

# Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la activación de las ERK 1/2 renal de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina

Effects of the aqueous extract of *Ruellia tuberosa* L. root on renal ERK 1/2 activation in streptozotocin-induced diabetic rats

CARLOS CIANGHEROTTI<sup>1\*</sup>, MARIELLA PASTORELLO<sup>1\*\*</sup>, GIOVANNINA ORSINI<sup>2\*\*\*</sup>, LOURDES PERDOMO<sup>5</sup>, MARCO ÁLVAREZ<sup>5</sup> Y ANITA ISRAEL<sup>1\*\*\*\*</sup>

## Resumen

La nefropatía es una de las complicaciones más importantes de la diabetes, la cual puede conducir a la muerte. Las kinasas activadas por mitógenos (MAPK) son conocidos mediadores del daño renal en la diabetes, cuya activación (fosforilación) se encuentra asociada al aumento de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (colágeno, fibronectina, entre otras) y a la fibrosis renal. Recientemente, se ha establecido a la planta *Ruellia tuberosa* L. como antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética y nefroprotectora en varios modelos experimentales. En este trabajo se evaluó el efecto del tratamiento con 10 mg/kg/día, p.o, del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) durante cuatro semanas, sobre la fosforilación de la ERK 1/2 en la corteza renal de ratas control y con diabetes tipo I inducida por la estreptozotocina y se vinculó con los marcadores de la fibrosis renal tales como el aumento del peso del riñón, contenido de proteínas totales y de colágeno I. Los resultados demuestran que el tratamiento con RT previno el aumento de la fosforilación de las ERK 1/2, del peso del riñón, y del contenido de proteínas y de colágeno I renal por en la diabetes inducida por ETZ. Los hallazgos contribuyen a la elucidación de los mecanismos por los cuales *R. tuberosa* protege al riñón frente a la diabetes, estableciéndose así la actividad antifibrótica de esta especie utilizada en la medicina popular venezolana.

**Palabras clave:** *Ruellia tuberosa* L., kinasas activadas por mitógenos, fibrosis renal.

## Abstract

Nephropathy is one of the most important complications of diabetes, which can lead to death. Mitogen-activated kinases (MAPK) are known mediators of kidney damage in diabetes, whose activation (phosphorylation) is associated with increased synthesis of extracellular matrix proteins (collagen, fibronectin, among others) and kidney fibrosis. Recently, the *Ruellia tuberosa* L. plant has been characterized as antioxidant, anti-inflammatory, antidiabetic, and nephroprotective in several experimental models. In this work, we assessed the effect of treatment with 10 mg/kg/day, p.o., of the aqueous extract of *R. tuberosa* (RT) root for four weeks, on ERK 1/2 phosphorylation in the renal cortex of control rats and with type I diabetes induced by streptozotocin and was linked to markers of renal fibrosis such as increased kidney weight, total protein content, and collagen I. Results demonstrate that RT treatment prevented ETZ-induced diabetes increases of ERK 1/2 phosphorylation, kidney weight, protein content, and renal collagen I. Our findings contribute to the elucidation of the mechanisms by which *R. tuberosa* protects the kidney against diabetes, thus establishing the antifibrotic activity of this species used in Venezuelan folk medicine.

**Keywords:** *Ruellia tuberosa* L., Mitogen-activated kinases, renal fibrosis

1. Unidad de Neuropeptidos. 2. Herbario "Víctor Manuel Ovalles", Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. 3. Instituto Anatómico José Izquierdo, Universidad Central de Venezuela

Correspondencia: carlosciangherotti@yahoo.com, astern88@gmail.com.

ORCID: \*0000-0003-3760-8645 ; \*\*0000-0002-2805-3783 ; \*\*\*0000-0001-8932-9942 ; \*\*\*\*0000-0003-1812-0759

## Introducción

La nefropatía diabética (ND) es una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes, que afecta alrededor del 30% de los pacientes con diabetes tipo 1 y el 20% de los pacientes con diabetes tipo 2 (Molitch y col., 2004). También es la principal causa de insuficiencia renal terminal en todo el mundo, y representa más del 50% de los pacientes en terapia de reemplazo renal a nivel mundial (Eboh y Chowdhury, 2015). Se han identificado varios mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de ND. Efectivamente, en el riñón de los pacientes con ND se producen una variedad de alteraciones, bioquímicas, como el incremento de producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs), el incremento intracelular de los productos finales de glicación avanzada (AGE), el incremento de la expresión de los receptores AGE, la autooxidación de la glucosa, la activación de la vía del poliol (sorbitol aldosa reductasa) y la hiperactividad de la vía de la hexosamina (Wolff y col., 1991; Chung y col., 2003; Sifuentes-Franco y col., 2018). Igualmente, debido a la alteración metabólica inducida por hiperglicemia, se reduce la actividad de las enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD). Como consecuencia de la respuesta descontrolada frente al estrés oxidativo se produce, de forma directa o indirecta, daño e insuficiencia renal (Ha y Kim, 1999). Aún más, como respuesta continua frente al estrés oxidativo, se reduce la degradación de la matriz extracelular (MEC), lo que promueve que las células epiteliales tubulares se diferencien a miofibroblastos, lo que conduce a la fibrosis renal (Turgut y Bolton, 2010). Todos estos cambios inducidos por la hiperglicemia están relacionados a la activación de vías de

señalización selectas, entre las que destacan la del factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), las proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPKs, Ej.: las ERK), la angiotensina II (ANG II), la proteína kinasa C (PKC), el diacilglicerol (DAG), el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) y la janus kinasa (JAK) (Schrijvers y col., 2004; Kanwar y col., 2005; Jha y col., 2016). En las células mesangiales, se ha relacionado a la hiperglicemia y la producción no controlada de EROs con la activación de una variedad de vías de señalización, que incluyen la vía del NF- $\kappa$ B, las MAPK y la activación de isoformas de PKC. La activación de estas vías resulta en la prolífica secreción de factores inflamatorios, que también pueden promover la progresión de ND (Ha y Kim, 1999; Evans y col., 2002; Cheng y col., 2013).

Ahora bien, la proliferación de los fibroblastos, la expresión alterada y la sobre deposición de la matriz extracelular contribuyen a la fibrosis renal progresiva durante la diabetes. La sobreproducción de colágeno, como el principal contribuyente de la fibrosis renal, es regulada por varios factores fibrogénicos como TGF- $\beta$  y las metaloproteinasas de la matriz (MMP). El TGF- $\beta$  es la principal citoquina que impulsa fibrosis en el riñón y otros órganos susceptibles a lesiones fibróticas, como el pulmón y el hígado. El TGF- $\beta$  es una citoquina clave que participa en la patogenia de la fibrosis tubulointersticial, que media la síntesis de proteínas de la matriz extracelulares (MEC), como el colágeno de los tipos I, II y IV, y la fibronectina (FN). Los mecanismos involucrados en la señalización de TGF- $\beta$ , proporcionan un vínculo entre TGF- $\beta$  activado en la superficie celular y sus efectos aguas abajo, como la

producción de MEC en presencia de alta glucosa. Al respecto, Nerlich y Schleicher (1991) demostraron un incremento de la inmunoreactividad del colágeno IV y la fibronectina en la matriz mesangial de riñones de pacientes diabéticos en comparación con riñones de individuos sanos. Asimismo, Wahab y col. (1996) reportaron este mismo incremento, en células mesangiales humanas cultivadas bajo un ambiente de alta glucosa. El aumento de la expresión del colágeno IV inducido por glucosa ha sido también observado en los podocitos renales (Iglesias-de la Cruz y col., 2002), en células de epitelio tubular (Skill y col., 2004) y en células mesangiales (Baccora y col., 2007) a partir de modelos animales; así como también en riñones de ratas con diabetes inducida por ETZ (Kamalakkannan y col., 2006). Por otra parte, las células del epitelio tubular sufren inhibición de la proliferación y apoptosis bajo un ambiente prolongado de altas concentraciones de glucosa, esto acompañado de un incremento del estrés oxidativo (Park y col., 2001; Allen y col., 2003; Verzola y col., 2004).

Se ha demostrado que en la señalización de TGF- $\beta$  participan la vía de la MAPK, la cual consta de varias cascadas de fosforilación (Serger y Krebs, 1995). La familia MAPK está integrada por quinasas serina/treonina de tres subfamilias distintas, a saber, las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), quinasa N-terminal c-Jun (JNK) y MAPK p38 (Serger y Krebs, 1995; Borkemeyer y col., 1996). Al regular la activación del factor de transcripción, las MAPK juegan un papel central en diversas respuestas celulares, incluida la supervivencia, crecimiento, diferenciación y apoptosis (Geilen y col., 1996). Al respecto, se demostró que la ERK es crucial para

la proliferación y diferenciación celular, mientras que se cree que p38 MAPK y JNK median el estrés celular y la apoptosis. La inhibición de la proteína quinasa activada por mitógenos p38 mejora la fibrosis renal en pacientes con nefropatía obstructiva (Nishida y col., 2008). Estas quinasas pueden ser activadas por diversos estímulos extracelulares, incluidos factores de crecimiento y estresores ambientales, y desempeñan un papel esencial en la cascada de transducción de señales que conducen a alteraciones del crecimiento celular y otras funciones clave de la célula (Serger y Krebs, 1995; Borkemeyer y col., 1996). Los estudios han demostrado que, en condiciones de alta glucosa, las ERK se activan en los glomérulos y las células mesangiales (Haneda y col., 1997; Awazu y col., 1999), y se ha establecido una asociación entre esta activación de las ERK y la fibrosis renal (Feliars y Kasinath, 2011).

En la ruta de la búsqueda de nuevos compuestos químicos con actividad antidiabética o capaces de proteger o contrarrestar el daño renal inducido por las altas concentraciones de glucosa, se ha desarrollado 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; Makheswari y Sudarsanam, 2011; Khan y col., 2012; Hung y col., 2012).

Una de las plantas con gran potencial antioxidante es *Ruellia tuberosa* L. (Acanthaceae), conocida en Venezuela como escopetera, escopetilla o yuquilla (Ciangherotti y col., 2007). 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 (Gil y col., 2003; Ciangherotti y col., 2007; Giraldo y col., 2009). Asimismo, sus partes aéreas han mostrado actividad antioxidante, antiinflamatoria, antidiabética, antinociceptiva y nefroprotectora en varios modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* (Chen y col., 2006; Ashraful y col., 2009; Manikandan y Arokia, 2010a,b; Chothani y col., 2011; Rajan y col., 2012). Sin embargo, la raíz ha sido menos estudiada, a pesar de que esta parte de la planta es utilizada en la medicina tradicional venezolana. Se ha demostrado que extractos orgánicos de las hojas o partes aéreas de *R. tuberosa* L. producen un efecto hipoglicemiante en conejos y en ratas con diabetes inducida por el aloxano (Ullah y col., 2012; Rajan y col., 2012) y en ratas con diabetes tipo II inducida por la estreptozotocina (ETZ) combinada con la nicotinamida (Chothani y col., 2011, 2012). Igualmente, el extracto hidroalcohólico de las 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 plasmática (Manikandan y Arokia, 2010a).

La evaluación farmacológica del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT), permitió validar su uso tradicional como antiinflamatorio y antinociceptivo en modelos animales (Pastorello y col., 2012). Asimismo, se ha demostrado que este extracto produce un importante efecto protector sobre el daño renal inducido por la diabetes tanto *in vivo* como *in vitro* y con interesante efecto antihiper glucémico

crónico en ratas con diabetes inducida por la ETZ (Ciangherotti y col., 2013). Igualmente, al evaluar los efectos agudos sobre la glicemia en ratas diabéticas, se demostró que el RT produjo un efecto hipoglicemiante tanto en los animales controles como en las ratas con diabetes inducida por la ETZ, comparables con el hipoglicemiante oral de referencia, la glibenclamida (Ciangherotti y col., 2016). En forma similar investigadores de Sri Lanka, lograron validar el uso popular de RT para el tratamiento de la gastritis, utilizando un modelo de ratas con gastritis inducida por etanol (Arambewela y col., 2003). Entre los productos naturales aislados de las partes aéreas de *R. tuberosa* L. se encuentran: la apigenina y la apigenina-7- $\beta$ -D-glucurónido (Behari y col., 1981; Singh y col., 2002), los cuales han sido señalados como los responsables de la actividad antidiabética en otras especies vegetales (Esmaeili y col., 2009; Bansal y col., 2011). 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 (Arirudran y col., 2011a; Chothani y col., 2011, 2012). Los estudios sobre la actividad antioxidante de las partes aéreas o la planta entera de *R. tuberosa*, han revelado un potencial efecto atrapador de las especies reactivas de oxígeno (EROs) y de nitrógeno (ERNs), tales como: el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) y el óxido nítrico ( $ON^{\cdot}$ ) (Chen y col., 2006; Arirudran y col., 2011b; Kensa y col., 2012 a,b); sin embargo, estos estudios fueron realizados utilizando extractos orgánicos lo cual dista de contribuir de manera robusta con la validación de los usos etnomédicos de la especie; en este sentido, Ciangherotti y col. (2013) demostraron que el extracto acuoso

de la raíz de *R. tuberosa* es antioxidante por su capacidad de atrapar el  $O_2^-$ . Todas estas especies reactivas son mediadores muy importantes del daño renal en la diabetes (Stanton, 2011).

En vista de la evidencia, en el presente estudio se evaluó la posibilidad que extracto acuoso de *R. tuberosa* L. es capaz de proteger al riñón del daño fibrótico inducido por una condición diabética, así como también establecer el papel de la vía de señalización de las MAPK en dichos efectos. Para ello, se empleó un modelo experimental de diabetes inducido por la estreptozotocina.

Los resultados permitirán consolidar un nuevo y potencial fitofármaco, de utilidad para el tratamiento de los pacientes diabéticos, con o sin nefropatía. Además, 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.

## 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 del 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.

### 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.

### ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas macho de la cepa *Sprague-Dawley* con peso corporal comprendido entre 200 y 300 g, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas-Venezuela. Los animales se mantuvieron en jaulas con libre acceso a agua y alimento. Los experimentos fueron realizados siguiendo las buenas prácticas para el manejo de animales de laboratorio (NIH Guide, 1996) y la aprobación del Comité de Bioterio de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

### 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 que los niveles de glicemia eran  $\geq 250$  mg/dL. Para ello se utilizó un glucómetro comercial (Accu-Chek Active, Roche). En este momento los animales fueron considerados diabéticos (Verspohl, 2002).

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales fueron divididos en cuatro (4) grupos (n=4-5): 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. Al término de la cuarta semana, los animales fueron sacrificados por decapitación y los riñones fueron extraídos y pesados.

#### DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES EN LA CORTEZA RENAL

Las proteínas tisulares totales fueron determinadas por el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica de bovino como patrón. La absorbancia de las muestras se interpoló en una curva estándar de albúmina (0-100  $\mu$ g). Los resultados se expresaron como mg de proteína.

#### DETERMINACIÓN DE LAS ERK 1/2

La corteza renal fue homogenizada mediante sonicación, en solución amortiguadora de lisis pH 7,4 que contenía: Tris Base, EDTA, NaF,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , Tritón X-100 al 1%, pepstatina A, aprotinina, leupeptina y PMSF). El homogeneizado fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue procesado para la determinación de la ERK total y fosforilada por Western blot, en alícuotas de 100  $\mu$ g proteínas, diluidas en Buffer Laemmli. Las muestras en fueron separadas en geles de 10% SDS-poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo con leche descremada al 10%, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario, anti-fosfo-ERK y anti-ERK de conejos (Cell Signaling Technology), diluido en solución de albúmina sérica bovina al 3% en TBS-Tween (1:1000). Posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Cell Signaling

Technology) (1:10000), durante una hora. Las proteínas fueron visualizadas con un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate) y posteriormente cuantificadas mediante el análisis densitométrico (Quantity One 1-D<sup>®</sup>-BioRad Software).

#### 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  $\mu$ m de grosor y fueron teñidos con tricrómico 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.

#### 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

#### EFFECTO DE RT SOBRE EL DAÑO TITULAR INDUCIDO POR LA ETZ

En los animales diabéticos, se produce daño tisular fibrótico, el cual se expresa como aumento del peso del riñón, de la síntesis

de proteínas y del contenido de colágeno I de la corteza renal. 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, y parcialmente el incremento del contenido de proteínas totales de la corteza renal (Tabla I y Figura 1).

#### EFFECTO DE LA RT SOBRE LA FOSFORILACIÓN DE LA ERK

Como se observa en la Figura 2, la diabetes inducida con ETZ activó significativamente las ERK en la corteza renal de ratas, manifestada con un aumento de la fosforilación (relación p-ERK/ERK) y expresada en % sobre el control, luego del análisis por Western blot. El tratamiento por 28 días con el extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. previno el efecto de la diabetes experimental sobre la fosforilación de las ERK.

### Discusión

La evidencia sugiere que el RT ejerce un efecto protector del daño renal inducido por la hiperglicemia, que se acompañan de eventos fibróticos asociados al incremento del peso del riñón, aumento

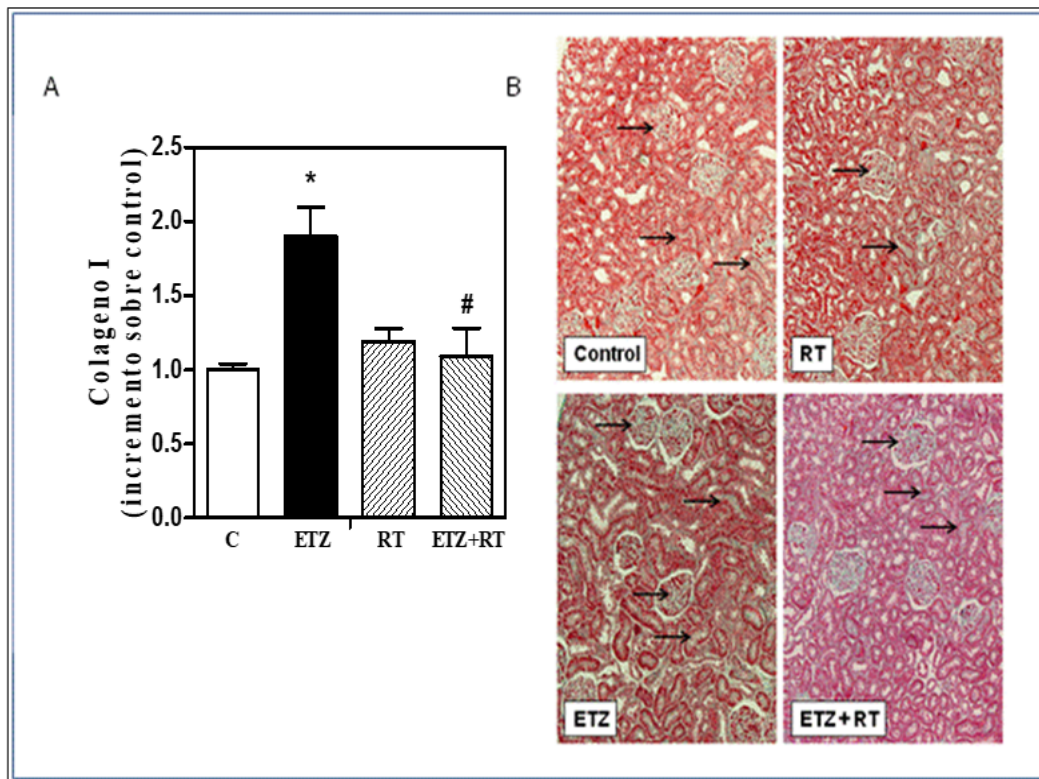
de la síntesis de proteínas totales y en particular de la expresión de proteínas de la matriz extracelular, tales como: colágeno I, IV, fibronectina y laminina, todo lo cual conducen al ensanchamiento de la membrana basal glomerular, a la glomérulo esclerosis, a la hiperfiltración, a la proteinuria, entre otros, estableciéndose así la nefropatía diabética (Steffes y col., 1992; Craven y col., 1997; Iglesias-de la Cruz y col., 2002; Mason y Wahab, 2003; Skill y col., 2004; Kamalakkannan y col., 2006; Shah y col., 2007). Seyer-Hansen (1976) evaluó los cambios en el peso, el contenido de proteínas, de ARN y de ADN en riñones de ratas con diabetes inducida por la ETZ, reportando que el riñón aumenta de peso en un 15 % y 90% a los 3 y 42 días de inducida 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 RT disminuye significativamente, tanto el peso del riñón como el contenido de proteínas totales en rata con diabetes inducida por la ETZ, lo que apoya aún más el papel renoprotector de la

**Tabla I**

Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) (10 mg/kg/día) sobre el peso (g) de los riñones y la síntesis de proteínas en la corteza renal de las ratas sanas (control) y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) al día 28 de tratamiento.

	CONTROL	ETZ	RT	ETZ+RT
Peso de los riñones (g)	0,329 ± 0,02	0,424 ± 0,02*	0,310 ± 0,01	0,35 ± 0,01#
Proteínas Totales (mg/g corteza renal)	1,22 ± 0,12	2,26 ± 0,25**	1,19 ± 0,12**	1,61 ± 0,08#

Los valores se muestran como la media ± E.E.M. \*p<0,05 y\*\*p<0,01 con respecto al control. #p<0,05 con respecto al grupo ETZ. n=5.



**Figura 1.** A. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT) (10 mg/kg/día) 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. Foto representativa de microscopía óptica del colágeno I. Las flechas indican la tinción del colágeno I por el tricrómico de Masson (en verde) a160x (Con permiso de Ciangherotti y col., 2013).

RT. Por lo tanto, en el modelo de diabetes en ratas, se demuestra los efectos terapéuticos de RT en la protección de la función renal y la prevención de la fibrosis renal. Hay que destacar que el extracto de la *R. tuberosa* mostró no solamente que es capaz de disminuir los altos niveles de glucosa, sino también abolir o disminuir otros signos clínicos de la diabetes tales como, la pérdida de peso corporal, la proteinuria, el incremento de la diuresis, entre otros; un aspecto importante que relaciona a esta especie con otras con actividad antidiabéticas, capacidad antioxidante, lo cual está vinculado con sus actividades hipoglicemiantes y antihiperlipemiantes (Okyar y col., 2001; Chaturvedi y col., 2010;

Okoli y col., 2011; Ciangherotti y col., 2013, 2016), guardando relación de esta manera con las observaciones de Seyer-Hansen (1976) con respecto a la proporcionalidad de la hiperglicemia con el daño renal.

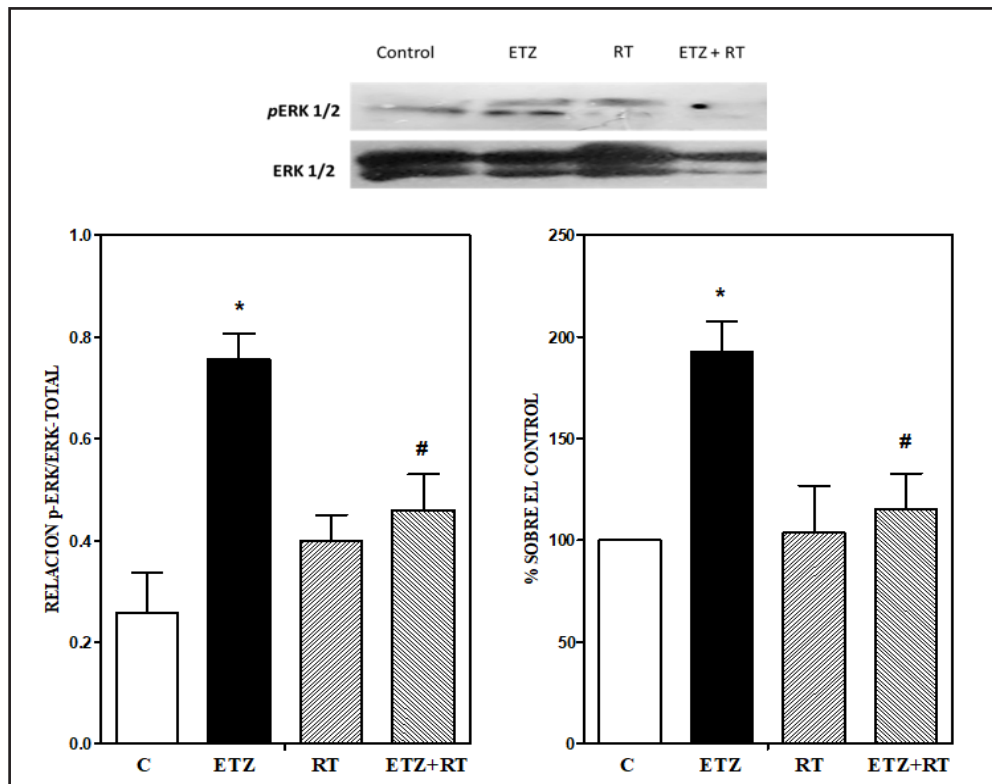
La respuesta al estrés oxidativo ha sido considerada como uno de los mecanismos subyacentes más importantes en el desarrollo y progresión de ND (Evans y col., 2002). Al respecto, Ciangherotti y col. (2013) demostraron en estudios previos en tejido renal de ratas con ND, que RT presenta actividad antioxidante, ya que 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*. La restauración de la actividad de las enzimas antioxidantes es considerada actualmente como una estrategia en la prevención o tratamiento de la ND, de manera interesante. Kuo y col. (2015) demostraron que el tratamiento con SOD recombinante humana de ratas con diabetes inducida por la ETZ fue capaz de disminuir la ND a través de la inhibición de la vía EROs/ERK1/2. Por lo tanto, el perfil como antioxidante de RT, incluyendo el mejoramiento del estatus de las enzimas antioxidantes, también podría estar relacionado con la inhibición de la fibrosis y la nefropatía, tal como ha sido descrito para otros importantes antioxidantes tales como: el tempol y el tiron (Xia y col., 2006), cuyo

efecto nefroprotector es atribuido, en gran parte, a la disminución de la expresión del TGF- $\beta$ 1 en las ratas con diabetes inducida por la ETZ (Luan y col., 2012).

Existe evidencia que indica que la activación de la vía de señalización TGF- $\beta$ / SMAD y MAPK ocurre en ratas con diabetes y estrés oxidativo renal (Xu y col., 2017). La activación de estas vías específicas resulta clave para la expresión y secreción de diversos factores inflamatorios y factores de crecimiento, que promueven aún más la deposición de la MEC, proliferación del miofibroblasto y secreción de MEC, reacciones que eventualmente producen fibrosis renal en las ratas con ND (Ding y col., 2011; LV y col., 2011). Nuestros hallazgos previos



**Figura 2.** El panel superior muestra los resultados de los inmunoblot analizados e incubados con anticuerpos contra p-ERK y ERK. Los gráficos de barras muestran la activación de las ERK expresadas como relación fosfo-ERK/ERK (izquierda) y % sobre control (derecha), en la corteza renal de ratas control y con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) tratadas con el extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* (RT). \* $p < 0,05$  con respecto al grupo control (C). # $p < 0,05$  con respecto al grupo ETZ. N=4.

(Ciangherotti y col., 2018 y el presente trabajo demuestran que la administración de RT reduce drásticamente la expresión de TGF- $\beta$ , la fosforilación de las ERK y la vía de señalización de NF- $\kappa$ B, en tejidos renales. Lo que indica que mecanismos multicomponente y multidireccional suprimen la vía de señalización TGF- $\beta$ /MAPK/NF- $\kappa$ B y posiblemente a través del control de la generación de EROs.

La hiperglicemia o el estrés oxidativo activa la cascada MAPK a través de la estimulación de ANG II (Tsiani y col., 2002). Se ha demostrado que las ERK1/2 se activan por estrés oxidativo en una variedad de tipos de células que incluyen células mesangiales (Wilmer y col., 1997). La activación de las ERK1/2 es parcialmente responsable de la síntesis de proteínas mediada por ANG II, que es un paso crucial en hipertrofia renal. Además, las ERK1/2 están involucradas en la sobre-expresión de la fibronectina y la fibrosis en las células mesangiales del peritoneo humano y (Kiribayashi y col., 2004). Así, Suzuki y col. (2004) en fibroblastos NRK en cultivo expuestos a alta glucosa, demostraron que se produce la activación de la MAPK p38 inducida por TGF- $\beta$ . Aún más, Chen y col. (2013) indican que la exposición *in vivo* a fluctuaciones de glucosa sanguínea en ratones diabéticos acelera la fibrosis renal incrementando la producción de colágeno e inhibiendo su degradación, en ambos casos tanto la ERK/MAPK como la vía de señalización TGF- $\beta$ /SMAD parecen jugar un papel importante. Estos hallazgos se apoyan en los experimentos de Polhill y col. (2005), quienes demostraron que la exposición a concentraciones fluctuantes de glucosa incrementa la fibrogénesis intersticial renal. Los autores sugieren que el aumento de la activación de la MAPK p38

podría contribuir a la alteración del fenotipo del fibroblasto que lleve a la ND progresiva.

El RT podría estar ejerciendo sus efectos protectores a través del decremento de la vía de señalización DAG/PKC/MAPK/NF- $\kappa$ B. Esto se apoya en los presentes hallazgos en los que se muestra al extracto RT como inhibidor de la fosforilación de las ERK de la corteza renal (presente resultados), así como la expresión del NF- $\kappa$ B inducida por el PMA, un activador de la PKC, en células HeLa en cultivo (Cianguerotti y col., 2018). Yang y col. (2008) demostraron que las altas concentraciones de glucosa inducen la expresión y la activación del NF- $\kappa$ B 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 la subsiguiente formación de las EROs.

Recientemente, Roosdiana y col. (2020) dejaron establecido un blanco de acción del extracto hidroalcohólico de *R. tuberosa* en cuanto a la nefroprotección en ratas con diabetes inducida por la ETZ, en donde no solo hubo una disminución del estrés oxidativo, lo cual apoya nuestros estudios, sino también una disminución de la expresión de TNF- $\alpha$  luego de 21 días de tratamiento con este extracto. Cabe destacar que el incremento de TNF- $\alpha$  y su señalización ha sido bien establecido como un evento mediador de la ND (Navarro-González y col., 2009). Cabe destacar que ambos tipo de extractos de raíz, el acuoso y el hidroalcohólico, tienen varios constituyentes químicos en común.

En conjunto, es probable que el RT, a través de su capacidad de disminuir el estrés oxidativo, proteja al riñón del daño glucotóxico al inhibir el aumento de la

expresión del NF- $\kappa$ B y la fosforilación de las MAPKs en la diabetes. Esta idea es consistente con la evidencia que señala al RT como un potente antiinflamatorio en el modelo del edema de la pata de la rata inducido por la carragenina (Pastorello y col., 2012), modelo de inflamación ligado al aumento de la señalización del NF- $\kappa$ B (Huang y col., 2012).

En conclusión, los hallazgos permiten establecer al RT como un extracto con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes *in vivo*, 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- $\kappa$ B y la fosforilación de las ERK1/2. Estos resultados, contribuyen al conocimiento acerca de las bases de los efectos farmacológicos de la especie *R. tuberosa* L., así como a la validación de su uso tradicional,

## 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.
- Arambewela L, Thambugala S, Ratnasooriya W. 2003. Gastroprotective activity of *Ruellia tuberosa* root extract in rats. Trop Med Plants 4(2):191–199.
- Arirudran A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. 2011b. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical. Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). Pharmacognosy J 3(22):29–34.
- Ashraful A, Subhan N, Sarder M, Nahar L, Sarker S. 2009. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Ruellia*. Pharmaceutic Biol 47(3):209–214.
- Awazu M, Ishikura K, Hida M, Hoshiya M. 1999. Mechanisms of mitogen activated protein kinase activation in experimental diabetes. J Am Soc Nephrol 10:738–745.
- 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.
- Bansal P, Paul P, Mudgal J, G Nayak P, Thomas Pannakal S, Priyadarsini KI, Unnikrishnan MK. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidant effects of the flavonoid rich fraction of *Pilea microphylla* (L.) in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetes in mice. Exp Toxicol Pathol 64 (6): 651–658.
- Baynes K. 2006. Introduction to Diabetes Mellitus. En Traditional Herbal Medicine for Modern Times, Antidiabetic Plants. CRC Press Taylor & Francis Group. The United State of America. p. 2–99.
- Behari M, Goyal M, Streibl M. 1981. Natural products from *Ruellia tuberosa* L. J Indian Chem Soc LVIII:176–177.
- Borkemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ. 1996. Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. Kidney Int 49:1187–98.
- Chaturvedi P, George S. 2010. Momordica charantia maintains normal glucose levels and lipid profiles and prevents oxidative stress in diabetic rats subjected to chronic sucrose load. J Med Food 13(3): 520–527.
- Cheng X, Gao W, Dang Y, Liu X, Li Y, Xu X, Ye X. 2013. Both ERK/MAPK and TGF-Beta/Smad signaling pathways play a role in the kidney fibrosis of diabetic mice accelerated by blood glucose fluctuation. J Diabetes Res 2013 : 463740.
- Chothani D, Patel M, Mishra S, Vaghasiya HU. 2011. Review on *Ruellia tuberosa* (Cracker plant). Pharmacog J 2(12):506–51.
- Chothani D, Patel M, Mishra S. 2012. HPTLC Fingerprint Profile and Isolation of Marker Compound of *Ruellia tuberosa*. Chromatography Res Inter 2012:1–6.
- Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. J Am Soc Nephrol 14(suppl 3): S233–S2336.
- 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.
- 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 Ter* 32(4): 57–66.
- Ciangherotti C, Cegarra J, Usubillaga A, Rodríguez M, Bermúdez J, Mata R, Israel A. 2016. Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicemiante aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas normales y con diabetes experimental. *Rev Fac Farm* 79 (1-2): 36–44.
- Ciangherotti C, Pimentel A, Benaim G, Orsini G, Salazar M, Israel A. 2018. Papel de la vía de señalización proteína quinasa C - NF-κB en la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Farm* 81 (1 y 2): 99–116.
- Craven PA, DeRubertis FR, Kagan VE, Melhem M, Studer R K. 1997. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF-beta, and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 8(9): 1405–1414.
- Ding Z, Chen Z, Chen X, Cai M, Guo H, Chen X, Gong N. 2011. Adenovirus-mediated anti-sense ERK2 gene therapy inhibits tubular epithelial-mesenchymal transition and ameliorates renal allograft fibrosis. *Transpl Immunol* 25:34–41.
- Eboh C, Chowdhury TA. 2015. Management of diabetic renal disease. *Ann Transl Med* 3:154.
- Esmaili MA, Zohari F, Sadeghi H. 2009. Antioxidant and protective effects of major flavonoids from *Teucrium polium* on beta-cell destruction in a model of streptozotocin-induced diabetes. *Planta Med* 75(13):1418–20.
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23:599–622.
- Feliers D, Kasinath B 2011. Erk in kidney diseases. *J Signal Transduction* 2011 :768512.
- Geilen CC, Wieprecht M, Orfanos CE. 1996. The mitogen-activated protein kinases system (MAP kinase cascade): its role in skin signal transduction. *J Dermatol Sci* 12:255–262.
- Gil R, Mejías R, Carmona J, Mejías R, Rodríguez M. 2003. Estudio etnobotánico de algunas plantas expendidas en los herbolarios de Mérida, Ejido y Tabay (Estado Mérida-Venezuela). *Rev Fac Far* 45(1):69–76.
- Giraldo D, Baquero E, Bermúdez A, Oliveira M. 2009. Caracterización del comercio de plantas medicinales en los mercados populares de Caracas-Venezuela. *Acta Bot Venez* 32(2):267–301.
- Ha H, Kim KH. 1999. Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract* 45:147–51.
- Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. 1997. Mitogen-activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetes* 46: 847–853.
- Huang C, Akaishi S, Ogawa R. 2012. Mechanosignaling pathways in cutaneous scarring. *Arch Dermatol Res* 304(8):589–597.
- 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.
- Iglesias-De La Cruz MC, Ziyadeh FN, Isono M, Kouahou M, Han DC, Kalluri R, Mundel P, Chen S. 2002. Effects of high glucose and TGF-beta1 on the expression of collagen IV. *Kidney Int* 62(3):901–13.
- Jha JC, Banal C, Chow B, Cooper M, Jandeleit-Dahm K. 2016. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 25(12):657–684.
- 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.
- Kamalakkannan N, Stanely Mainzen Prince P. 2006. The influence of rutin on the extracellular matrix in streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *J Pharm Pharmacol* 58(8):1091–1098.
- Kanwar Y, Akagi S, Sun L, Nayak B, Xie P, Wada J, Chugh S, Danesh F. 2005. Cell Biology of Diabetic Kidney Disease. *Nephron Exp Nephrol* 101:100–110.
- Kensa M, Neelamegam A. 2012a. Comparison of free radical scavenging activities in the extracts of *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Arch* 12(1): 69–74.

- Kensa M, Neelamegam R. 2012b. Analysis of antioxidants in *Ruellia tuberosa* L. collected from polluted and unpolluted areas. *Plant Arch* 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.
- Kiribayashi K, Masaki T, Naito T, Ogawa T, Ito T, Yorioka N, Kohno N. 2005. Angiotensin II induces fibronectin expression in human peritoneal mesothelial cells via ERK1/2 and p38 MAPK. *Kidney Int* 67:1126–1135.
- Kuo C, Shen C, Tung Y, Chen H, Chen Y, Chang W, Cheng KYang SH, Chen C. 2015. Extracellular superoxide dismutase ameliorates streptozotocin-induced rat diabetic nephropathy via inhibiting the ROS/ERK1/2 signaling. *Life Sci* 135:77–86.
- Lowry, O, Rosebrough N, Farr A, Arosorough A, Farr L, Randall R. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265–275.
- Luan J, Li W, Han J, Zhang W, Gong H, Ma R. 2012. Renal protection of *in vivo* administration of tempol in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Pharmacol Sci* 119(2):167–76.
- Lv ZM, Wang Q, Wan Q, Lin JG, Hu MS, Liu YX, Wang R. 2011. The role of the p38 MAPK signaling pathway in high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition of cultured human renal tubular epithelial cells. *PLoS One* 6:e22806.
- Makheswari U, Sudarsanam D. 2001. Phytomedicine for Diabetes mellitus: An overview. *Res Pharm* 1(4):28–37.
- Manikandan A, Arokia V. 2010a. Effect of 50% Hydroethanolic leaf extracts of *Ruellia tuberosa* L. and *Dipteracanthus patulus* (Jacq.) on non-enzymic antioxidants and other biochemical parameters in liver, kidney, serum of alloxan-induced diabetic Swiss albino rats. *J Biomed Sci Res* 2(3):190–201.
- Manikandan A, Arokia V. 2010b. 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 Pharm Pharm Sci* 1(2):142–146.
- Mason RM, Wahab NA. 2003. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *Am Soc Nephrol* 14:1358–1373.
- Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving H-H, Steffes MW. 2004. Nephropathy in diabetes. *Diabetes Care* 27(Suppl 1):S79–S83.
- National Institutes of Health (NIH). 2006. Guide for the care and use of laboratory animals. 8<sup>o</sup> ED. The National Academies Press. Studies. <http://grants.nih.gov/grants/olaw/Guide-for-the-care-and-use-of-Laboratory-animals.pdf>.
- Navarro-González J, Jarque A, Muros M, Mora C, García J. (2009). Tumor necrosis factor-alpha as a therapeutic target for diabetic nephropathy. *Cytokine Growth Factor Rev* 20(2):165–73.
- Nerlich A, Schleichert E. 1991. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions. *Am J Patbol* 139(4): 891–899.
- Nishida M, Okumura Y, Sato H, Hamaoka K. 2008. Delayed inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase ameliorates renal fibrosis in obstructive nephropathy. *Nephrol Dialysis Transplant* 23(8): 2520–2524.
- Okoli CO, Obidike IC, Ezike AC, Akah PA, Salawu OA. 2011. Studies on the possible mechanisms of an - tidiabetic activity of extract of aerial parts of *Phyllanthus niruri*. *Pharm Biol* 49(3):248–255.
- Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sütülpinar N. 2001. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. *Phytother Res* 15(2):157–61.
- Park SH, Choi HJ, Lee JH, Woo CH, Kim JH, Han HJ. 2001, High glucose inhibits renal proximal tubule cell proliferation and involves PKC, oxidative stress, and TGF-beta 1. *Kidney Int* 59(5):1695–1705.
- Pastorello M, Ciangherotti C, Varela M, López J, Orsini G, Israel A. 2012. Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Rev Fac Far* 75(2):1–16.
- Polhill TS, Saad S, Poronnik P, Fulcher GR, Pollock CA. 2004. Short-term peaks in glucose promote renal fibrogenesis independent of total glucose exposure. *Am J Physiol* 65:1647–53.
- Rajan M, Kishor V, Satheesh Kumar P, Reddy Swathi K, Sangam Haritha. 2012. Antidiabetic, antihyperlipidaemic and hepatoprotective activity of methanolic extract of *Ruellia tuberosa* Linn leaves in normal and alloxan-induced diabetic rats *J Chem Pharmaceut Res* 4(6):2860–2868.
- Roosdiana A, Permata F, Fitriani R, Umam K, Safitri A. 2020. *Ruellia tuberosa* L. extract improves histopathology and lowers malondialdehyde

- levels and tnf alpha expression in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vet Med Int* 2020:8812758
- Schrijvers B, De Vriese A, Flayvbjerg A. 2004. From hyperglycemia to diabetic kidney disease: The role of metabolic, hemodynamic, intracellular factors and growth factors/cytokines. *Endocrin Rev* 25:971–1010.
- Serger R, Krebs EG. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9:726–35.
- Seyer-Hansen K. 1976. Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci Mol Med Suppl* 51(6):551–555.
- Shah S, Baliga R, Rajapurkar M, Fonseca V. 2007. Oxidants in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 18:16–28.
- Sifuentes-Franco S, Padilla-Tejeda D, Carrillo-Ibarra S, Miranda-Díaz A. 2018. Oxidative stress, apoptosis, and mitochondrial function in diabetic nephropathy. *Int J Endocrinol* 2018:1875870.
- Singh R, Pandey H, Pandey R y Singh B. 2002. A Triterpenoid from *Ruellia tuberosa* Linn. *Indian J Chem* 41B:1754–1756.
- Skill NJ, Johnson TS, Coutts IGC, Saint RE, Fisher M, Huang LEI, Nahas AM, Collighan RJ, Griffin M. 2004. Inhibition of transglutaminase activity reduces extracellular matrix accumulation induced by high glucose levels in proximal tubular epithelial cells. *J Biol Chem* 279(46): 47754–47762.
- 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.
- Suzuki H, Uchida K, Nitta K, Nihei H. 2004. Role of mitogen-activated protein kinase in the regulation of transforming growth factor- $\beta$ -induced fibronectin accumulation in cultured renal interstitial fibroblasts. *Clin Exp Nephrol* 8:188–195.
- Tsiani E, Lekas P, Fantus G, Whiteside C. 2002. High glucose-enhanced activation of mesangial cell p38 MAPK by ET-1, ANG II, and platelet-derived growth factor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282: E161–E169.
- Turgut F, Bolton WK. 2010. Potential new therapeutic agents for diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 55:928–40.
- Ullah S, Shahwar D, Ullah S, Ahmad M. 2012. Hypoglycemic Activity of *Ruellia tuberosa* Linn (Acanthaceae) in Normal and Alloxan-Induced Diabetic Rabbits. *J Chem Soc Pak* 34(2):436–441.
- Verspohl E. 2002. Recommended testing in diabetes research. *Planta Med* 68:581–590.
- Verzola D, Bertolotto M, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F, Berruti V, Gandolfo MT, Garibotto G, and Deferrari G. 2004. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 15:S85–S87.
- Wahab NA, Harper K, Mason RM. 1996. Expression of extracellular matrix molecules in human mesangial cells in response to prolonged hyperglycaemia. *Biochem J* 316:985–992.
- Wilmer WA, Tan LC, Dickerson JA, Danne M, Rovin BH. 1997. Interleukin-1beta induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation. *J Biol Chem* 272(16):10877–81.
- Wolf G, Ziyadeh F. 2007. Cellular and molecular mechanisms of proteinuria in diabetic nephropathy. *Nephron Physiol* 106:26–31.
- Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. 1991. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10:339–352.
- Xia L, Wang H, Goldberg H, Munk S, Fantus G, Whiteside C. 2006. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression. *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F345–F356.
- Xu ZJ, Shu S, Li ZJ, Liu YM, Zhang RY, Zhang Y. 2017. Liuwei Dihuang pill treats diabetic nephropathy in rats by inhibiting of TGF- $\beta$ /SMADS, MAPK, and NF- $\kappa$ B and upregulating expression of cytoglobin in renal tissues. *Medicine* 96:3(e5879).
- Yang WS, Seo JW, Han NJ, Choi J, Lee KU, Ahn H, Lee SK, Park SK. 2008. High glucose-induced NF- $\kappa$ B activation occurs via tyrosine phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  in human glomerular endothelial cells: involvement of Syk tyrosine kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* 294(5): F1065–F1075.

Recibido: 05/06/2021  
Aceptado: 27/07/2021