



Efecto de la *Ruellia tuberosa* L. sobre la proliferación celular y la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa en células de epitelio renal en cultivo

Effect of *Ruellia tuberosa* L. on cell proliferation and cytotoxicity induced by high glucose concentration on renal epithelial cells in culture

CARLOS CIANGHEROTTI,^{1†}, GIOVANNINA ORSINI², ANITA ISRAEL³

Resumen

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico que se caracteriza por hiperglicemia crónica, debido a un defecto en la secreción de la insulina, a un defecto en la acción de la misma, o a ambas. La hiperglicemia crónica se asocia con daño, disfunción e insuficiencia renal. La *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) es una planta de uso etnomédico, cuyas partes aéreas presentan actividad antidiabética, antioxidante, antiinflamatoria y analgésica. Con el fin de conocer su posible capacidad protectora ante las complicaciones renales de la diabetes, se evaluó el efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la proliferación celular y la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa en células de epitelio renal (Vero) en cultivo. Para ello, se estudiaron las modificaciones en la proliferación y muerte de las células de epitelio renal en cultivo. La RT protegió a las células Vero de la glucotoxicidad inducida por la alta glucosa, ya que el tratamiento por 96 horas de las células Vero con un medio que contenía una alta concentración de glucosa (grupo HG, 35 mM), produjo un efecto citotóxico significativo ($p < 0,001$) el cual fue parcialmente abolido por el tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ de RT. Asimismo, se evaluó la proliferación de las células Vero mediante un método de exclusión por azul de tripano. En este modelo la condición de alta concentración de glucosa disminuyó 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. Todos estos hallazgos demuestran que la RT ejerce un efecto protector sobre el daño renal en la diabetes *in vitro*, lo que aporta información acerca de los efectos farmacológicos de la especie.

Palabras clave: *Ruellia tuberosa* L., proliferación celular, citotoxicidad, células Vero

Abstract

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by chronic hyperglycemia due to a defect in insulin secretion, insulin action, or both. Chronic hyperglycemia is associated with kidney damage, dysfunction, and failure. *Ruellia tuberosa* L. (yuquilla) is an ethnomedical plant with aerial parts with antidiabetic, antioxidant, anti-inflammatory, and analgesic activity. To assess its possible protective capacity against kidney complications induced by diabetes, the effect of the aqueous extract of the root of *Ruellia tuberosa* L. on cell proliferation and cytotoxicity induced by high glucose concentration was evaluated in renal epithelium (Vero) cell culture. To this end, modifications in the proliferation and death of renal epithelial cells in culture were studied. RT protected Vero cells from glucotoxicity induced by high glucose since treatment for 96 hours of Vero cells with a medium containing a high concentration of glucose (HG group, 35 mM) produced a significant cytotoxic effect ($p < 0.001$), which was partially abolished by treatment with 50 $\mu\text{g/mL}$ of RT. Likewise, Vero cell proliferation was evaluated using a trypan blue exclusion method. In this model, the high glucose concentration condition decreased cell proliferation after 72 hours, an effect that was partially reversed by RT treatment, thus improving the growth rate. All these findings demonstrate that RT exerts a protective effect on kidney damage in diabetes *in vitro*, providing information about the species' pharmacological effects.

Keywords: *Ruellia tuberosa* L., cell proliferation, cytotoxicity

*Laboratorio de Neuropeptidos. **Herbario "Victor Manuel Ovalles, Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela
Correspondencia: astern88@gmail.com

Orcid: ¹[0000-0003-3760-8645](https://orcid.org/0000-0003-3760-8645)
²[0000-0001-8932-9942](https://orcid.org/0000-0001-8932-9942)
³[0000-0003-1812-0759](https://orcid.org/0000-0003-1812-0759)

DOI: [10.54305/RFFUCV.2024.87.3.5](https://doi.org/10.54305/RFFUCV.2024.87.3.5)
Disponible: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff
Recepción: 16/10/2024
Aprobación: 01/11/2024

Introducción

La diabetes mellitus es un trastorno metabólico caracterizado principalmente por un desequilibrio del metabolismo de la glucosa debido a defectos en la secreción de insulina por las células beta del páncreas (diabetes tipo 1) o por la disminución de la actividad de ésta a nivel celular (diabetes tipo 2), la cual generalmente viene acompañada por un déficit en la secreción de insulina; de manera que se produce un aumento de la glucosa sanguínea (Jerez Fernández y col., 2022). La diabetes mellitus constituye uno de los mayores problemas para los sistemas de salud de los países de Latinoamérica. La *International Diabetes Federation* (IDF) calcula que 34 millones de adultos con diabetes tipo 2 residen en nuestra región, y pronostica un crecimiento del 62% en el número de casos esperados para el año 2045 (IDF, 2019). Esta enfermedad se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud pública, debido a su alta morbilidad y a su asociación con otros trastornos como la obesidad, hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca e insuficiencia renal (Braunwald, 2019; Dunlay y col., 2019).

El riñón al igual que la mayoría de los órganos afectados por la diabetes, sufre daño celular mediado por diferentes moléculas y mecanismos. La alta concentración de glucosa tiene efectos citotóxicos complejos en las células epiteliales renales, principalmente a través de mecanismos como el estrés oxidativo, la inflamación, la disfunción mitocondrial y la apoptosis, que en conjunto pueden llevar al daño renal crónico y enfermedades como la nefropatía diabética (Navarro González y col., 2022). Los efectos citotóxicos de la alta glucosa sobre las células epiteliales renales ocurren debido a la exposición

prolongada a niveles elevados de glucosa que ocurren en la diabetes. En efecto, la alta glucosa aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que pueden dañar proteínas, lípidos y el ADN, afectando la estructura y la función celular, la supervivencia y la capacidad de regeneración de las células epiteliales renales. El daño prolongado puede llevar a la muerte celular y deterioro del tejido renal (Jha y col., 2016). Por su parte, la hiperglicemia activa vías inflamatorias que aumentan la producción de citoquinas y moléculas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la interleucina-6 (IL-6), y la inflamación crónica promueve el daño celular y el reclutamiento de células inmunes, que pueden agravar el daño tisular y contribuir al desarrollo de fibrosis renal (Navarro-González y Mora-Fernández, 2008). Adicionalmente, los altos niveles de glucosa llevan a la glicación no enzimática de proteínas, formando productos finales de glicación avanzada (AGEs) que alteran la función normal de las proteínas (Forbes y col., 2003). Además, la alta glucosa puede inducir un mal plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (ER), generando estrés del ER que desencadena respuestas celulares que pueden llevar a la apoptosis. Ambos procesos contribuyen a la citotoxicidad en las células epiteliales renales (Back y Kaufman, 2012). El estrés oxidativo, inflamación, disfunción mitocondrial pueden activar vías que promueven la apoptosis de células epiteliales renales que afecta integridad del epitelio renal, comprometiendo la función de los túbulos renales y acelerando el daño renal (Jha y col., 2016). Finalmente, bajo la condición de hiperglicemia crónica, las células renales sufren cambios fenotípicos que traen como consecuencia la fibrosis y la pérdida de la función renal, conduciendo al

establecimiento de la nefropatía (Simonson, 2007). Estos procesos fenotípicos alteran la estructura y la función de las células mesenquimales, epiteliales y las células progenitoras, en donde se produce una reprogramación nuclear inducida por algunas citoquinas y factores de crecimiento, trayendo como consecuencia la formación de miofibroblastos (MFT) a partir de las células mesangiales, fibroblastos intersticiales y células progenitoras, así como también la formación de miofibroblastos intersticiales a partir de las células del epitelio tubular; llevando en el primer caso a la expansión del mesangio y a la glomeruloesclerosis y en el segundo caso, a la fibrosis tubulointersticial (Simonson, 2007). La hiperglicemia puede inducir la transición epitelio-mesénquima, en la que las células epiteliales adquieren características de células mesenquimales, aumentando la producción de matriz extracelular (MEC). La acumulación excesiva de MEC conduce a la fibrosis, resultando en una pérdida progresiva de la función renal.

El efecto de la alta glucosa sobre la proliferación celular en células de epitelio renal afecta el crecimiento y la división de estas células. En condiciones normales, las células del epitelio renal regulan su proliferación para mantener la función adecuada del riñón. Sin embargo, cuando hay niveles altos de glucosa, como en la diabetes, esto puede alterar el comportamiento celular. La hiperglicemia crónica puede llevar a un aumento en la proliferación de las células del epitelio renal debido a varios mecanismos como el estrés oxidativo, ya que la alta glucosa aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), que puede dañar las células y alterar su ciclo de proliferación (Wu y col., 2023). Igualmente, la activación de vías de señalización como la vía de AKT/mTOR o

MAPK promueven la proliferación celular y la fibrosis. Por su parte la inflamación también promueve la proliferación anormal de células en el riñón y los cambios en la expresión de genes involucrados en la división celular, haciendo que las células proliferen más rápido de lo normal (Ryu y col., 2010). Esto es importante porque una proliferación descontrolada de las células epiteliales renales puede contribuir al daño renal crónico y a condiciones como la nefropatía diabética, donde hay un deterioro progresivo de la función renal. Samikkannu y col. (2006) mostraron que la exposición a 25 mM de glucosa (alta concentración) es capaz de aumentar la proliferación de células epiteliales del túbulo proximal de humano (hPTEC), hasta las primeras 24 horas, seguido de una inhibición de la proliferación (evaluada por la incorporación de [3H]-timidina). Adicionalmente, estos autores demostraron que la exposición a altas concentraciones de glucosa por 10 minutos produce el mismo esquema de proliferación, observándose que esta exposición aguda es suficiente para producir los efectos antiproliferativos e inducir la muerte celular en el epitelio tubular, sugiriendo que los episodios no prolongados de hiperglicemia pueden conducir a la disfunción tubular.

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, se han desarrollado estudios etnofarmacológicos 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 (Khan y col., 2012; Hung y col., 2012).

Una de las plantas con gran potencial antioxidante (Arirudran y col., 2011a,b) que se encuentra en Venezuela es la *Ruellia tuberosa* L. (RT), conocida como escopetera, escopetilla o yuquilla, la cual pertenece a la familia Acanthaceae (Figura 1). Al igual que en otras partes del mundo, en nuestro país esta especie es utilizada de manera tradicional para el tratamiento de la diabetes (Ciangherotti y col., 2007), así como también para el manejo de las anemias, como diurético y para el tratamiento de diversos problemas renales (Giraldo y col., 2009). Se ha evaluado farmacológicamente el extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L., logrando validar su uso tradicional como antiinflamatorio y antinociceptivo en modelos animales (Pastorello y col., 2012). Asimismo, investigadores de Sri Lanka, lograron validar el uso popular de RT para el tratamiento de la gastritis, utilizando un modelo de ratas con gastritis inducida por etanol (Arambewela y col., 2003). Aún más, Ciangherotti y col. (2013) demostraron que la RT presenta actividad antioxidante y 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 las enzimas antioxidantes renales catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR) inducida por la glucosa *in vivo*, indicando

que la RT ejerce un efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia y del estrés oxidativo.

En vista de la evidencia, el presente trabajo evaluó el posible efecto del *Ruellia tuberosa* L. sobre la proliferación celular y la citotoxicidad inducida por la alta concentración de glucosa sobre las células de epitelio renal (Vero) en cultivo sometidas a altas concentraciones de glucosa. Para ello fueron evaluadas las modificaciones la proliferación y muerte de las células de epitelio renal.

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 Herbario "Victor Manuel Ovalles" (MYF) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Unos ejemplares vouchers fueron depositados en el herbario bajo el código MYF 26390, Colectada por el Dr. Stephen Tillett.



Figura 1. *Ruellia tuberosa* L.; A. flor y hojas, B. hojas y frutos, C. raíz. (Arirudran y col., 2011a)

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 hora. El extracto acuoso preparado fue liofilizado y mantenido bajo protección de la humedad. Posteriormente fue disuelto en agua destilada o medio de cultivo para los diferentes ensayos.

LÍNEA Y CULTIVO CELULAR

Para los experimentos *in vitro* fueron empleadas las células Vero en cultivo. Esta línea celular es susceptible al daño oxidativo inducido por la exposición a alta concentración de glucosa (Kannan y Jain, 1994). Las células Vero, una línea celular de epitelio renal de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), fueron adquiridas en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

Las células se cultivaron hasta confluencia en condiciones de 5% de CO₂ a 37 °C en medio completo que contiene: DMEM, 10% de suero fetal de bovino y 1% de penicilina/estreptomicina. Luego se lavaron 2 veces con PBS (buffer salino-fosfato) y se lisaron con tripsina 0,025 M en EDTA dejando incubar a 37°C por 5 minutos para luego centrifugar por 10 minutos a 2200 rpm. El sedimento se trató con PBS para formar una suspensión de células, la cual se utilizó para realizar los ensayos correspondientes.

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 esto, se incubaron 5000 células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos con medio completo (5% CO₂ a 37°C), bajo un ambiente de 8 mM de glucosa durante 24 horas. El medio se removió y se reemplazó por medio completo fresco con el siguiente esquema de tratamientos: pozos controles, 8 mM de glucosa; pozos alta glucosa, 35 mM de glucosa; pozos RT (concentraciones crecientes) y pozos alta glucosa + RT. Bajo estas condiciones las células se cultivaron (5% CO₂ a 37°C) durante 96 horas, reemplazando con medio nuevo sobre el mismo esquema cada 24 horas. Al término de este tiempo el medio fue nuevamente reemplazado, pero solo con medio completo. Se preparó una solución de MTT (2,5 mg/mL) y se añadió 100 µL de ésta a cada pozo de la placa. Las placas se incubaron por 3h (5% de CO₂ a 37°C). Posteriormente se eliminó el sobrenadante de cada pozo y la monocapa será 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 leyó 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 el RT. Las células se tripsinizaron y se contaron por grupo a las 24, 48, 72 y 96 horas de tratamiento. Los resultados se expresaron como células/mL.

Análisis estadístico

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

Resultados

EFFECTO DEL RT SOBRE LA VIABILIDAD Y LA PROLIFERACIÓN CELULAR

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

EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA RAÍZ DE RUELLIA TUBEROSA L. (RT, 50 μ g/mL) SOBRE LA VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS VERO EN CULTIVO CON O SIN UN AMBIENTE DE ALTA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA (NG Y HG, RESPECTIVAMENTE)

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 μ g/mL del RT (Figura 2), por lo que queda establecido que este extracto inhibe el efecto glucotóxico sobre las células renales *in vitro* en las condiciones

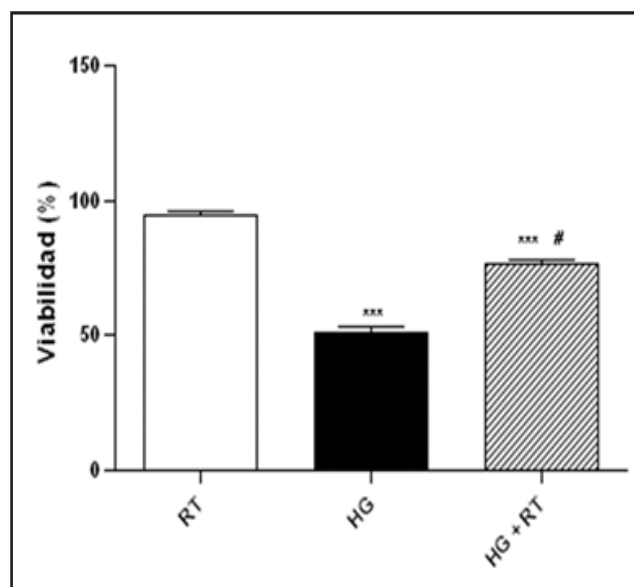


Figura 2. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 μ g/mL) sobre la viabilidad de las células Vero en cultivo con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. *** $p < 0,001$ con respecto al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

experimentales utilizadas.

La reducción de la muerte celular inducida por el 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 de glucosa trajo como consecuencia una disminución de la proliferación celular

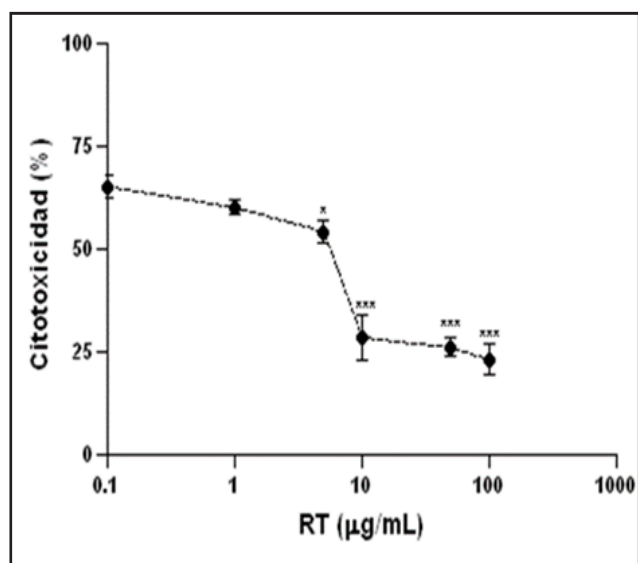


Figura 3. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la citotoxicidad inducida por la glucosa en células Vero. Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p<0,005$ y *** $p<0,001$ con respecto al grupo HG. N=5 por grupo

a partir de las 72 horas, efecto que fue parcialmente revertido por el tratamiento con el RT, mejorando de esta manera la tasa de crecimiento. Por sí mismo, el RT produjo un efecto pro-proliferativo significativo ($p<0,01$) a las 96 y 120 horas de experimentación cuando se compara con el grupo NG, disminuyendo el tiempo de duplicación de 35,3 a 25,7 horas (Figura 4).

Discusión

Nuestros hallazgos demuestran que la *Ruellia tuberosa* L. ejercer un efecto protector sobre las células epiteliales renales sometidas a alta glucosa. Estos efectos podrían estar mediados por las propiedades antioxidantes de la RT, que se sabe que contiene compuestos polifenólicos, flavonoides y otros antioxidantes que pueden neutralizar las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por la alta glucosa

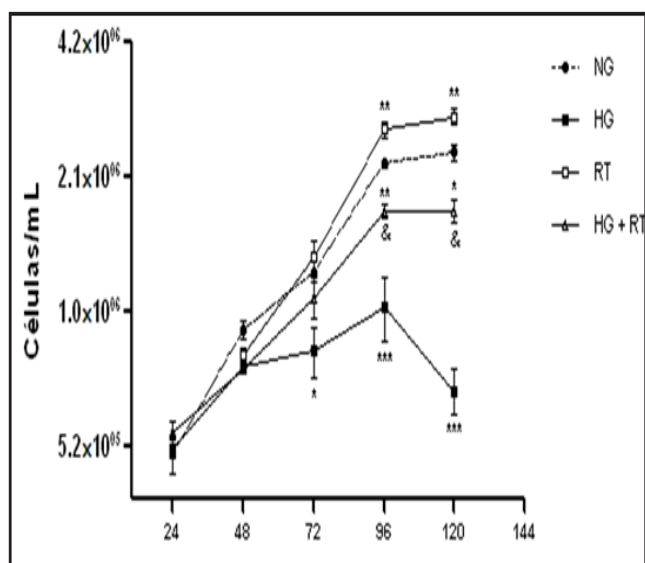


Figura 4. Efecto del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. (RT, 50 $\mu\text{g/mL}$) sobre la proliferación de las células Vero-cultivadas con o sin un ambiente de alta concentración de glucosa (NG y HG, respectivamente). Los valores se muestran como la media \pm EEM. * $p<0,005$, ** $p<0,01$ y *** $p<0,001$ con respecto al grupo NG. & $p<0,005$ con respecto al grupo HG. N=5 por grupo

(Ciangherotti y col., 2016). En efecto, Ciangherotti y col. (2016) evaluaron el perfil fitoquímico preliminar y el contenido de polifenoles totales del extracto de RT, así como también sus efectos agudos sobre la glicemia en ratas diabéticas. Los resultados mostraron que el RT produjo un efecto hipoglicemiante tanto en los animales controles como en las ratas con diabetes inducida por la ETZ, con porcentajes de variación de la glicemia comparables con el hipoglicemiante oral de referencia, la glibenclamida. La presencia de un alto contenido de polifenoles del extracto de raíz de RT, posiblemente se encuentre asociado con su actividad antidiabética y antioxidante, reflejada a través de la reacción del RT con el radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Así al reducir el estrés oxidativo evita el daño celular, protegiendo a las células epiteliales de la disfunción y la apoptosis.

Bajo un ambiente prolongado de alta concentración de glucosa las células tanto de epitelio tubular como las mesangiales sufren inhibición de la proliferación y apoptosis asociada a un incremento de la formación de las ROS (Allen y col., 2003; Samikkannu y col., 2006; Khera; 2006). Kannan y Jain (1994) demostraron que concentraciones de glucosa entre 20 y 100 mM causan una reducción de alrededor del 50% de la viabilidad celular en comparación con el control de 8 mM de glucosa. Ya que este efecto glucotóxico se acompaña de un aumento del estrés oxidativo, este modelo constituye una herramienta útil para el estudio de los efectos de la glucosa sobre las células renales. En este sentido, nuestros resultados apoyan estos hallazgos en cuanto a que el tratamiento con 35 mM de glucosa produjo una reducción de la viabilidad de las células Vero del $50,94 \pm 2,48 \%$, siendo este efecto inhibido significativamente por el RT de manera dependiente de la concentración. 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 del RT en condiciones basales y por otro un bloqueo parcial de la disminución del número de células inducida por el ambiente glucotóxico. Adicionalmente, Ciangherotti y col. (2022) demostraron que la RT protegió a las células Vero del estrés oxidativo y del estrés nitrosativo, inducido por la alta glucosa, por el peróxido de hidrógeno y por el nitroprusiato de sodio, respectivamente; lo que apoya aún más que la RT, como antioxidante, ejerce su efecto protector sobre el daño renal en la diabetes *in vitro*, a través de un mecanismo que involucra la disminución del estrés oxidativo y nitrosativo. Todos estos resultados sugieren

un efecto protector del extracto sobre daño renal inducido por la alta glucosa *in vitro*.

Con el fin comprender los mecanismos celulares y moleculares que puedan contribuir a la protección de RT frente a las complicaciones de la diabetes Ciangherotti y col. (2018) estudiaron 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 proteína quinasa C/factor nuclear- κ B (PKC-NF- κ B) *in vitro*. Para ello, evaluaron la modulación del efecto protector de RT sobre la disminución de la viabilidad celular en ambiente de alta glucosa (presente resultados) y en presencia de un estimulante de la PKC, el éster de forbol (PMA) en células Vero. Igualmente, estos autores estudiaron el efecto de RT sobre la actividad del NF- κ B inducida por el PMA en células HeLa. Los resultados mostraron 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- κ 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- κ B. Para comprender aun mas los mecanismos de señalización, Ciangherotti y col., (2021) estudiaron el efecto del tratamiento con el extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* (RT) (10 mg/kg/día, p.o., durante cuatro semanas), sobre la

fosforilación de la quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK 1/2) en la corteza renal de ratas control y con diabetes tipo I inducida por la estreptozotocina. Igualmente evaluaron el papel de los marcadores de la fibrosis renal tales como el del peso del riñón, contenido de proteínas totales y de colágeno I. Estos autores demostraron 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 en la diabetes inducida por ETZ, lo que sugiere un papel de las ERK 1/2 en el mecanismo de acción de la RT.

Los efectos de la RT *in vitro* están en concordancia con sus efectos *in vivo* como antidiabético y antioxidante. Así, Ciangherotti y col. (2013) al evaluar el efecto del extracto acuoso de la raíz de *R. tuberosa* L. (RT) sobre el daño renal en un modelo de ratas con diabetes inducida por la estreptozotocina (ETZ) y su potencial actividad antioxidante, demostró que la RT presentó actividad antioxidante y fue capaz de disminuir y/o revertir la alteración de los marcadores del daño renal inducido por la hiperglicemia. Igualmente, RT contrarrestó la disminución de la actividad de las enzimas antioxidantes renales, CAT, la SOD, la GPx y la GR, inducida por la glucosa *in vivo*. Lo que establece que el RT actúa como un antioxidante ejerciendo un efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia y del estrés oxidativo.

Además de estas acciones de la RT, se han descrito sus efectos antiinflamatorios ya que se ha demostrado que la RT es capaz de reducir la producción de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-6 y otras moléculas relacionadas con la inflamación,

este efecto previene el daño a las células epiteliales y se reduce la probabilidad de fibrosis lo que contribuye a la preservación de la estructura y función del tejido renal (Roosdiana y col., 2020; Thi Pham y col., 2022).

En conclusión, nuestros resultados y la evidencia indica que la RT actúa como antioxidante con efecto protector sobre el daño renal en la diabetes, tanto *in vivo* como *in vitro* a través de un mecanismo que involucra la disminución de la glicemia, del estrés oxidativo, del estrés nitrosativo, y que involucra la vía de señalización de la PKC-NF-kB. La *Ruellia tuberosa* tiene potencial como agente protector contra el daño inducido por alta glucosa en células epiteliales renales gracias a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, lo que sugiere que podría ser útil en la prevención o tratamiento de complicaciones renales asociadas con la diabetes. Estos hallazgos aportan información acerca de los efectos farmacológicos de la especie *R. tuberosa* L., y a la vez que contribuyen tanto a la validación de su uso tradicional como a la caracterización farmacológica de su género.

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 M, Vijayalakshmi K. 2011a. Evaluation of antioxidant potential of *Ruellia tuberosa* L. using *in-vitro* model. *J Pharmacy Res* 4(12):4344-4347.
- Arirudran A, Saraswathy, Vijayalakshmi K. 2011b. Pharmacognostic and Preliminary Phytochemical. Studies on *Ruellia tuberosa* L. (Whole plant). *Pharmacognosy J* 3(22):29-34.

- Back SH, Kaufman RJ. 2012. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annu Rev Biochem* 81:767-793.
- Braunwald E. 2019 Diabetes, heart failure, and renal dysfunction: The vicious circles. *Prog Cardiovasc Dis* 62:298-302.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Varela M, López-Gramcko JT, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Israel A. 2007. Propiedades farmacológicas del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Acta Científica Venezolana* 58(Sup.1):252.
- Ciangherotti C, Maldonado AM, Orsini G; Perdomo L, Álvarez M, Salazar Salazar-Bookaman M, Israel A. 2013. Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 32(4):57-66.
- Ciangherotti C, Cegarra J, Usubillaga A, Rodríguez M, Bermúdez J, Mata R, Israel A. 2016. Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicémica aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas con diabetes experimental. *Revista Facultad de Farmacia* 79 (1 y 2):36-44.
- Ciangherotti C, Pimentel A, Benaim G, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Israel A. 2018. Papel de la vía de señalización proteína quinasa C - NF- κ B en la actividad nefroprotectora del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Revista Facultad de Farmacia* 81(1 y 2): 101-116.
- Ciangherotti C, Pastorello M, Orsini G, Perdomo L, Álvarez M, Israel A. 2021. 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. *Revista de la Facultad de Farmacia* 84(1 y 2): 41-54.
- Ciangherotti C, Orsini G, Salazar-Bookaman M, Rodríguez M, Bermúdez J, Israel A. 2022. Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre la actividad de las enzimas antioxidantes en células Vero-sometidas a alta glucosa. *Revista de la Facultad de Farmacia* 85(1 y 2): 111-127.
- Dunlay SM, Givertz MM, Aguilar D, Allen LA, Chan M, Desai AS, Deswal A, Dickson VV, Kosiborod MN, Lekavich CL, McCoy RG, Mentz RJ, Piña IL. 2019. Type 2 diabetes mellitus and heart failure. A scientific statement from the American Heart Association and the Heart Failure Society of America. *Circulation* 140:e294-324.
- Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, Thomas MC. 2003. Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 14(90003); S254-S258.
- 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.
- 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.
- International Diabetes Federation. Atlas de la Diabetes de la FID. Novena edición 2019. International Diabetes Federation. 2019. Disponible en: https://www.diabetesatlas.org/upload/resources/material/20200302_133352_2406-IDF-ATLAS-SPAN-BOOK.pdf
- Jerez Fernández CI, Medina Pereira YA, Ortiz Chang AS, González Olmedo SI, Candy Aguirre Gaete M, 2022. Fisiopatología y alteraciones clínicas de la diabetes mellitus tipo 2: revisión de literatura. *Nova* 20(38):65-103.
- Jha JC, Banal C, Chow BS, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K. 2016. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal* 25(12):657-684.
- Kannan K, Jain SK. 1994. Effect of high glucose on cellular proliferation and lipid peroxidation in cultured Vero cells. *Horm Metab Res* 26(7):322-5.
- Khan V, Najmi AK, Akhtar M, Aqil M, Mujeeb M, Pillai KK A. 2012. Pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *J Pharm Bioallied Sci* 4(1):27-42.
- Khera T, Martin J, Riley S, Steadman R, Phillips AO. 2006. Glucose enhances mesangial cell apoptosis. *Lab Invest* 86(6):566-77.
- Mosman T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Navarro González J, Mora Fernández C, Martínez Castela A, Gorrioz Teruel JL, Soler Romeo MJ, Fernando de Álvaro Moreno. 2022. Enfermedad renal diabética: etiopatogenia y Fisiopatología. *Nefrología al día*. Disponible: <https://www.nefrologiaaldia.org/es-articulo-enfermedad-renal-diabetica-etiotopogenia-y-fisiopatologia-264-pdf>
- Navarro-González JF, Mora-Fernández C. 2008. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 19: 433-442.
- 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. Revista de la Facultad de Farmacia UCV 75(2):1-16.
- Roosdiana A, Permata FS, Fitriani Riera I, 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. Veterinary Medicine International 8812758:1-7.
- Ryu JM, Lee MY, Yun SP, Han H.J. 2010. High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF- β 1 expression via Ca²⁺/PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways. Journal of Cellular Physiology 224;29-70.
- 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 increases in proximal tubule cell injury. Am J Physiol Renal Physiol 291:F162-F175.
- Simonson M. 2007. Phenotypic transitions and fibrosis in diabetic Nephropathy. Kidney Int 71:846-854.
- Thi Pham, Trinh Nhat, Nguyen, Tuan Trong, Le Thi Nguyen, Thuy, Nguyen Tran, An Minh, Nguyen, Tuan Ngoc, Tong, Danh Thanh, Tien Le Dung. 2022. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Phytochemicals from *Ruellia tuberosa*. Journal of Chemistry 4644641:1-14.
- Wu T, Ding L, Andoh V, Zhang J, Chen L. 2023. The Mechanism of Hyperglycemia-Induced Renal Cell Injury in Diabetic Nephropathy Disease: An Update. Life 13: 539.