbol (PMA) en células Vero. Igualmente se estudió el efecto de RT sobre la actividad del NF- $\kappa$ B inducida por el PMA en células HeLa. Los resultados muestran que RT protegió a las células Vero de la glucotoxicidad, ya que en condiciones de glucosa normal, el PMA disminuyó discretamente la viabilidad basal de RT; mientras que en ambiente de alta glucosa, RT revirtió la glucotoxicidad en forma dependiente de la concentración. El PMA redujo por sí mismo la viabilidad celular y bloqueó completamente el efecto protector de RT a niveles citotóxicos similares al de HG solo. El PMA incrementó la expresión del NF- $\kappa$ B en células HeLa y RT redujo significativamente este efecto. Estos hallazgos indican que el efecto protector que RT ejerce sobre el daño renal en la diabetes podría estar asociado al mecanismo que involucra la vía de señalización de la PKC-NF- $\kappa$ B. Nuestros hallazgos contribuyen tanto a la validación del uso tradicional de RT, así como a la caracterización farmacológica de su género, sentado así las bases para el estudio fitoquímico y tecnológico de este potencial fitofármaco.

**Palabras claves:** *Ruellia tuberosa* L., Proteína Kinasa C, Células HeLa, Células Vero, éster de forbol.

- A Laboratorio de Neuropeptidos, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.  
B Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos, Instituto de Estudios Avanzados IDEA, Caracas, Venezuela.  
C Herbario "Víctor Manuel Ovalles", Fac. de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.  
D Unidad de Cultivo Celular, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.  
\* Correspondencia: carlosciangherotti@yahoo.com; astern88@gmail.com.

## Abstract

Diabetes is one of the main problems of global public health. Diabetes tissue complications are the main cause of death, with diabetic nephropathy leading the list of damages induced by chronic hyperglycemia. Many research groups are focused on finding drugs of natural origin that are able to abolish, reduce or prevent diabetic nephropathy. *Ruellia tuberosa* L. (RT), from Acanthaceae family, is one of these plants of ethnomedical use, whose aerial parts have been studied exhaustively, being active as antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory and analgesic. Although its root has been poorly studied, we have established its antidiabetic and protective effect on renal damage *in vivo*. In order to validate its traditional use as an antidiabetic agent and to assess the protective capacity against diabetes complications, the relationship between the aqueous extract of the root of RT protective activity and its effects on PKC-NF- $\kappa$ B signaling pathway was studied. To this end, we evaluated the modulation of RT protective effect on the decrease in cell viability in HG and induced by phorbol ester (PMA), a PKC stimulant. In addition, it was studied NF- $\kappa$ B activity induced by PMA in cervical cancer cells (HeLa). Our results show that RT protected Vero cells from glucotoxicity, since under normal glucose conditions, PMA discreetly decreased RT basal viability; however, in a high glucose environment RT reversed glucotoxicity in a concentration dependent manner. PMA reduced cell viability by itself and completely blocked the protective effect of RT at cytotoxic levels similar to HG alone. PMA increased NF- $\kappa$ B activity in HeLa cells and RT significantly reduced this effect. These findings indicate that RT exerts a protective effect on diabetes kidney damage through a mechanism that involves PKC-NF- $\kappa$ B signaling pathway. Our findings contribute both to the validation of RT traditional use and to the pharmacological characterization of its genus, thus laying the foundations for the phytochemical and technological study of this potential phytopharmaceutical.

**Key words:** *Ruellia tuberosa* L., Protein Kinase C, HeLa Cells, Vero Cells, phorbol ester.

## Introducción

La diabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia que resulta de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o en ambas (American Diabetes Association, 2018). 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. La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones vasculares más importantes y la mayor causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (USRDS Annual Data Report, 2014).

La excesiva concentración de glucosa intracelular puede dirigirse a varias rutas metabólicas que favorecen la nefropatía. Los productos de glicosilación avanzada (AGEs) son uno 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 glomeruloesclerosis, la fibrosis intersticial y la atrofia tubular (Brownlee, 1995; Forbes y col., 2003). Los AGEs pueden actuar sobre sus receptores de membrana (RAGE) y activar las vías dependientes de la proteína kinasa C (PKC), las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y las especies reactivas de oxígeno (EROs), conduciendo a la activación de algunos factores de transcripción, dentro de las cuales se destaca el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), el cual es considerado como el factor de transcripción más importante en la patogénesis de la nefropatía diabética (Wada y Makino, 2013). El NF- $\kappa$ B incrementa la expresión de algunos mediadores profibróticos como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), conduciendo al

aumento de la expresión de las proteínas de la matriz extracelular (Sharma y col., 1995; Scivittaro y col., 2000; Ha y col., 2002a, b; Forbes y col., 2003; Mezzano y col., 2004; Bohlender y col., 2005; Kanwar y col., 2005; Yan y col., 2007). Este incremento de la matriz extracelular, bajo la condición de hiperglicemia crónica, es considerado el cambio fenotípico fundamental de las células renales ligada a la fibrosis, a la pérdida de la función y a los cambios estructurales renales que establecen la nefropatía (Simonson, 2007). El NF- $\kappa$ B subyace en los procesos inflamatorios y es un importante vínculo entre la diabetes y la inflamación. La inhibición de la activación del NF- $\kappa$ B disminuye la infiltración de macrófagos en el tejido renal, contribuyendo con el efecto nefroprotector de una variedad de fármacos, entre los que destacan los antagonistas del receptor AT1 de la angiotensina II, neuropéptido íntimamente relacionado con la activación de NF- $\kappa$ B, la inflamación y el daño renal en la diabetes (Hattori y col., 2000; Esteban y col., 2003; Patel y Santani, 2009; Pandey y col., 2015).

La activación de la PKC la realiza principalmente el diacilglicerol (DAG), proveniente del metabolismo del gliceraldehído-3-fosfato (glucólisis) 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 Murray-Rust, 2004). La actividad de la PKC esta aumentada en el glomérulo de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) (Craven y DeRubertis, 1989), estando la mayoría de sus isoformas involucradas en el daño renal (Whiteside y Dlugosz, 2002). La PKC- $\alpha$  y la PKC- $\beta$  han mostrado ser mediadoras del daño renal en varios

modelos experimentales de diabetes (Koya y col., 1997; Koya y col., 2000). Kumar y colaboradores (2001) demostraron que en células mesangiales cultivadas bajo un ambiente glucotóxico, existe una relación entre la isoforma PKC- $\beta$  y la activación de la NF- $\kappa$ B. En la actualidad se ha establecido la vía PKC-NF- $\kappa$ B como un mecanismo importante en el daño tisular en la diabetes, incluyendo el daño renal (Min y col., 2009; Yang y col., 2013; Jiang y col., 2015; Shukla y col., 2018). Asimismo, la activación de la vía DAG-PKC-MAPK 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- $\beta$  y de los componentes de la matriz extracelular, así como también por la disminución de la actividad de la Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPasa (Koya y col., 1997; Haneda y col., 2001; Ohshiro y col., 2006).

En los últimos años se han hecho grandes esfuerzos en 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 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 Makheswari y Sudarsanam, 2011; Khan y col., 2012; Hung y col., 2012).

La capacidad antioxidante de una planta y su actividad antidiabética se encuentran íntimamente relacionadas (Rahimi y col., 2005). Una de las plantas con gran potencial antioxidante que se encuentra en Venezuela es *Ruellia tuberosa* L., (yuquilla), la cual pertenece

a la familia Acanthaceae (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011a, b; Kensa y Neelamegam, 2012a, b). Esta planta 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). Las partes aéreas de *R. tuberosa* han mostrado actividad antioxidante, anti-inflamatoria, antidiabética, antinociceptiva y nefroprotectora (Chen y col., 2006; Ashraful y col., 2009; Manikandan y Arokia, 2010; Chothani y col., 2010; 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.

Nuestro grupo de investigación estableció el potencial anti-inflamatorio y antinociceptivo del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) en modelos animales (Pastorello y col., 2012). Los estudios sobre la actividad antioxidante de las partes aéreas o la planta entera, han revelado un potencial efecto captador 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., 2011b; Kensa y Neelamegam, 2012a, b). Todas estas especies reactivas son mediadores muy importantes del daño renal en la diabetes (Stanton, 2011). En este sentido, demostramos el efecto antidiabético agudo y crónico, así como el efecto protector sobre el daño renal en la diabetes experimental de RT, en donde la capacidad antioxidante del extracto y la disminución del estrés oxidativo renal fueron parte del mecanismo de nefroprotección en los animales con diabetes inducida por la ETZ

(Ciangherotti y col., 2013, 2016). Bajo esta premisa, en este trabajo se evaluó la relación de la actividad protectora renal de RT con su potencial inhibición de la vía de señalización de la PKC-NF- $\kappa$ B. Para ello, se estudió el papel de la PKC en el aumento del estrés oxidativo, estudiando la modulación del efecto protector de RT sobre la disminución de la viabilidad celular en un ambiente de alta glucosa (HG) en células Vero *in vitro*, antes y después de la acción del éster de forbol (PMA), un estimulante de la PKC. Igualmente se estudió el efecto de RT sobre la actividad del NF- $\kappa$ B inducida por el PMA, en un modelo de células de cáncer de cuello uterino (HeLa) *in vitro*, como una aproximación para el entendimiento de las acciones de esta planta sobre este importante factor transcripción involucrado en la nefropatía diabética. Esto permitirá por un lado, contribuir con la caracterización farmacológica y con la validación del uso tradicional de esta especie perteneciente a la valiosa biodiversidad nacional, y por otro a contribuir con el desarrollo de un potencial fitofármaco para el tratamiento y la prevención de las complicaciones de la diabetes.

## Materiales y métodos

### 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. El ejemplar testigo fue depositado en el Herbario "Victor Manuel Ovalles" (MYF) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela bajo el código MYF 26390.

## 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. Una vez filtrado, el extracto fue liofilizado y mantenido bajo protección de la humedad.

## LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR

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", Caracas-Venezuela. Esta línea celular es susceptible al daño oxidativo inducido por la exposición a alta concentración de glucosa (Kannan y Jain, 1994). Las células de carcinoma de cuello uterino (HeLa) transfectadas con el gen reportero de la luciferasa controlado por el promotor de IL-6 con sitio de unión para NF-κB, fueron facilitadas por el Dr. Gustavo Benaim del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) Caracas-Venezuela.

Las células se cultivaron hasta confluencia en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C en medio completo que contiene: DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco), 10% de suero fetal de bovino y 1% de penicilina/estreptomycin. Luego se lavaron 2 veces con PBS (buffer salino-fosfato) y se lisaron con tripsina 0,025 M en EDTA (ácido etilen-diamino-tetracético) 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.

## 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.

Para ello se incubaron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con medio completo (5% CO<sub>2</sub> a 37°C), bajo un ambiente de 8 mM de glucosa (glucosa normal) durante 24 horas. El medio fue removido y reemplazado por medio completo fresco con el siguiente esquema de tratamientos: pozos controles (NG), 8 mM de glucosa; pozos alta glucosa (HG), 35 mM de glucosa; pozos RT (concentraciones crecientes) y pozos alta glucosa + RT. Bajo estas condiciones las células se cultivaron (5% CO<sub>2</sub> 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 fresco. Se preparó una solución de MTT (2,5 mg/mL) y se añadió 100 µL de ésta a cada pozo de la placa. Las placas fueron incubadas durante 3h (5% de CO<sub>2</sub> a 37°C). Posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada pozo y la monocapa fue disuelta con la incorporación de 100 µL de DMSO. La placa se dejó reposar por 30 minutos para que se desarrollara el color y luego se determinó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de placa (BioRad, modelo Berchmark). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad con respecto al control.

## 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 RT. Las células fueron tripsinizadas y contabilizadas por grupo a las 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento. Los resultados se expresaron como células/mL.

EFECTO DE RT SOBRE LA ACTIVIDAD DEL NF- $\kappa$ B EN CÉLULAS HeLa

Para evaluar el efecto de RT sobre la actividad del factor de transcripción NF- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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

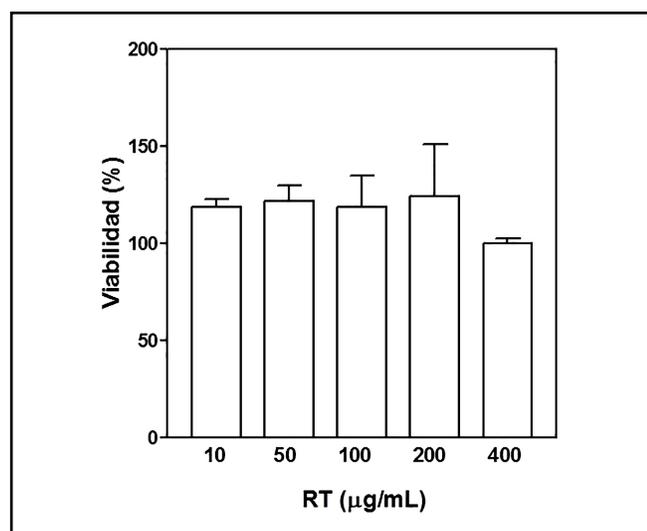


Figura 1. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) sobre la viabilidad de las células Vero en cultivo. n=7 por grupo.

de luz. El PMA se utilizó como inductor de la actividad del NF- $\kappa$ 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, se removió el medio y las células se trataron según los diferentes protocolos, 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 rpm durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se agregó 20 µL de la muestra a cada pozo de una placa opaca y se midió la luminiscencia a una sensibilidad de 255, después de agregar 50 µL del sustrato de luciferasa.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

**Resultados**

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

## EFECTO DE RT SOBRE LA VIABILIDAD Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para la validación del modelo y para establecer la concentración de RT a emplearse en todos los experimentos *in vitro*, se evaluó el efecto de RT sobre la viabilidad de las células Vero

en cultivo mediante la prueba del MTT. En la **figura 1** se puede observar que ninguna de las concentraciones de RT evaluadas (10-400  $\mu\text{g/mL}$ ) produjo modificación de la viabilidad celular. 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  $\mu\text{g/mL}$  de RT (**figura 2**), por lo que queda establecido que este extracto inhibe el efecto glucotóxico sobre las células renales *in vitro* en las condiciones experimentales utilizadas. La reducción de la muerte celular inducida por el extracto de RT (efecto protector) resultó ser un efecto dependiente de la concentración del extracto (**figura 3**). 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

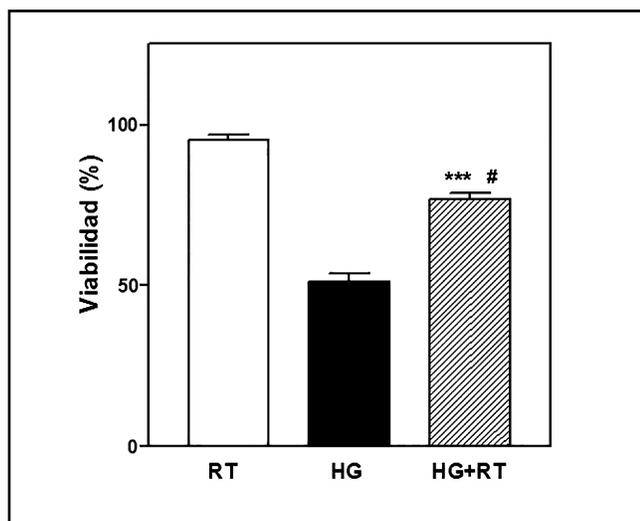


Figura 2. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50  $\mu\text{g/mL}$ ) sobre la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al grupo RT. # $p < 0,001$  con respecto al grupo HG.  $n = 13-20$ .

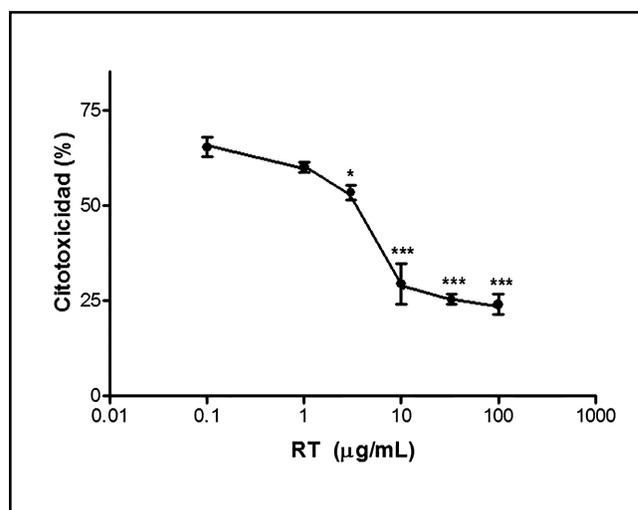


Figura 3. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la citotoxicidad inducida por la glucosa en células Vero. Los valores se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. \* $p < 0,005$  y \*\*\* $p < 0,001$  con respecto al grupo HG.  $n = 5$  por grupo.

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 RT, mejorando de esta manera la tasa de crecimiento. Por sí mismo, el extracto de 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 4**).

#### EFFECTO DE RT SOBRE LA SEÑALIZACIÓN DE LA PKC

Se evaluó el papel de la señalización de la PKC en el aumento del estrés oxidativo. En la **figura 5** se observa la modulación del efecto protector de RT sobre la disminución de la viabilidad celular en HG, por acción de un estimulante de la PKC: el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). En condiciones de glucosa normal, el PMA disminuyó discretamente ( $p < 0,05$ ) la viabilidad basal del extracto de RT. Sin embargo, en ambiente de alta glucosa,

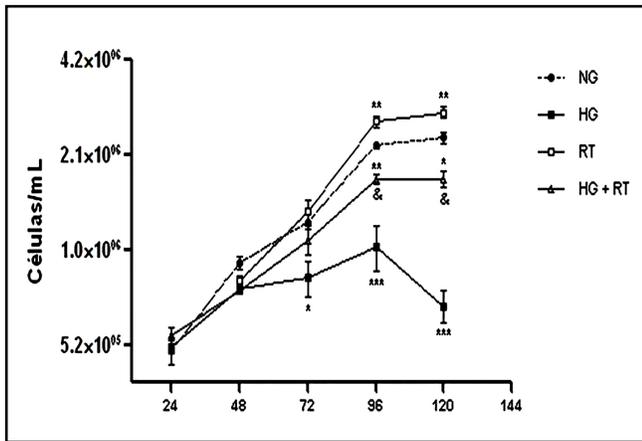


Figura 4. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50  $\mu$ g/mL) sobre la proliferación de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. \* $p$ <0,005, \*\* $p$ <0,01 y \*\*\* $p$ <0,001 con respecto al grupo NG.

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.

Para evaluar si los efectos del PMA sobre la acción de RT en el modelo de glucotoxicidad renal *in vitro* se relacionan con el efecto inhibitor de RT sobre la expresión del NF- $\kappa$ B, se estudió el efecto del extracto de RT sobre la actividad de NF- $\kappa$ B en células HeLa, estimuladas o no con PMA (figura 6). Como se observa, el PMA incrementó la actividad del NF- $\kappa$ B, y RT redujo significativamente este efecto del PMA sobre la actividad del NF- $\kappa$ 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 oxidativo y el daño renal en la diabetes.

## Discusión

La ND es una de las más graves complicaciones de la diabetes y la causa más común de insuficiencia renal

en etapa terminal. Esta complicación se caracteriza por hiperfiltración glomerular, hipertrofia del epitelio glomerular y tubular, aumento de la excreción urinaria de albúmina, aumento del grosor de la membrana basal y expansión mesangial con la acumulación de proteínas de la matriz extracelular en las células mesangiales (ECM) (Kanwar y col., 2008; Zelmanovitz y col., 2009). Se sabe que la activación de varias isoformas de la PKC dentro de células durante diabetes mellitus tipo 2 resulta en varios cambios fisiopatológicos (Riser y col., 2000). La mayoría de los hallazgos experimentales en modelos de diabetes han establecido que la PKC- $\alpha$  se encuentra principalmente involucrada en la excreción urinaria de albumina mediado por el incremento de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de las EROs; mientras que la PKC- $\beta$  está involucrada en la expansión de la ECM y en la hipertrofia

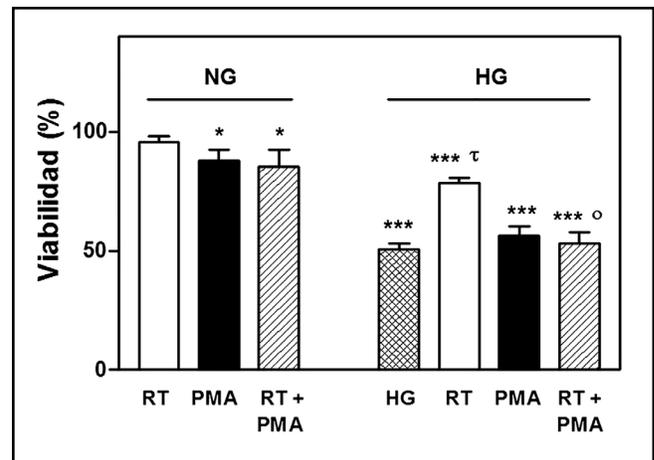


Figura 5. Efecto de la inducción de la PKC por el 12-miristato-13 acetato de forbol (PMA, 10 nM) sobre la respuesta protectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50  $\mu$ g/mL) frente a disminución de la viabilidad de las células Vero cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa por 96 h (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. \* $p$ <0,05 y \*\*\* $p$ <0,001 con respecto al grupo RT.  $\tau$  $p$ <0,001 con respecto al control HG.  $\circ$  $p$ <0,01 con respecto al grupo RT en HG. n=8-16.

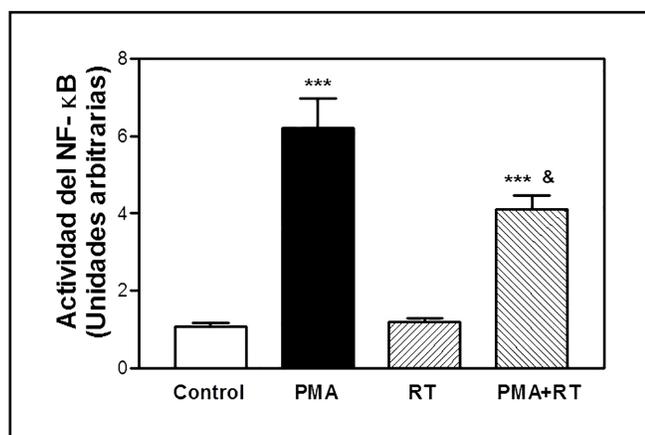


Figura 6. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50  $\mu$ g/mL) sobre la actividad del factor NF- $\kappa$ B, basal y estimulada por el PMA (10 nM) en células de cáncer de cuello uterino (HeLa) transfectadas con el gen reportero luciferasa. Los valores se muestran como la media  $\pm$  E.E.M. \*\*\* $p$ <0,001 con respecto a su grupo basal. & $p$ <0,05 con respecto al grupo PMA.  $n$ =4.

renal mediada por el TGF- $\beta$ 1 y el factor de crecimiento conectivo (CTGF) (Kang y col., 1999; Thallas-Bonke y col., 2008; Meier y col., 2009; Geraldés y King, 2010; Koya, 2014). Adicionalmente, la PKC- $\delta$  también ha mostrado participar en el daño renal, principalmente por la inducción de la apoptosis de las células del epitelio tubular, lo cual ha sido relacionado con la albuminuria y con el incremento de la actividad del NF- $\kappa$ B (Li y col., 2010; Koya, 2014). Muchos de los procesos y desregulaciones vasculares y celulares anormales se le atribuyen a la activación de varias de las isoformas de PKC, entre ellos: la disfunción endotelial, la permeabilidad vascular, angiogénesis, apoptosis, los cambios en la dilatación del vaso, el engrosamiento de la membrana basal y la expansión de la ECM, las alteraciones de actividades enzimáticas y alteraciones en varias proteínas de transcripción (Nelson y col., 2008; Geraldés y King, 2010). Por su parte, bajo condiciones de estrés oxidativo, la PKC activa la expresión de NF- $\kappa$ B (Liu y col., 2009).

Bajo un ambiente prolongado de alta concentración de glucosa las células tanto del epitelio tubular como las mesangiales sufren inhibición de la proliferación y apoptosis asociada a un incremento de la formación de las EROs (Ha y col., 2002a,b; Allen y col., 2003; Verzola y col., 2004, Samikkannu y col., 2006; Khera y col., 2006; Park y col., 2007). Kannan y Jain (1994) demostraron que concentraciones de glucosa entre 20 y 100 mM causan una reducción de alrededor del 50% de la viabilidad de las células Vero 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  $50,94 \pm 2,48\%$ , siendo este efecto inhibido significativamente por RT, de manera dependiente de la concentración (**figuras 2 y 3**). Estos resultados se confirman por los obtenidos en el ensayo de proliferación celular a través de un método de exclusión, en el cual se muestra por un lado, un efecto pro-proliferativo de RT en condiciones basales y por otro, un bloqueo parcial de la disminución del número de células inducida por el ambiente glucotóxico (**figura 4**). Todos estos resultados sugieren un efecto protector del extracto sobre el daño renal inducido por la alta glucosa *in vitro*.

El efecto protector de RT sobre la glucotoxicidad puede estar relacionado a la actividad antioxidante del extracto. Nosotros demostramos que RT es capaz de captar al  $O_2^{\cdot-}$  producido por el sistema xantina-xantina oxidasa *in vitro* (Ciangherotti y col., 2013). Esta

especie reactiva es fundamental en el establecimiento del estrés oxidativo (Radi, 2018). La actividad antioxidante de RT había sido establecida previamente por varios autores, pero en las partes aéreas de la planta (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011b; Kensa y Neelamegam, 2012a,b). A partir de esta planta se han aislado varios metabolitos secundarios antioxidantes, entre los que destaca la apigenina y varios de sus glicósidos (Behari y col., 1981; Nabil-Samy y col., 2015). Aunque es poco lo que se conoce sobre los constituyentes químicos de la raíz de la planta, es posible que la presencia de este tipo de compuestos fenólicos sea responsable de su actividad antioxidante. Los compuestos polifenólicos, no solo se caracterizan por captar varios tipos de radicales y especies reactivas, sino también por inhibir la activación de moléculas tales como: las MAPK, el NF- $\kappa$ B, el TGF- $\beta$ , entre otros (Han y col., 2007; Santangelo y col., 2007). Es por ello, que se ha sugerido que los antioxidantes podrían prevenir las complicaciones de la diabetes y resulta plausible la evaluación de RT como posible arma farmacológica de origen natural para el tratamiento y/o la prevención de la nefropatía asociada a la DM. De manera interesante, varios compuestos antioxidantes entre los que destacan el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (trolox) y la N-acetil-cisteína (NAC), son capaces de inhibir el incremento de la actividad del NF- $\kappa$ B inducido por HG en las células mesangiales, lo que sugiere que la señalización de este factor es dependiente de EROs (Ha y col., 2002a,b). Todos estos hallazgos establecen la importancia de la ruta HG-EROS-NF- $\kappa$ B en el daño renal en la diabetes.

Sin lugar a dudas, entre los mecanismos más importantes del daño endotelial y renal inducido por la hiperglicemia se

encuentran la producción de las EROs y la disminución de los mecanismos de defensa antioxidante (Nishikawa y col., 2000; Brownlee, 2001; Miranda-Diaz y col., 2016). Las EROs, junto a los AGEs y el DAG son los principales activadores (directos o indirectos) de las isoformas de la PKC en hiperglicemia (Geraldés y King, 2010). De hecho, está bien establecido el incremento de la vía de señalización DAG/PKC/MAPK/NF- $\kappa$ B en condiciones de alta concentración de glucosa (Koya y col., 1997; Haneda y col., 2001; Ohshiro y col., 2006). A través de estas señales, conjuntamente orquestadas con otras rutas metabólicas, tales como: las de los polioles, las hexosaminas y el mioinositol, ocurren los cambios nucleares que favorecen la expresión de factores profibróticos, pro-inflamatorios y, en algunos casos, pro-apoptóticos que conducen al daño tubular, al ensanchamiento del mesangio, a la fibrosis glomerular y a la proteinuria, entre otros (Steffes y col., 1984; Dalla-Vestra y col., 2001; Liu, 2004; Simonson, 2007).

La activación de la PKC por ésteres de forból como el PMA favorece la activación de las MAPKs, del TGF- $\beta$  y del NF- $\kappa$ B (Craven y col., 1990; Haneda y col., 2001; Idris y col., 2001; Parker y Murray-Rust, 2004; Holden y col., 2008). La actividad de las PKC se han visto aumentada 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). El aumento de la activación de la isoforma PKC- $\delta$  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 mesangiales cultivadas en HG (Baccora y col., 2007). En general, la estimulación selectiva de las PKCs en HG cursa hacia al incremento del volumen celular de algunos subtipos celulares tales como las células mesangiales y hacia la apoptosis en otros tipos celulares tal como las células epiteliales. En este sentido, nuestros resultados reflejan que el PMA a concentraciones de 10 nM produce un efecto citotóxico leve sobre las células Vero tratadas durante 96 horas (**figura 5**). A pesar que en HG está establecido el incremento de la señalización de la PKC, la estimulación de la PKC de manera adicional con PMA no modificó el efecto de la HG sobre estas células. Esto podría ser atribuido a una posible disminución de la señal del NF- $\kappa$ B, lo cual ha sido reportado en células de epitelio de colon sometidas a una activación sostenida de la PKC (Park y col., 2007). Aunque RT fue efectiva en disminuir la citotoxicidad inducida por la HG, no fue efectiva en revertir el leve efecto tóxico del PMA sobre las células de epitelio. Aún más, en condiciones de HG la estimulación de la PKC bloqueó el efecto de RT sobre la viabilidad celular. Esto sugiere que la activación de la vía de la PKC tiene un efecto contraregulatorio a la acción protectora del extracto de RT. El efecto diferencial de RT en las diferentes condiciones experimentales refleja 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: la NAC, 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).

Un posible blanco de acción de RT se enfoca en la vía de señalización del NF- $\kappa$ B. Esta idea es consistente con la evidencia que señala a RT como un potente anti-inflamatorio 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- $\kappa$ B (Huang y col., 2012; Wang y col., 2012). Como se ha mencionado, existe una asociación entre la activación de la PKC con la expresión de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción ubicuo, que se activa en respuesta al estrés oxidativo. 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 $\kappa$ -B $\alpha$  (proteína inhibidora específica del NF- $\kappa$ B) inducida por la activación de la PKC y subsiguiente formación de las EROs. Igualmente, Kumar y colaboradores (2001) en células mesangiales cultivadas en un medio de alta glucosa muestran un incremento de la actividad de la PKC- $\beta$ 1 inducida por PMA, la cual se asoció con la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B p65. El hecho que la inhibición o la depleción de la PKC es capaz de suprimir significativamente la generación de ROS inducida por HG, así como la activación de NF- $\kappa$ B *in vitro* (Ha y col., 2002b), indica claramente que la PKC juega un papel en la activación de NF- $\kappa$ B en células renales bajo HG.

La línea celular estable HeLa, con reportero NF- $\kappa$ B/luciferasa, es

considerada una herramienta para la evaluación de efectores que modulan la vía de señalización del NF- $\kappa$ B (Lai y col., 2006). Una aproximación interesante a la participación del NF- $\kappa$ B en las acciones de RT se logró mediante el empleo del sistema NF- $\kappa$ B/luciferasa en cultivo de HeLa, a través del cual se demostró que el PMA incrementó significativamente la actividad de NF- $\kappa$ B, lo que evidencia el control de la PKC sobre el NF- $\kappa$ B en este modelo experimental. Lo interesante fue que el tratamiento con RT revirtió significativamente el incremento de la actividad de NF- $\kappa$ B inducido por PMA, llegando a niveles control. Estos hallazgos guardan relación con el efecto inhibitorio sobre la actividad del NF- $\kappa$ B que tienen algunos antioxidantes, tales como: los polifenoles de la uva y el ácido lipóico en células del epitelio renal cultivadas bajo alta concentración de glucosa (Fujii y col., 2006; Kim y col., 2009, 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). El tratamiento con (-)-epigallocatequina-3-galato, un conocido compuesto fenólico con propiedades antioxidantes, es capaz de bloquear el incremento la translocación del NF- $\kappa$ B del citoplasma al núcleo y el incremento de la fosforilación de I $\kappa$ B- $\alpha$  inducido por HG en células HUVECs (Yang y col., 2013). Jiang y colaboradores (2015) mostraron que antioxidantes como la proantocianidinas de la semilla de uva, inhiben el incremento de la expresión de NF- $\kappa$ B y de PKC inducido por la glucosa en el mismo modelo de células HUVECs cultivadas. Todos estos resultados junto a nuestros hallazgos apoyan la idea que establece que los productos o compuestos químicos con características antioxidantes, pueden disminuir la vía EROs-PKC-NF- $\kappa$ B y que esto puede ser el

mecanismo por el cual los antioxidantes ejercen sus efectos protectores sobre las complicaciones en la diabetes.

En conjunto, es probable que RT, a través de su capacidad de disminuir el estrés oxidativo, proteja al riñón del daño glucotóxico al inhibir el aumento de la actividad del NF- $\kappa$ B en la diabetes. Este trabajo contribuye al entendimiento del efecto antidiabético y protector del daño renal en la diabetes de *Ruellia tuberosa*, así como también al desarrollo 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 bibliográficas

- 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.
- American Diabetes Association. 2018. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. Diabetes Care 41(Suppl 1): S13–S27.
- Arirudran A, Saraswathy M, Vijayalakshmi K. 2011a. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using in-vitro model. J Pharmacy Res 4(12): 4344–4347.
- Arirudran A, Saraswathy M, Vijayalakshmi K. 2011b. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using in-vitro model. J Pharmacy Res 4(12): 4344–4347.
- Ashraf A, Subhan N, Sarder M, Nahar L, Sarker S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Ruellia*. Pharmaceutic Biol 47(3): 209–214.
- Baccora MH, Cortes P, Hassett C, Taube DW, Yee J. 2007. Effects of long-term

- elevated glucose on collagen formation by mesangial cells. *Kidney Int* 72(10): 1216–1225.
- Baynes K. Introduction to Diabetes Mellitus. In: Traditional herbal medicine for modern times, antidiabetic plants. Amala Soumayanath (Ed.). CRC Press Taylor & Francis Group: USA, 2006. pp. 2–99.
- Behari M, Goyal M y Streibl M. 1981. Natural products from *Ruellia tuberosa* L. *J Indian Chem Soc* LVIII: 176–177.
- Bohlender J, Franke S, Stein G, Wolf G. 2005. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 289: F645–F659.
- Brownlee M. 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46: 223–234.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414(6865): 813–820.
- 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- $\kappa$ B activities. *Carcinogenesis* 32(8): 1198–1206.
- Chiu J, Khan ZA, Farhangkhoe H, Chakrabarti S. 2009. Curcumin prevents diabetes-associated abnormalities in the kidneys by inhibiting p300 and nuclear factor- $\kappa$ B. *Nutrition* 25(9): 964–972.
- 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>.
- Ciangherotti C, Cegarra J, Usubillaga A, Rodríguez M, Bermúdez J, Mata R, Israel A. 2016. Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicémica aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas normales y con diabetes experimental. *Rev Fac Far UCV* 79 (1-2): 36–44.
- Ciangherotti C, Maldonado AM, Orsini G, Perdomo L, Álvarez M, Salazar-Bookaman MM, Israel A. 2013. Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental. *Arch Ven Farmacol Terap* 32(4): 57–66.
- 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 Cien Ven* 58(Sup 1): 252.
- 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. 1989. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest* 83: 1667–1675.
- 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.
- 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.
- Esteban V, Ruperez M, Vita JR, López ES, Mezzano S, Plaza JJ, Egido J, Ruiz-Ortega M. 2003. Effect of simultaneous blockade of AT1 and AT2 receptors on the NF $\kappa$ B pathway and renal inflammatory response. *Kidney Int Suppl* (86): S33–S38.
- 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.
- 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): 2104–2111.
- Geraldes P, King GL. 2010. Activation of protein kinase c isoforms and its impact

- on diabetic complications. *Circulation Res* 106: 1319–1331.
- 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 ULA* 45(1): 69–76.
- Giraldo D, Baquero E, Bermúdez A, Oliveira M. 2009. Caracterización del comercio de plantas medicinales en los mercados populares de Caracas-Venezuela. *Acta Bot Venez* 32(2): 267–301
- Ha H, Yang Y, Lee H. 2002a. 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. 2002b. 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.
- Han X, Shen T, Lou H. 2007. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *Int J Mol Sci* 8: 950–988.
- 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* 38S178–38S181.
- Hattori Y, Hattori S, Sato N, Kasai K. 2000. Interactions between angiotensin II and NF-B-dependent pathways in modulating macrophage infiltration in experimental diabetic nephropathy High-glucose-induced nuclear factor kappaB activation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 46(1): 188–197.
- Holden NS, Squires PE, Kaur M, Bland R, Jones CE, Newton R. 2008. Phorbol ester-stimulated NF-kappaB-dependent transcription: roles for isoforms of novel protein kinase C. *Cell Signal* 20(7): 1338–1348.
- 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.
- 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.
- 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): 1939–1945.
- Jiang Y, Li Y, Ding Y, Dai X, Ma X, Bao L, Zhang Z, Li Y. 2015. Grape seed proanthocyanidin extracts prevent high glucose-induced endothelia dysfunction via PKC and NF-κB inhibition. *Biosci Biotechnol Biochem* 79(9): 1493–1503.
- Jung M, Park M, Lee HC, Kang YH, Kang ES, Kim SK. 2006. Antidiabetic agents from medicinal plants. *Curr Med Chem* 13(10): 1203–1218.
- Kang N, Alexander G, Park JK, Maasch C, Buchwalow I, Luft FC, Haller H. 1999. Differential expression of protein kinase C isoforms in streptozotocin-induced diabetic rats. *Kidney Int* 56(5): 1737–1750.
- Kannan K, Jain SK. 1994. Effect of high glucose on cellular proliferation and lipid peroxidation in cultured Vero cells. *Horm Metab Res* 26(7): 322–325.
- 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.
- Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S, Danesh FR. 2008. Diabetic nephropathy: Mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med* 233: 4–11.
- Kensa M, Neelamegam A. 2012a. Comparison of free radical scavenging activities in the extracts of *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Archives* 12(1): 69–74.

- Kensa M, Neelamegam R. 2012b. Analysis of antioxidants in *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Archives* 12(1): 125–128.
- 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): 566–577.
- 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): 414–420.
- 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): 106–111.
- Koya D, Haneda M, Nakagawa H, Isshiki K, Sato H, Maeda S, Sugimoto T, Yasuda H, Kashiwagi A, Wada 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-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 100: 115–126.
- Koya D. 2014. Dual protein kinase C alpha and beta inhibitors and diabetic kidney disease: a revisited therapeutic target for future clinical trials. *J Diabetes Investig* 5(2): 147–148.
- Kuhad A, Chopra K. 2009. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NFkB signaling pathway. *Life Sci* 84(9-10): 296–301.
- Kumar A, Hawkins K, Hannan M, Ganz M. 2001. Activation of PKC-β1 in glomerular mesangial cells is associated with specific NF-κB subunit translocation. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F613–F619.
- Lai C, Jiang X, Li X. 2006. Development of luciferase reporter-based cell assays. *Assay Drug Dev Technol* 4(3): 307–315.
- 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): 1115–1124.
- Liu H, Yang H, Wang D, Liu Y, Liu X. 2009. Insulin regulates P- glycoprotein in rat brain microvessel endothelial cells via an insulin receptor-mediated PKC/NF-κB pathway but not a PI3K/Akt pathway. *Eur J Pharmacol* 602: 277–282.
- Liu Y. 2004. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 15: 1–12.
- Manikandan A, Arokia V. 2010. Effect of 50% Hydroethanolic leaf extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) Ness 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.
- 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): 155–165.
- Meier M, Menne J, Haller H. 2009. Targeting the protein kinase C family in the diabetic kidney: lessons from analysis of mutant mice. *Diabetologia* 52(5): 765–775.
- 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): 2505–2512.
- Min W, Bin ZW, Quan ZB, Hui ZJ, Sheng FG. 2009. The signal transduction pathway of PKC/NF-kappa B/c-fos may be involved in the influence of high glucose on

- the cardiomyocytes of neonatal rats. *Cardiovasc Diabetol* 8: 8.
- Miranda-Díaz AG, Pazarín-Villaseñor L, Yanowsky-Escatell FG, Andrade-Sierra J. 2016. Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease. *J Diabetes Res* 7047238.
- Mong MC, Yin MC. 2012. Nuclear factor  $\kappa$ B-dependent anti-inflammatory effects of s-allyl cysteine and s-propyl cysteine in kidney of diabetic mice. *J Agric Food Chem* 60(12): 3158–165.
- Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55–63.
- Nabil-Samy M, Sugimoto S, Matsunami K, Otsuka H, Md. Kamel S. 2015. Chemical Constituents and Biological Activities of Genus *Ruellia*. *Int J Pharmacognosy* 2(6): 270–279.
- Nelson TJ, Sun MK, Hongpaisan J, Alkon DL. 2008. Insulin, PKC signaling pathways and synaptic remodeling during memory storage and neuronal repair. *Eur J Pharmacol* 585: 76–87.
- Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M. 2000. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int Suppl* 77: S26–S30.
- Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont AC, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern TS, King GL. 2006. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase C beta-null mice. *Diabetes* 55(11): 3112–3120.
- Pandey A, Goru SK, Kadakol A, Malek V, Gaikwad AB. 2015. Differential regulation of angiotensin converting enzyme 2 and nuclear factor- $\kappa$ B by angiotensin II receptor subtypes in type 2 diabetic kidney. *Biochimie* 118: 71–81.
- 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- $\kappa$ B 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.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López J, Orsini G, Israel A. 2012. Actividad anti-inflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Far UCV* 75(2): 1–16.
- 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.
- 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): 2795–2804.
- Radi R. 2018. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(23): 5839–5848.
- 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): C119–226.
- 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): 365–373.
- Rajan M, Kishor V, Satheesh Kumar P, Reddy Swathi K, Sangam Haritha. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidaemic and hepatoprotective activity of methanolic extract of *Ruellia tuberosa* L. leaves in normal and alloxan induced diabetic rats. *J Chem Pharmaceutical Res* 4(6): 2860–2868.
- Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C. 2000. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 11(1): 25–38.
- 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.
- 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.
- 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–F683.
- Sharma K, Ziyadeh FN. 1995. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 44: 1139–1146.
- Shukla R, Banerjee S, Tripathi YB. 2018. *Pueraria tuberosa* extract inhibits iNOS and IL-6 through suppression of PKC- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B pathway in diabetes-induced nephropathy. *J Pharm Pharmacol* 70(8): 1102–1112.
- Simonson M. 2007. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic Nephropathy. *Kidney Int* 71: 846–854.
- Stanton RC. 2011. Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep* 11(4): 330–336.
- Steffes M, Osterby R, Chavers B, Mauer M. 1984. Mesangial expansion as a central mechanism for loss of kidney function in diabetic patients. *Diabetes* 38: 1077–1081.
- Studer RK, Craven PA, De Rubertis FR. 1997. Antioxidant inhibition of protein kinase C-signaled increases in transforming growth factor-beta in mesangial cells. *Metabolism* 46(8): 918–925.
- 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* 8(9): 801–807.
- Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM. 2008. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. *Diabetes* 57(2): 460–469.
- Uma Makheswari M, Sudarsanam D. 2011. Phytomedicine for Diabetes mellitus: An overview. *Res Pharmacy* 1(4): 28–37.
- USRDS annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States. 2014. United States Renal Data System. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD, 2014: 188–210.
- 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.
- Wada J, Makino H. 2013. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 24(3): 139–52.
- 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): 229–236.
- Whiteside C, Dlugosz J. 2002. Mesangial cell protein kinase C isozyme activation in diabetic milieu. *Am J Physiol Renal Physiol* 282: F975–F980.
- 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.
- 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, Han Y, Chen C, Sun H, He D, Guo J, Jiang B, Zhou L, Zeng C. 2013. EGCG attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammation by suppression of PKC and NF- $\kappa$ B signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci* 92(10): 589–597.
- Yang WS, Seo JW, Han NJ, Choi J, Lee KU, Ahn H, Lee SK, Park SK. 2008. High glucose-induced NF-kappaB activation occurs via tyrosine phosphorylation of IkappaBalpha

in human glomerular endothelial cells: involvement of Syk tyrosine kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(5): F1065–F1075.

Zelmanovitz T, Gerchman F, Balthazar APS, Thomazelli FCS, Matos JD, Canani LH. 2009. Diabetic nephropathy. *Diabetol Metab Syndr* 21: 1–10.

---

*Recibido: 28-08-2018*  
*Aceptado: 01-10-2018*