



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA**

**“Evaluación del efecto del aceite de aguacate sobre la función vascular renal y la disfunción mitocondrial generada por activación adrenérgica en la hipertensión”**

Tesis que presenta el:

**M. C. Cristian Adrián Márquez Ramírez**

Para obtener el grado de:

**Doctor en Ciencias Biológicas, Opción en Biología Experimental**

Director de tesis:

**D. C. Christian Cortés Rojo**

*Morelia, Mich., Marzo de 2019*

## I. Dedicatoria

A mis papás, **Gregorio Márquez** y **Guillermina Ramírez** a quienes agradezco todo lo que logro en la vida, siempre apoyando en mis decisiones y en los tropiezos de la vida.

A **Ruth**, por todo el amor que me demuestra y por todo el apoyo que siempre me brinda, a mis hijos **Gael** y **Megan** por la paciencia y esfuerzo que implica este logro para ellos.

A mis hermanos, **Omar**, **Memo**, **Obeth** y **Nery** que siempre me brindan ayuda sin condiciones.

A mi asesor y amigo el Dr. **Christian Cortés Rojo**, que además de tutor para la realización de este trabajo, durante todo este proceso me ha brindado su amistad en todo momento.

## II. Índice

1. Resumen general.....	1
2. Summary .....	2
3. Antecedentes generales .....	3
3.1. <i>Hipertensión arterial</i> .....	3
3.1.1. <i>Definición y clasificación</i> .....	3
3.1.2. <i>Impacto social y económico</i> .....	3
3.2. <i>Regulación de la presión arterial</i> .....	4
3.2.1. <i>Regulación de la presión arterial por el sistema renina angiotensina (SRA)</i> .....	5
3.2.2. <i>Sistema nervioso simpático (SNS) en la regulación de la presión arterial</i> .....	6
3.2.3 <i>Mecanismos de transducción de señal en la contracción (receptores AT<sub>1</sub> y <math>\alpha_1</math>-adrenérgicos)</i> .....	7
4. Antecedentes específicos.....	9
4.1. <i>Hipertensión y estrés oxidante</i> .....	9
4.2. <i>Daño renal en la hipertensión</i> .....	10
4.3. <i>El aceite de aguacate</i> .....	12
5. Justificación.....	14
6. Hipótesis.....	15
7. Objetivos.....	15
7.1 <i>Objetivo general</i> .....	15
7.2. <i>Objetivos específicos</i> .....	15
8. Resultados .....	16
8.1 <i>Capítulo 1</i> .....	17
8.2. <i>Capítulo 2</i> .....	25
8.2.1. <i>Resumen</i> .....	25
8.2.2. <i>Introducción</i> .....	26
8.2.3. <i>Metodología</i> .....	28
8.2.4. <i>Resultados</i> .....	32
8.2.5. <i>Discusión</i> .....	40
8.2.6. <i>Conclusión</i> .....	45
8.2.7. <i>Bibliografía</i> .....	46

9. Discusión general.....	50
10. Conclusión general.....	53
11. Perspectivas .....	54
12. Bibliografía complementaria.....	55

### III. Índice de cuadros y figuras.

#### Introducción general

<b>Tabla 1.</b> Nomenclatura de los receptores adrenérgicos con las proteínas G a las que se encuentran acoplados y los segundos mensajeros involucrados en la traducción de la señal.	7
<b>Figura 1.</b> Mecanismo general de contracción vascular mediado por proteína $G_{q/11}$ .	8
<b>Figura 2.</b> Cadena de transporte de electrones en la mitocondria, fosforilación oxidativa y generación de especies reactivas de oxígeno.	10
<b>Tabla 2.</b> Compuestos presentes en el aguacate.	13
<b>Figura 3.</b> Ácidos grasos presentes en el aceite de aguacate.	13

#### Capítulo 1

<b>Figure 1.</b> Effects of avocado oil (AO) or losartan (Los) over diastolic (panel A) and systolic (panel B) blood pressure and serum nitrite levels (panel C).	19
<b>Figure 2.</b> Effects of avocado oil (AO) or losartan (Los) on renal vasoconstriction induced by Ang-II.	19
<b>Figure 3.</b> Recovery time to basal perfusion pressure after the contraction with Ang-II in kidneys from control rats treated with avocado oil (Panel A) and hypertensive (HT) animals treated with avocado oil (AO) or losartan (Los) (panel B).	19
<b>Figure 4.</b> Effect of avocado oil or losartan on endothelium-dependent renal vasodilation. Concentration-response curves to carbachol were carried out in isolated perfused kidneys from control or hypertensive (HT) animals treated during 60 days with avocado oil (AO) or losartan (Los).	20
<b>Figure 5.</b> Membrane potential of kidney mitochondria treated with avocado oil (AO) or losartan (Los) energized with glutamate-malate (complex I substrate, Panel A) or succinate plus rotenone (complex II substrate, Panel B).	21
<b>Figure 6.</b> ROS levels in kidney mitochondria from control or hypertensive (HT) rats treated with avocado oil (AO) or losartan (Los). ROS generation was supported with glutamate-malate (GLU-MAL) (Panel A) or succinate 522 (SUCC), plus rotenone (ROT) (Panel B). ROS production was stimulated with antimycin A (AA) or cyanide (KCN).	22
<b>Figure 7.</b> Effects of avocado oil (AO) or losartan (LOS) on mitochondrial levels of reduced glutathione (GSH, panel A), oxidized glutathione (GSSG, panel B), the GSH/GSSG ratio (panel C) and total glutathione (GSH + GSSG, 529 panel D).	22

#### Capítulo 2

<b>Figura 1.</b> Efecto del tratamiento con aceite de aguacate (AO) o prazosina (PZS) sobre la presión arterial sistólica (a) y diastólica (b) de ratas hipertensas (HT; L-NAME).	35
<b>Figura 2.</b> Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre las respuestas vasoconstrictoras de fenilefrina (A) y el tiempo de recuperación de la presión de perfusión después de la administración de fenilefrina (B) en el riñón.	35

- Figura 3.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre las respuestas vasorelajantes renales a carbacol (endotelio dependientes). Se realizaron curvas concentración-respuesta a concentraciones creciente del agonista carbacol en riñones aislados y perfundidos colocados en un sistema tipo Langendorff. 36
- Figura 4.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre las respuestas vasorelajantes renales a carbacol (endotelios dependientes) en presencia (+) o ausencia (-) de rotenona. Se realizaron curvas concentración-respuesta a concentraciones creciente del agonista carbacol en riñones aislados y perfundidos. 36
- Figura 5.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en mitocondrias de riñón. Los experimentos se realizaron administrando glutamato/malato como sustrato respiratorio. 37
- Figura 6.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre el cociente GSH/GSSG en mitocondrias de riñón de rata. 37
- Figura 7.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre la tasa de control respiratorio (TCR) en mitocondrias de riñón. Los experimentos se realizaron administrando glutamato/malato (A) o succinato (B) como sustrato respiratorio. 38
- Figura 8.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre la proteinuria y las concentraciones séricas de creatinina. Parámetros determinados al final del tratamiento. 38
- Figura 9.** Microfotografías representativas de la histología glomerular (teñidas con hematoxilina-eosina), efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre el daño glomerular causado por la hipertensión. 39

#### IV. Lista de abreviaturas

<b>3-NT</b>	3-Nitrotirosina
<b>ANG II</b>	Angiotensina II
<b>AO</b>	Aceite de aguacate
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CTE</b>	Cadena transportadora de electrones
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>ECA</b>	Enzima convertidora de angiotensina
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>GTP</b>	Guanidín trifosfato
<b>HT</b>	Hipertensión arterial
<b>IRC</b>	Insuficiencia renal crónica
<b>L-NAME</b>	N <sup>-</sup> -nitro-L-arginina metil ester
<b>LOS</b>	Losartán
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Anión superóxido
<b>ONOO<sup>·</sup></b>	Peroxinitrito
<b>PAD</b>	Presión arterial diastólica
<b>PAS</b>	Presión arterial sistólica
<b>PLC</b>	Fosfolipasa C
<b>PZS</b>	Prasozina
<b>SNS</b>	Sistema nervioso simpático
<b>SRA</b>	Sistema renina angiotensina
<b>TPP<sup>+</sup></b>	Trifenilfosfonio

## V. Agradecimientos

Al **Dr. Christian Cortés Rojo** por su asesoría y disponibilidad brindada durante la realización de este trabajo.

Al mis sinodales: **Dr. Alfredo Saavedra Molina, Dr. Daniel Godínez Hernández, Dra. Esperanza Meléndez Herrera, Dr. Ricardo Mejía Zepeda** por todos los comentarios acertados que me brindaron para mejorar este trabajo.

A todos mis **compañeros** del laboratorio de bioquímica por la amistad y apoyo brindados.

Al **Instituto de Investigaciones Químico Biológicas** y a su **personal académico**.

Al **laboratorio de bioquímica** y al **laboratorio de Farmacología** del IIQB, por la facilidad brindada para el uso de sus instalaciones, en especial a la **QFB. Mónica Clemente Guerrero** y a la **Maestra Blanca Nateras Marín** por su apoyo incondicional.

A la **Dra. Esperanza Meléndez Herrera**, por la disponibilidad brindada para el uso de las instalaciones del **INIRENA** para la realización de parte de mi trabajo.

A la **Dra. Sandra Sánchez Ceja** de la facultad de Químico Farmacobiología por la asesoría brindada para la realización de los cortes histológicos.



Tesis apoyada por **CONACYT** a través de la beca 17242

## 1. Resumen general

La hipertensión arterial es uno de los principales factores que predisponen a la enfermedad renal, la cual es una condición incapacitante y de gran impacto socioeconómico en México y el mundo. Diversos estudios han demostrado que el estrés oxidante mitocondrial tiene un papel muy importante durante el daño renal provocado por la hipertensión arterial. En este sentido, se ha encontrado que los sistemas de angiotensina II y la noradrenalina, se encuentran sobreactivados en la hipertensión, lo que favorece la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que generan daño cuando su producción sobrepasa las defensas antioxidantes. Esto da lugar a la disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO $\cdot$ ) e incremento del consumo de O $_2$ , lo que establece un estado de hipoxia en el riñón que desencadena fibrosis y pérdida irreversible de la función renal. Los receptores adrenérgicos  $\alpha_1$  y los receptores AT $_1$  a angiotensina II comparten gran parte de la vía de señalización que modula sus efectos en la vasculatura. Sin embargo, se desconoce si la sobreactivación  $\alpha_1$ -adrenérgica participa en la producción excesiva de especies reactivas durante el daño renal hipertensivo. En la actualidad nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la administración de aceite de aguacate (AO) disminuye el estrés oxidante mitocondrial en diferentes modelos de enfermedad en ratas. En este trabajo se propone que la administración de AO disminuye la posible producción de estrés oxidante generado por la activación de los receptores AT $_1$  y  $\alpha_1$ -adrenérgicos y repercute benéficamente en la función mitocondrial y renal de ratas hipertensas. Para comprobar esta hipótesis, se compararon los efectos del tratamiento del aceite de aguacate, del losartán (antagonista AT $_1$ ) y la prazosina (antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico) sobre la presión arterial, el estrés oxidante, la función mitocondrial, las respuestas vasorelajantes derivadas del endotelio y su repercusión en el funcionamiento renal de ratas hipertensas inducidas con L-NAME. Se observó que el consumo de AO disminuye en ratas hipertensas la presión arterial, mejora la función mitocondrial renal, incrementa las respuestas vasodilatadoras, disminuye el estrés oxidante mitocondrial, lo que da lugar a una mejor función renal y la prevención del daño fibrótico. Esto sugiere que los efectos benéficos del AO en la vasculatura renal hipertensiva podrían estar mediados por la modulación de los efectos negativos sobre la función mitocondrial producidos por la sobreactivación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y AT $_1$ .

Palabras clave: Angiotensina II, activación  $\alpha_1$ -adrenérgica, estrés oxidante, vasorelajación dependiente del endotelio y función renal.

## 2. Summary

Hypertension is a main factor that predisposes to kidney disease, which is a disabling disease with great socioeconomic impact in Mexico and worldwide. Several studies show that mitochondrial oxidative stress plays a very important role during renal damage caused by hypertension. In this regard, the upregulation of vasoconstrictor hormones such as angiotensin II and norepinephrine promote the overproduction of reactive oxygen and nitrogen species, leading to decreased bioavailability of nitric oxide (NO) and increased  $O_2$  uptake, which favors a hypoxic state in the kidney that triggers fibrosis and irreversible loss of renal function. Both the  $\alpha_1$ -adrenergic and  $AT_1$  receptors share a large part of the signaling pathway that mediates their corresponding vascular functions; however, the role of  $\alpha_1$ -adrenergic system overactivation and the production of reactive species during hypertensive renal damage is unknown. Previous work from our research group has shown that avocado oil (AO) dietary supplementation decreases mitochondrial oxidative stress in different disease models in rats. Thus, in this work, we propose that the administration of AO decreases the oxidative stress generated by the activation of the  $AT_1$  and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors, which improves both mitochondrial and renal functions of hypertensive rats. To test this hypothesis, we compared the effects of avocado oil, losartan (an  $AT_1$  antagonist) and prazosin ( $\alpha_1$ -adrenergic antagonist) on blood pressure, oxidative stress, mitochondrial function and endothelium-dependent vasorelaxation and its influence on renal function in L-NAME-induced hypertensive rats. AO intake significantly decreased the blood pressure of hypertensive rats, improved renal mitochondrial function, increased vasodilator responses in the perfused kidney, and counteracted mitochondrial oxidative stress, which improved renal function and prevented renal fibrotic damage. This suggests that beneficial effects of AO on renal vasculature and kidney hypertensive disease might be mediated by the modulation of negative effects over mitochondrial function produced by upregulated activity of both the  $\alpha_1$ -adrenérgic y  $AT_1$  receptors

Keywords: Angiotensin II,  $\alpha_1$ -adrenergic activation, oxidative stress, endothelium-dependent vasorelaxation and renal function.

### **3. Antecedentes generales**

#### *3.1. Hipertensión arterial*

##### *3.1.1. Definición y clasificación*

La hipertensión arterial (HT), es una enfermedad crónica cuya etiología involucra múltiples factores ambientales y fisiopatológicos aún no bien conocidos, se caracteriza por el aumento persistente de la presión arterial sistólica (PAS) y/o diastólica (PAD) a valores mayores de 140mmHg para la PAS y 90mmHg para la PAD (WHO, 2010). La HT se clasifica en 3 tipos: la hipertensión primaria (también llamada hipertensión esencial o idiopática) que representa el 95% de los casos de hipertensión y se caracteriza porque no se conoce su etiología (Lifton, Gharavi, Geller, y Hughes, 2001), la hipertensión secundaria debida a una causa identificable (Gorostidi, 2015) y la hipertensión sistólica causada por rigidez de la arteria aorta y predomina principalmente durante el envejecimiento (Franklin, 2010).

La génesis y mantenimiento de este trastorno crónico aún no se conocen completamente, en esto participan múltiples factores, dentro de los que se destacan los factores genéticos, la ingesta excesiva de sodio, la edad avanzada, el tabaquismo, la inactividad física y las enfermedades crónicas como la obesidad, las dislipidemias y la diabetes.

##### *3.1.2. Impacto social y económico*

Esta enfermedad en la mayoría de los casos cursa de manera asintomática, por lo que en muchas ocasiones pasa desapercibida y por esta razón es conocida como “el asesino silencioso”. Es un problema grave de salud a nivel mundial y el principal factor de riesgo modificable de mortalidad y morbilidad en el mundo, (WHO, 2010). Esta enfermedad afecta a cerca de 1000 millones de personas en el mundo (~12.5 % de la población mundial), en el 2010 esta enfermedad fue diagnosticada en el 40% de los adultos mayores de 60 años (WHO, 2010) y en México se diagnosticó en el 31.5% de las personas mayores de 20 años en el 2012, cifras que podrían aumentar si se considera que ~50% de las personas con HT desconocen que tienen esta enfermedad (Campos-Nonato et al., 2013; ENSANUT, 2012).

Uno de los principales problemas relacionados a la HT es la ausencia de síntomas, por lo que en México la mitad de las personas que tienen HT lo desconocen. Además, sólo el 50% de las personas que saben que tienen la enfermedad están bajo tratamiento y de estas últimas, sólo la mitad logra mantener presiones arteriales normales pese a estar bajo tratamiento (ENSANUT, 2016).

La HT es un factor de riesgo para la aparición de enfermedades secundarias, de tal manera, que a partir de valores de presión arterial 115/75mmHg, por cada 20mmHg de aumento en la PAS, o 10mmHg de aumento en la PAD, el riesgo de mortalidad cardiovascular se duplica (Prospective Studies Collaboration, 2002), y con ello aumenta el riesgo de daño al corazón, los ojos, el cerebro y el riñón y que, lamentablemente, conduce a desenlaces fatales. La enfermedad renal tiene un gran impacto socioeconómico en México, ya que se estima que en el 2012 el 14% del presupuesto en salud otorgado para el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) fue utilizado para la atención a enfermos con insuficiencia renal crónica (IRC). En México se presentan 1500 casos de IRC por cada millón de habitantes y surgen 40,000 nuevos casos cada año, en total existen 9.9 millones de personas con IRC en México (ENSANUT, 2016).

### *3.2. Regulación de la presión arterial*

La circulación sanguínea mantiene el aporte de nutrientes y de oxígeno y purifica todos los aparatos y sistemas del organismo. La regulación de la presión sanguínea es extremadamente compleja y ocurre a varios niveles mediante la interacción entre sí de diferentes mecanismos de retroalimentación positiva y negativa. A nivel anatómico, varios órganos participan en este sistema de control, entre los que se encuentran el corazón, los riñones, el hígado, los pulmones, las glándulas suprarrenales y los vasos sanguíneos. Estos tejidos son regulados de manera autónoma por el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico, estos órganos a su vez son productores de una variedad de sustancias promotoras de cambios cardiovasculares que actúan de manera directa o indirecta modificando la presión arterial (Guyton y Hall, 1997).

Para el estudio del control de la presión arterial, los mecanismos implicados en su regulación se dividen considerando la rapidez y duración de su efecto. Así, existen mecanismos rápidos (nerviosos y químicos), mecanismos intermedios (físicos y hormonales) y mecanismos lentos (riñón y líquidos corporales). Estos mecanismos trabajan de manera coordinada para mantener presión arterial dentro de los límites fisiológicos (Guyton y Hall, 1997). Dentro de estos sistemas de regulación de la presión arterial, el sistema renina-angiotensina-aldosterona y el sistema nervioso simpático participan de manera preponderante tanto a nivel fisiológico en la regulación de la presión arterial normal como en la fisiopatología de la HT.

### 3.2.1. Regulación de la presión arterial por el sistema renina angiotensina (SRA)

El SRA participa en la regulación de la presión arterial y en la homeostasis de los líquidos corporales. La angiotensina II (Ang II) es el efector final de este sistema, causa vasoconstricción directa o indirecta por estimulación principalmente del receptor  $AT_1$  presente en la vasculatura, lo que incrementa el tono simpático (Goodman et al, 1996). La Ang II regula la presión de manera crónica al modular el sodio renal y la reabsorción de agua a través de la estimulación de receptores  $AT_1$  en el riñón, o indirectamente al estimular la producción y secreción de aldosterona de las glándulas adrenales o al estimular la sensación de sed en el sistema nervioso central (Goodman et al, 1996). La cascada enzimática por la que la Ang II es producida consiste en varios elementos: la renina, una aspartil proteasa que rompe a la proteína angiotensinógeno y que genera un decapeptido denominado angiotensina I. Después, la Ang I sufre la pérdida de dos aminoácidos más para dar lugar al octapéptido Ang II, la molécula fisiológicamente activa de este sistema (Lu, Roksnoer, y Danser, 2013). Como se mencionó antes las acciones de la Ang II resultan de su unión a receptores específicos ( $AT_1$  y  $AT_2$ ) y de manera predominante al receptor  $AT_1$  (Sayeski y Bernstein, 2001), los cuales están situados en la membrana celular y se acoplan a proteínas G. El SRA intrarrenal regula la presión arterial sistémica y ciertos aspectos de la función renal tales como el flujo y reabsorción de sodio (Goodman et al, 1996).

El SRA participa en la regulación de la presión arterial a corto y a largo plazo, los factores que disminuyen la resistencia periférica total activan la liberación de renina a partir de los riñones. La secreción de renina está controlada por dos mecanismos intrarenales y un mecanismo que funciona a través del sistema nervioso simpático (SNS). En el primero, denominado vía de la mácula densa, el incremento de flujo de NaCl a través de la mácula densa inhiben la liberación de renina, y la disminución del flujo la estimulan; el segundo, denominado vía del baroreceptor intrarrenal, los incrementos y decrementos de la presión de perfusión de los vasos preglomerulares inhiben y estimulan la liberación de renina, respectivamente (Goodman et al, 1996).

Una vez formada, la Ang I da lugar a la formación de Ang II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual ha sido ampliamente utilizada como blanco terapéutico de la hipertensión. Los efectos de la Ang II son mediados principalmente por la activación de los receptores  $AT_1$  (que tienen alta afinidad por el losartán, fármaco antihipertensivo) acoplados a proteínas G (Timmermans et al., 1993).

### 3.2.2. Sistema nervioso simpático (SNS) en la regulación de la presión arterial

Una de las funciones más importantes del control de la circulación por el sistema nervioso consiste en elevar de manera rápida la presión arterial. El SNS, que inerva la mayoría de los vasos sanguíneos, desempeña su papel en la regulación de la presión arterial sistémica mediante la liberación de noradrenalina de las terminales nerviosas simpáticas, la cual se une y activa a receptores específicos que se encuentran en la membrana de las células del músculo liso vascular, produciendo a su vez una cascada de señalización intracelular que da como resultado modificaciones en el tono vascular. Estos receptores son conocidos como receptores adrenérgicos (Guyton y Hall, 1997).

#### 3.2.2.1. Receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos son un grupo heterogéneo de receptores que se encuentran situados en la membrana de las células del músculo liso vascular, constan de 7 segmentos transmembranales con el extremo amino terminal en la parte extracelular y el extremo carboxilo terminal en la parte intracelular. Estos receptores son estimulados por la adrenalina y la noradrenalina que actúan como neurotransmisores y hormonas tanto en la periferia como en el sistema nervioso central (Goodman et al., 1996). El conocimiento puntual de la participación de los receptores adrenérgicos en la regulación de la presión arterial proporciona herramientas para contrarrestar enfermedades cardiovasculares, ya que estos receptores son blanco en la terapéutica de varias enfermedades de este tipo, y para ello ha sido de crucial importancia su caracterización, para lo cual se han utilizado técnicas de biología molecular y de farmacología que han permitido el descubrimiento de al menos nueve subtipos de receptores adrenérgicos clonados y caracterizados farmacológicamente (Tabla 1).

**Tabla 1.** Nomenclatura de los receptores adrenérgicos con las proteínas G a las que se encuentran acoplados y los segundos mensajeros involucrados en la traducción de la señal.

**Familia de receptores adrenérgicos**

1	1A, 1B $\gamma$ 1D	2	2A, 2B $\gamma$ 2C	1, 2 $\gamma$ 3
	Proteína G <sub>q/11</sub>		Proteína G <sub>i</sub>	Proteína G <sub>s</sub>
	Incremento de Ca <sup>+2</sup> citosólico		Disminución de AMPc	Aumento de AMPc

**3.2.2.2. Papel y distribución de los subtipos de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos**

Los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos son mediadores importantes de las respuestas del SNS involucradas en la homeostasis cardiovascular, tales como la contracción cardíaca y del músculo liso vascular. Al igual que los otros receptores adrenérgicos, los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos son activados por las catecolaminas noradrenalina y adrenalina (Goodman et al., 1996). Estudios *in vitro* han revelado que la contracción del músculo liso vascular inducida por la noradrenalina y otros agonistas adrenérgicos en preparaciones vasculares de varias especies de mamíferos es mediada predominantemente por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Villalobos-Molina y Gallardo-Ortiz, 2005).

**3.2.3 Mecanismos de transducción de señal en la contracción (receptores AT<sub>1</sub> y  $\alpha_1$ -adrenérgicos)**

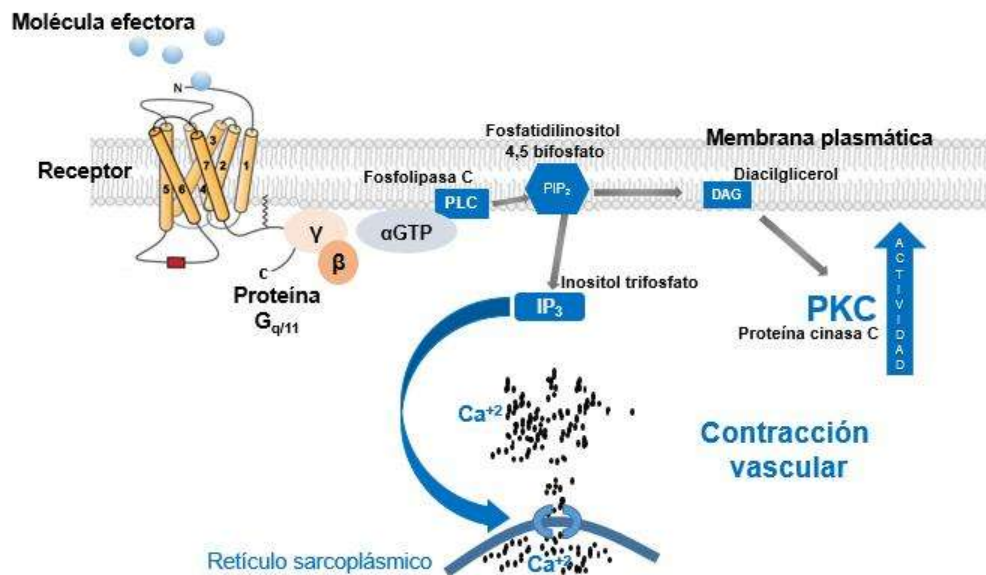
El SRA y el SNS comparten una ruta de señalización similar una vez que su molécula efectora alcanza y activa a sus receptores en la membrana de las células del músculo liso vascular. Ambos receptores se encuentran acoplados a proteínas G<sub>q/11</sub>, su activación resulta en una serie de eventos que incluyen la generación de segundos mensajeros y reacciones de fosforilación de proteínas (figura 1).

Las proteínas G forman parte de una superfamilia de proteínas heterotriméricas y desempeñan un papel muy importante en los procesos de señalización transmembranal; estas proteínas constituyen la parte central de un sofisticado mecanismo molecular el cual es capaz de recibir, integrar y procesar información del ambiente extracelular. Las proteínas G, consisten en una subunidad  $\alpha$  la cual une e hidroliza guanosín trifosfato (GTP), y un complejo no disociable  $\beta\gamma$  que interactúa con proteínas efectoras (Hamm y Gilchrist, 1998). En el estado basal, el complejo  $\beta\gamma$  y la subunidad  $\alpha$  unida a GDP se encuentran asociados; de esta forma, la proteína G puede ser reconocida por un receptor activado y esta interacción da como resultado la disociación de GDP de la subunidad  $\alpha$  y es reemplazado



por GTP; a su vez, esto promueve un cambio conformacional dando como resultado la disociación del complejo; por lo tanto, la subunidad  $\alpha$  y el complejo  $\beta\gamma$  son capaces de interactuar con proteínas efectoras. Finalmente, la actividad de GTPasa inherente a la subunidad  $\alpha$  de la proteína G termina por hidrolizar el GTP a GDP terminando así con la conformación activa de esta subunidad, quedando una vez más las subunidades de la proteína G ensambladas (Hamm y Gilchrist, 1998).

Los receptores  $AT_1$  y  $\alpha_1$  adrenérgicos se encuentran acoplados a la proteína  $G_{q/11}$ , que al ser activada hidroliza fosfolípidos de membrana al activar a la enzima fosfolipasa C (PLC) (Lefkowitz et al., 1996), dando como producto la liberación de inositol trifosfato ( $IP_3$ ) y diacil glicerol (DAG). El primero se une y activa receptores específicos de la membrana del retículo sarcoplásmico, produciendo la liberación de  $Ca^{+2}$  citosólico y finalmente activando la maquinaria contráctil de actina-miosina (Xu, Harder, Uman, y Craig, 1996), generando aumento de la tensión arterial (Figura 1). Por su parte, el DAG activa la proteína cinasa C (PKC), la cual fosforila una gran cantidad de sustratos, entre los que se encuentra la subunidad p47phox de la enzima NADPH oxidasa (Dikalov et al., 2014). El sistema NADPH oxidasa es un complejo multiproteico encargado de producir ERO en diferentes células y tejidos.



**Figura 1.** Mecanismo general de contracción vascular mediado por proteína  $G_{q/11}$ . Modificada de Cotecchia, 2010.

#### 4. Antecedentes específicos

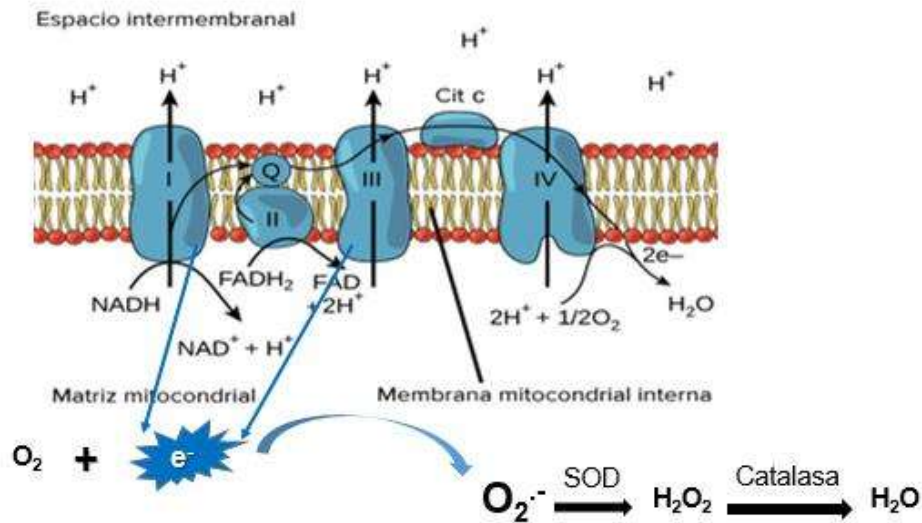
##### 4.1. Hipertensión y estrés oxidante

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN) se generan de manera fisiológica como subproducto del metabolismo del  $O_2$  y participan en la señalización celular, sin embargo, bajo ciertas circunstancias, la generación de estas especies se incrementa o su concentración supera la capacidad de las defensas antioxidantes de neutralizarlas, generando estrés oxidante.

Ciertas enfermedades como la hipertensión cursan con un desequilibrio entre la producción de ERO y los sistemas antioxidantes favoreciendo el estrés oxidante, y como consecuencia estas dañan componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN, causando deterioro en la función de las biomoléculas.

Existen numerosos sitios en la célula de generación de ERO *in vivo*, entre los cuales uno de los más importantes, incluso en estados patológicos como la hipertensión, es la mitocondria (Murphy, 2009). Este orgánulo es la principal fuente de generación de ATP en la célula por la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en la cadena de transporte de electrones (CTE) (Fig 2). Durante el funcionamiento de la CTE se lleva a cabo la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$ , los electrones son donados por el NADH o el succinato a los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa), respectivamente. La ubiquinona o coenzima  $Q_{10}$  acepta los electrones de estos dos complejos y sufre dos semireacciones de reducción a ubisemiquinona y ubiquinol, recibiendo un electrón a la vez (ciclo Q). Estos electrones posteriormente son transferidos al complejo III (ubiquinol-citocromo *c* oxidorreductasa), al citocromo *c* y al complejo IV (citocromo *c* oxidasa). El complejo IV acopla la reducción de oxígeno a agua y la bomba de protones, translocando protones ( $H^+$ ) de la matriz al espacio intermembrana junto con los complejos I y III. Esto genera un gradiente de protones que es usado por la  $F_1F_0$ ATP sintasa para formar ATP vía la fosforilación oxidativa (Chen, Thomas, Albano, Murphy, y Keane, 2004)(Fig. 2).

Sin embargo, debido a la ocurrencia de reacciones colaterales en los complejos de la CTE, ocurre la reducción parcial del  $O_2$ , dando como resultado la formación de radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Se ha identificado la producción de  $O_2^{\cdot-}$  la transferencia de electrones entre los grupos prostéticos del complejo III y también durante la transferencia de electrones a través del complejo I. La formación de  $O_2^{\cdot-}$  se da de manera normal en el 2-4% del oxígeno consumido por la mitocondria, sin embargo, en condiciones patológicas como la hipertensión este porcentaje aumenta significativamente (Murphy, 2009) (figura 2).



**Figura 2.** Cadena de transporte de electrones en la mitocondria, fosforilación oxidativa y generación de especies reactivas de oxígeno. Modificada de Murphy, 2009

Se sabe que un aumento en el estrés oxidante que se genera durante la HT juega un papel clave en el desarrollo de sus complicaciones, lo cual incluye el daño renal (de Cavanagh et al., 2006). Diversas investigaciones muestran que la disminución del estrés oxidante mejora el pronóstico de la HT, a este respecto, la enfermedad renal hipertensiva cursa con factores negativos que son consecuencia de estrés oxidante.

#### 4.2. Daño renal en la hipertensión

La hipertensión arterial altera la función y morfología de los riñones, provocando pérdida de glomérulos, aumento en la tasa de filtración glomerular de los glomérulos remanentes, lo que incrementa la HT y por lo tanto, el deterioro funcional (Zehnder, 2005). Un mecanismo de daño renal es el causado por el estrés oxidante generado durante la HT, sin embargo las rutas que conducen al daño oxidante no son completamente conocidas (de Cavanagh et al., 2006). Una probable ruta de estrés oxidante involucra la activación de receptores acoplados a proteínas G, cuya activación es dependiente de Ang II del SRA y por activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos por noradrenalina, de los cuales, ambos sistemas se cree participan en la génesis o mantenimiento de la hipertensión arterial (Qiu, Engels, y Baylis, 1994; Raveendran, Parasuraman, y Priyadharsini, 2014; Wangensteen, Valle, Del, Vargas, y Osuna, 2002).

Se ha demostrado que la activación de los receptores  $AT_1$  por Ang II promueve un aumento del estrés oxidante celular en diversos lechos vasculares (de Cavanagh et al., 2006), sin embargo pocas evidencias involucran la participación de la activación de

receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos sobre la producción de ERO y el estrés oxidante (Hao, Nishimura, Wo, y Fernandez-Patron, 2006), no obstante, se sabe que ambos sistemas se encuentran sobreestimulados durante la hipertensión arterial y que además comparten la misma ruta de señalización que promueve su efecto vasoconstrictor (de Cavanagh et al., 2006; Koriyama et al., 2015; Villalobos-Molina y Gallardo-Ortiz, 2005).

La proteína cinasa C (PKC) se activa por el DAG generado por la activación de la proteína  $G_{q/11}$  posterior al agonismo de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos o los receptores  $AT_1$ . La PKC puede a su vez estimular la actividad de la NADPH oxidasa, lo que promueve un incremento en la formación de  $O_2^{\cdot-}$ , el cual rápidamente reacciona con el óxido nítrico (NO) para formar peroxinitrito (ONOO $^-$ ), el cual, además de carecer de efecto vasodilatador, es capaz de modificar un gran número de biomoléculas entre las que se encuentran aminoácidos, proteínas, enzimas y cofactores de enzimas (Dikalova et al., 2010). El ONOO $^-$  puede inducir nitración de residuos de tirosina dando lugar a la formación de 3-nitrotirosina (3-NT)(Choi, Allahdadi, Tostes, y Webb, 2011). Uno de los blancos de esta molécula es la mitocondria, a la cual causa daño estructural, funcional, y estrés oxidativo (Dencher et al., 2013). En este sentido, se ha demostrado que la Ang II estimula la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en la mitocondria de una manera dependiente de la NADPH oxidasa (Dikalova et al., 2010). Esto sugiere que existe una interacción entre la NADPH oxidasa y la producción mitocondrial de  $O_2^{\cdot-}$ , dando lugar a un círculo vicioso de generación de ERO, ya que el radical  $O_2^{\cdot-}$  puede estimular la actividad de la NADPH oxidasa, generando ciclo de retroalimentación positiva que perpetúa la generación nociva de ERO y ERN, disminuye la biodisponibilidad de NO $^*$  y por consecuencia, da lugar a un aumento de la presión arterial de manera constante (Dikalova et al., 2010).

Se ha sugerido que este círculo vicioso de generación de ERO tiene un papel muy importante durante el daño renal por hipertensión, debido a que el aumento en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  y de ONOO $^-$  disminuye la biodisponibilidad del NO $^*$  como agente vasodilatador, favoreciendo el aumento de la presión en el riñón y promoviendo cambios estructurales a nivel circulatorio y morfológicos en las nefronas (de Cavanagh et al., 2006). Por otra parte, otra consecuencia del estrés oxidante a nivel renal es la generación de hipoxia por el aumento del consumo de  $O_2$  por la enzima NADPH oxidasa y por la generación de ERO en la mitocondria, lo cual se favorece por las tensiones bajas de  $O_2$  que el riñón mantiene de manera fisiológica. Bajo estas circunstancias, la hipoxia que activa el factor inducido por hipoxia (HIF- $\alpha$ ), el cual inhibe a la colagenasa, provoca la acumulación de colágeno en la

matriz extracelular e induce fibrosis renal y pérdida irreversible de la función renal (Higgins, Kimura, Iwano, y Haase, 2008; Welch, 2006).

El papel del estrés oxidativo en el desarrollo de la hipertensión y sus complicaciones ha sido evidenciado por el uso de antioxidantes dirigidos hacia la mitocondria que se acumulan en este orgánulo de una manera dependiente del potencial de membrana mitocondrial al estar constituidos por un catión trifenílfosfonio (TPP<sup>+</sup>) (Pokrzywinski, Biel, Kryndushkin, y Rao, 2016). Dikalova et al., (2010) demostraron que la terapia con el antioxidante mitocondrial mitoTEMPO disminuye en la vasculatura la producción mitocondrial de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y de ONOO<sup>-</sup>, aumenta los niveles de NO<sup>\*</sup> y disminuye la presión arterial en ratas hipertensas inducidas mediante la infusión con Ang II. Por lo anterior, se ha propuesto al estrés oxidante mitocondrial como un blanco terapéutico para la hipertensión arterial y el daño renal consecuente.

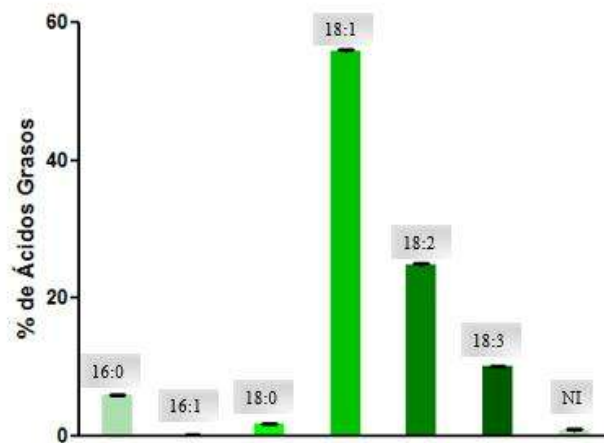
#### 4.3. El aceite de aguacate

En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado el efecto benéfico de la ingesta del aceite de aguacate (AO) sobre la función mitocondrial y el estrés oxidante en diferentes órganos de ratas diabéticas (Ortiz-Avila et al., 2013, 2015, 2017).

El aguacate (*Persea americana*), es una especie arbórea perteneciente a la familia *Lauraceae*, originaria de Mesoamérica. Su fruto, el aguacate o palta, es una baya comestible. En el aguacate se pueden encontrar compuestos como carotenoides, tocoferoles y fitosteroles (Tabla 2). Del fruto del aguacate se puede obtener el aceite que mantiene como componente mayoritario al ácido oleico, así como otros ácidos grasos (figura 3).

**Tabla 2.** Compuestos presentes en el aguacate. Tomada y modificada de (Berasategi, 2012; Dreher y Davenport, 2013).

Carotenoides	<ul style="list-style-type: none"><li>• -caroteno, -caroteno, -criptoxantina, luteína, zeaxantina y violaxantina</li></ul>
Tocoferoles	<ul style="list-style-type: none"><li>• -tocoferol, -tocoferol, -tocoferol y -tocoferol</li></ul>
Esteroles	<ul style="list-style-type: none"><li>• -sitosterol, <math>\beta</math> sitosterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, lanosterol, sitostanol, <math>\beta</math> 5 y 7 avenasterol, -amirina, lupeol + gramisterol y cicloartenol</li></ul>



**Figura 3.** Ácidos grasos presentes en el aceite de aguacate. Tomada y modificada de Ortiz-Avila et al., 2015.

## 5. Justificación

La hipertensión arterial es un problema grave de salud a nivel mundial, y una de sus principales consecuencias es el daño renal, el cual es potenciado por la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), se sabe que el sistema adrenérgico y el sistema renina angiotensina generan respuestas vasopresoras exacerbadas, de este último se tienen evidencias que participa en la formación de ERO potenciando también el estrés oxidante mitocondrial y generando más ERO, sin embargo, se desconoce el papel del sistema adrenérgico durante el daño renal relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno durante la hipertensión. En este respecto, se tienen evidencias de que el aceite de aguacate puede prevenir el estrés oxidante mitocondrial del riñón.

Por lo anterior, se considera importante evaluar el efecto de la administración del aceite de aguacate sobre la reactividad vascular adrenérgica y la función mitocondrial en riñón de ratas hipertensas.

## 6. Hipótesis

El aceite de aguacate disminuye el daño vascular inducido por la activación adrenérgica previniendo el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial en el riñón de ratas hipertensas.

## 7. Objetivos

### 7.1 *Objetivo general*

Evaluar si la administración del aceite de aguacate disminuye el daño renal inducido por la actividad adrenérgica al prevenir el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial en el riñón de ratas hipertensas.

### 7.2. *Objetivos específicos*

1. Evaluar el efecto del aceite de aguacate sobre la presión arterial en ratas hipertensas.
2. Determinar el efecto del aceite de aguacate sobre la respuesta vascular renal inducida por activación adrenérgica durante la hipertensión.
3. Analizar la relación entre la actividad adrenérgica y el estrés oxidativo mitocondrial en el riñón de rata hipertensa.
4. Comparar el efecto del aceite de aguacate, un antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico y un antagonista AT1 en el daño renal inducido por la hipertensión.



## 8. Resultados

Los resultados de esta investigación se presentan divididos en dos capítulos.

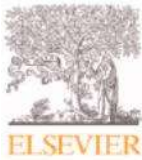
**Capítulo 1.** Corresponde a los experimentos realizados con la finalidad de comparar el efecto del aceite de aguacate y el antihipertensivo losartan sobre la presión arterial, la función vascular renal y el estrés oxidante mitocondrial en ratas con hipertensión.

Márquez-Ramírez, C. A., Hernández de la Paz, J. L., Ortiz-Avila, O., Raya-Farias, A., González-Hernández, J. C., Rodríguez-Orozco, A. R., Cortés-Rojo, C. (2018). Comparative effects of avocado oil and losartan on blood pressure, renal vascular function, and mitochondrial oxidative stress in hypertensive rats. *Nutrition*, 54, 60–67. <http://doi.org/10.1016/j.nut.2018.02.024>

**Capítulo 2.** Corresponde a los experimentos realizados con la finalidad de comparar el efecto del aceite de aguacate y el antihipertensivo prazosina sobre la presión arterial, la función renal, la función vascular renal y el estrés oxidante mitocondrial en nuestro modelo de hipertensión en ratas.

## 8.1 Capítulo 1.

Nutrition 54 (2018) 60–67



Contents lists available at ScienceDirect

Nutrition

journal homepage: [www.nutritionjrn.com](http://www.nutritionjrn.com)



Basic nutritional investigation

### Comparative effects of avocado oil and losartan on blood pressure, renal vascular function, and mitochondrial oxidative stress in hypertensive rats



Cristian Adrián Márquez-Ramírez M.Sc.<sup>a</sup>, José Lucio Hernández de la Paz M.Sc.<sup>b</sup>, Omar Ortiz-Avila Ph.D.<sup>a</sup>, Andrés Raya-Farías M.Sc.<sup>b</sup>, Juan Carlos González-Hernández Ph.D.<sup>c</sup>, Alain Raimundo Rodríguez-Orozco Ph.D.<sup>b</sup>, Rafael Salgado-Garciglia Ph.D.<sup>a</sup>, Alfredo Saavedra-Molina Ph.D.<sup>a</sup>, Daniel Godínez-Hernández Ph.D.<sup>a</sup>, Christian Cortés-Rojo Ph.D.<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

<sup>b</sup>Facultad de Medicina "Dr. Ignacio Chávez.", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Mexico

<sup>c</sup>Instituto Tecnológico de Morelia, Morelia, Mexico

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 22 June 2017

Received in revised form

6 February 2018

Accepted 21 February 2018

##### Keywords:

Angiotensin II

Hypertension

Kidney

*Persea americana*

Reactive oxygen species

#### ABSTRACT

**Objective:** Angiotensin II (Ang-II) antagonism alleviates hypertensive kidney damage by improving mitochondrial function and decreasing oxidative stress. This condition also is associated with altered renal vascular tone due to enhanced constriction by Ang-II. Thus, approaches ameliorating these events are desirable to alleviate kidney damage. Avocado oil, a source of antioxidants and oleic acid, is known to improve mitochondrial function, while oleic acid has antihypertensive effects. Therefore, the aim of this study was to test whether avocado oil counteracts, to a similar degree as the Ang-II blocker losartan, the deleterious effects of hypertension on blood pressure, renal vascular performance, kidney mitochondrial function, and oxidative stress.

**Methods:** Hypertensive rats induced with N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) were supplemented during 45 d with avocado oil or losartan. Vascular responses were analyzed in perfused kidney. Membrane potential, reactive oxygen species levels, and glutathione were analyzed in isolated kidney mitochondria.

**Results:** In hypertensive rats, avocado oil decreased 21.2% and 15.5% diastolic and systolic blood pressures, respectively, and alleviated impaired renal vasodilation. Hypertension decreased membrane potential by 83.7% and augmented reactive oxygen species levels by 51% in mitochondria fueled with a complex I substrate, whereas it augmented the levels of oxidized glutathione in 48%. These alterations were normalized by avocado oil at a comparable degree to losartan.

**Conclusions:** Because avocado oil mimicked the effects of losartan, we propose that the effects of avocado oil might be mediated by decreasing the actions of Ang-II on mitochondria. These results suggest that avocado oil intake might be a nutritional approach to attenuate the deleterious effects of hypertension on kidney.

© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

This work was supported by Programa de Investigación 2016 to 2017 de la Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México [1821440 CCR]. CCR, DGH, and ARRO conceived and designed the experiments. CAMR, JLHP, OOA, and ARF performed the experiments. CCR, DGH, ASM, and RSG analyzed and interpreted the results. CCR, JCGH, ARRO drafted the manuscript. All the authors approved the final version of the manuscript. The authors have no conflicts of interest to declare.

\* Corresponding author. Tel.: +52 443 326 5790; fax: +52 443 326 5788.

E-mail address: [christiancortesrojo@gmail.com](mailto:christiancortesrojo@gmail.com) (C. Cortés-Rojo).

<https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.02.024>

0899-9007/© 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are increasingly recognized as key modulators of a myriad of physiological processes [1]. However, ROS production may overcome the antioxidant capabilities of the cell, leading to oxidative stress, loss of cell function, and tissue degeneration. This occurs during hypertension, where angiotensin II (Ang-II) plays a prominent role in the development of vascular alterations through excessive ROS production

[2] and increased vasoconstriction by converting the vasodilator agent nitric oxide (NO) into peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>) [3]. Mitochondrial ROS has a central role in the pathogenesis of hypertension because the use of some mitochondria-targeted antioxidants decreased blood pressure (BP) by improving NO bioavailability during Ang-II-induced hypertension [4,5].

Altered renal vascular tone by Ang-II also plays a role in the development of hypertensive kidney disease [6]; however, the sole normalization of BP is not enough to delay this complication [7,8]. For example, it has been demonstrated that losartan, an antihypertensive drug that antagonizes AT<sub>1</sub> receptors for Ang-II, prevents kidney damage while it counteracts mitochondrial dysfunction in the kidneys of spontaneously hypertensive rats (SHRs). In contrast, amlodipine, a calcium blocker, decreased systemic BP at the same degree as losartan but did not prevent neither renal damage nor mitochondrial dysfunction [9]. Moreover, in stroke-prone SHRs, kidney damage was attenuated by the treatment with MitoQ, a mitochondria-targeted antioxidant [10]. These data suggest that the amelioration of mitochondrial function is essential for the prevention of kidney damage during antihypertensive therapy.

We have shown that avocado oil intake mitigates ROS production; improves the activity of the electron transport chain (ETC) complexes; and decreases oxidative stress in the liver, brain, and kidney mitochondria of diabetic animals [11–13]. This was attributed to a variety of bioactive molecules contained in avocado oil, including lipophilic antioxidants and oleic acid (C18:1), its main fatty acid. Taking into account these findings and that mitochondrial dysfunction due to exacerbated actions of Ang-II is involved in vascular dysfunction during hypertension [14], we aimed to compare the effects of avocado oil and losartan supplementation on BP, kidney vascular responses to Ang-II, mitochondrial function, and oxidative stress in the kidney from rats treated with N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an animal model of hypertension that exhibits hypersensitivity to kidney vascular responses to Ang-II [15].

## Methods

### Animals and experimental groups

Male Wistar rats weighing 250 to 350 g were distributed into five groups of eight animals each: control (CTRL), consisting of rats fed with rodent chow (Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet, St. Louis, MO, USA); control rats plus avocado oil (CTRL+AO), which were supplemented with a commercial presentation of avocado oil (Ahuacatlan, DIRICOM S.A. de C.V., México); hypertensive rats (HT), which were administered L-NAME (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); hypertensive plus avocado oil (HT+AO), consisting of animals administered with both L-NAME and avocado oil; hypertensive plus losartan (HT+Los), which were administered L-NAME and losartan (Merck Sharp & Dohme, Kenilworth, NJ USA). Avocado oil fatty acid composition was reported previously and consisted of 55.9% C18:1, 24.9% C18:2, 10.1% C18:3, 5.92% C16:0, 1.86% C18:0, 0.2% C16:1 and 0.92% of a nonidentified fatty acid [12]. Rats in the HT, HT+AO, and HT+Los groups received 75 mg/kg of L-NAME alone over 15 d to induce hypertension [15]. Over the next 45 d, 50 mg/kg of L-NAME was given alone or concomitantly with avocado oil at a daily dose of 1 mL/250 g by gavage or losartan at a daily dose of 40 mg/kg in the drinking water [9]. L-NAME administration was maintained to avoid regression of hypertension by L-NAME withdrawal [16]. The animals were kept in a biotarium with controlled temperature, cycles of 12-h light/12-h darkness and food and water ad libitum. At the end of the treatments, the animals were sacrificed by deep anesthesia via the intraperitoneal administration of 55 mg/kg sodium pentobarbital for determinations of renal vascular function, for which the right kidney was used. Rats were sacrificed by decapitation for mitochondria isolation and both kidneys were used. Decapitation was carried out because barbiturates are known to impair energetic metabolism of isolated mitochondria [17,18]. Four sets of eight rats per groups were used as follow: one set for blood pressure and renal reactivity to Ang-II; one set for NO and renal reactivity to carbachol; two sets for mitochondrial determinations. All the animal procedures were carried out according to the Federal Regulations for the Use and

Care of Animals (NOM-062-ZOO-1999, Ministry of Agriculture, Mexico), and were also approved by the Institutional Bioethics and Biosecurity Committee of the Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### Evaluation of blood pressure and renal vascular responses

BP was measured in conscious animals by a noninvasive, tail-cuff method using a CODA Monitor (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Rats were placed in a holder 5 min before the determinations and three recordings for systolic (SBP) and diastolic (DBP) pressures were made for each animal during the final 3 d of the treatment. All the procedures were made accordingly to the instructions of the manufacturer.

The response of renal vasculature to vasoconstrictor or vasodilator agents was assessed according to a previous study [15]. Briefly, deep anesthesia was induced by the intraperitoneal administration of 55 mg/kg sodium pentobarbital. The right renal artery was cannulated; the kidney was dissected and placed in a Langerdorff perfusion chamber. The kidney was perfused with a Krebs-Henseleit buffer at 37°C containing 118 mM NaCl, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 11.7 mM glucose, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, and 0.026 mM EDTA (pH 7.4). Buffer was bubbled with 95% oxygen and 5% carbon dioxide and the flux was set to 10 mL/min. Before the experimental protocol, perfusion was carried out for 1 h to allow kidney stabilization. Vasoconstrictor responses were determined by evaluating the changes in perfusion pressure in response to the bolus addition of Ang-II at concentrations of 0.1  $\mu$ M (log 10<sup>-7</sup> M), 1  $\mu$ M (log 10<sup>-6</sup> M), 10  $\mu$ M (log 10<sup>-5</sup> M), 100  $\mu$ M (log 10<sup>-4</sup> M), and 1000  $\mu$ M (log 10<sup>-3</sup> M). The changes in the perfusion pressure were evaluated with a Grass FT03 pressure transducer (Astro-Med, Inc. West Warwick, RI, USA).

Endothelium-dependent vasodilation was determined in kidneys from a different set of rats than the group used for evaluation of constrictor responses. After the kidney was perfused and stabilized as described previously, a continuous administration of 1  $\mu$ M Ang-II was carried out at 10 mL/h. Once a stable perfusion pressure was achieved, a concentration–response curve to carbachol was obtained by the bolus addition of carbachol at concentrations of 1  $\mu$ M (log 10<sup>-6</sup> M), 10  $\mu$ M (log 10<sup>-5</sup> M), 100  $\mu$ M (log 10<sup>-4</sup> M), 1000  $\mu$ M (log 10<sup>-3</sup> M), and 10 000  $\mu$ M (log 10<sup>-2</sup> M). Data were analyzed by determining the change in perfusion pressure ( $\Delta$ mm Hg) obtained after the addition of each concentration of agonist (i.e., Ang-II or carbachol) and the perfusion pressure observed in the absence of agonists.

### Measurement of NO levels

Blood was collected by heart puncture immediately after kidney extraction. Serum was separated by centrifugation at 3500 RPM for 15 min and deproteinization was carried out by incubating 200  $\mu$ L serum with 800  $\mu$ L absolute ethanol for 17 h and subsequent centrifugation at 20 000 RPM for 10 min. Centrifugations were carried out with the rotor SS-34 of a Sorvall centrifuge. NO levels were assessed by the Griess assay, according to the method of Miranda et al. [19].

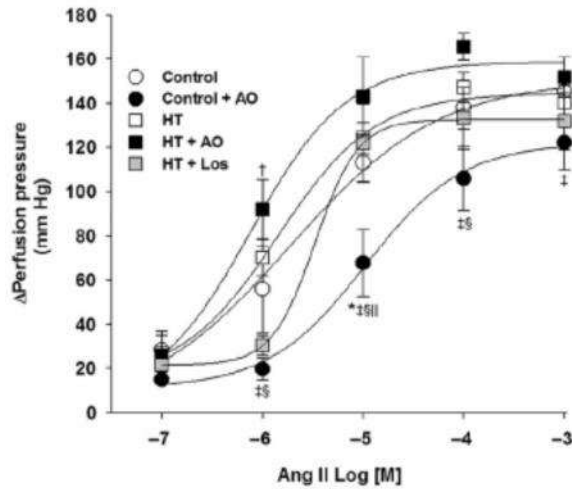
### Determination of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi$ )

Kidney mitochondria were isolated by differential centrifugation [11]. Mitochondria (0.5 mg/mL), were resuspended in a quartz cuvette containing 2 mL of a medium with 100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, and 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4). 2  $\mu$ M safranin O was added and the determination was started by measuring the basal fluorescence ( $\lambda_{ex}$  = 495 nm;  $\lambda_{em}$  = 586 nm) of the sample during 30 s. Then, mitochondria were energized with 10 mM glutamate/malate or 10 mM succinate plus 2  $\mu$ M rotenone and the changes in the fluorescence were further followed for 1 min. The changes in safranin O fluorescence were measured in a Shimadzu RF5301 PC spectrofluorometer. The data were expressed as the change in the fluorescence ( $\Delta F$ ) obtained by subtracting the maximum fluorescence observed after the addition of substrates minus the basal fluorescence before the addition of substrates.

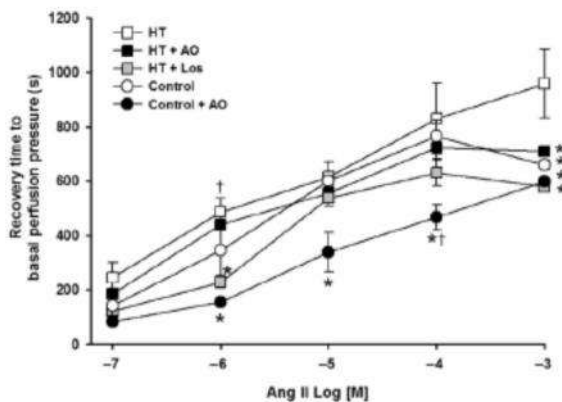
### Assessment of ROS levels and oxidative stress

ROS production was assayed in isolated kidney mitochondria by measuring the changes in the fluorescent probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA) in response to the addition of respiratory substrates as previously described [12], except that 1  $\mu$ g antimycin A and 0.75 mM potassium cyanide were added to enhance ROS generation. Redox status of glutathione was evaluated in mitochondria according to [20].





**Fig. 1.** Effects of avocado oil (AO) or losartan (Los) on renal vasoconstriction induced by angiotensin-II. The results are presented as the mean  $\pm$  SE.  $n = 8, 8, 7, 5,$  and  $5$  for CTRL, HT, CTRL+AO, HT+AO, and HT+Los groups, respectively.  $^*P > 0.05$  CTRL+AO vs CTRL;  $^\dagger P > 0.05$  HT-AO vs HT+Los;  $^\ddagger P > 0.05$  CTRL-AO vs HT;  $^\S P > 0.05$  CTRL-AO vs HT+AO;  $^\P P > 0.05$  CTRL-AO vs HT+Los. Ang, angiotensin; CTRL, control; HT, hypertension.



**Fig. 2.** Recovery time to basal perfusion pressure after the contraction with angiotensin-II in kidneys from control rats treated with avocado oil and HT animals treated with avocado oil (AO) or losartan (Los).  $n = 8, 8, 7, 5,$  and  $5$  for CTRL, HT, CTRL+AO, HT+AO, and HT+Los groups, respectively.  $^*P < 0.05$  vs control;  $^\dagger P < 0.05$  vs HT. Ang, angiotensin; CTRL, control; HT, hypertension.

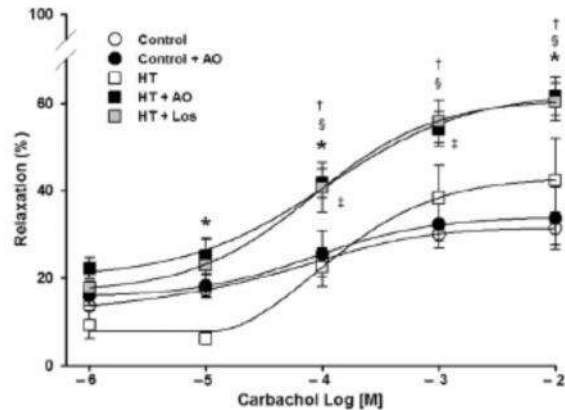
#### Statistical analysis

Data were expressed as the mean  $\pm$  SE of at least three different determinations, using samples from different animals. Statistical significances ( $P < 0.05$ ) were determined with analysis of variance and Tukey's post-hoc test except for the Figures 1, 2, and 3, where Bonferroni's test was used. The tests were carried out with Sigma Plot v11.0 software (Systat Software, San Jose, CA, USA).

#### Results

##### Avocado oil and losartan decrease BP in hypertensive rats

Control rats exhibited SBP and DBP values of  $119.5 \pm 2.6/83.1 \pm 2.2$  mm Hg, respectively, which increased in hypertensive



**Fig. 3.** Effect of avocado oil (AO) or losartan (Los) on endothelium-dependent renal vasodilation. Concentration–response curves to carbachol were carried out in isolated perfused kidneys from Control (CTRL) or hypertensive (HT) animals treated over 45 d with AO or Los. The results are presented as the mean  $\pm$  SE.  $n = 8, 8, 7, 5,$  and  $5$  for CTRL, HT, CTRL+AO, HT+AO, and HT+Los groups, respectively.  $^*P > 0.05$  HT+AO vs HT;  $^\dagger P > 0.05$  HT+Los vs HT;  $^\ddagger P > 0.05$  HT+AO vs CTRL;  $^\S P > 0.05$  HT+Los vs CTRL.

rats to  $179.4 \pm 4.9/139.9 \pm 4.7$  mm Hg (Figs. 4A, B). This was paralleled to a twofold decrease in serum nitrite levels in hypertensive

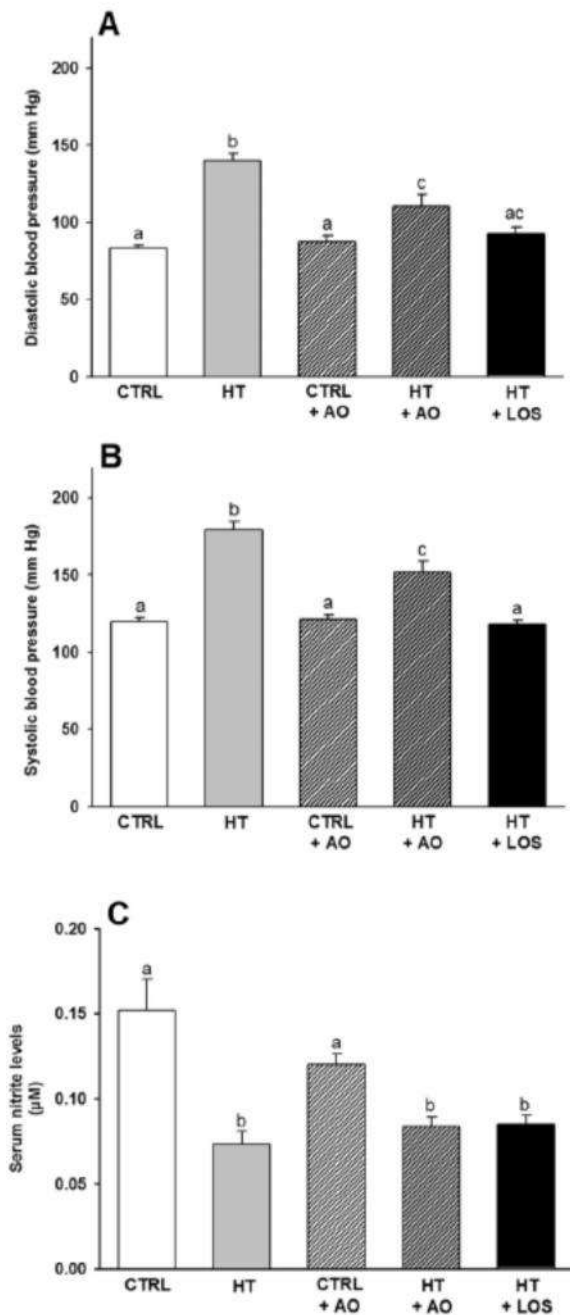
animals (Fig. 4C). Avocado oil did not disturb either SBP or DBP in control rats. BP decreased in hypertensive rats treated with avocado oil to  $151.6 \pm 7.1/110.7 \pm 7.8$  mm Hg, respectively. Losartan also decreased SBP and DBP in hypertensive animals to  $117.5 \pm 3.2/92.3 \pm 4.7$  mm Hg. The diminution of BP in hypertensive rats elicited by avocado oil or losartan was unrelated to recovery of NO levels, as serum nitrite in the hypertensive rats treated either with avocado oil or losartan remained unchanged in comparison to the levels of the hypertensive group (Fig. 4C).

##### Avocado oil and losartan improved renal vasodilation after Ang-II–induced contraction

In CTRL rats, avocado oil decreased the contractile response to Ang-II from the  $1 \times 10^{-6}$  M concentration compared with the HT group. Compared with the HT+AO group, the CTRL+AO group also showed significant decrements in contraction at  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M, and  $1 \times 10^{-4}$  M (Fig. 1). The latter group also exhibited a significant decreased response to Ang-II compared with all the experimental groups at  $1 \times 10^{-5}$  M. In contrast, no differences were seen among the CTRL, HT, HT+AO, and HT+Los groups at any concentration of Ang-II, except for the HT+AO group, which showed a significantly higher contraction at  $1 \times 10^{-6}$  M Ang-II than the HT+Los and CTRL+AO groups.

In concordance with their decreased response to Ang-II, the kidneys from the CTRL+AO group returned to their basal perfusion pressure in a shorter amount of time after contraction with Ang-II than the kidneys from the HT group at  $1 \times 10^{-6}$  M Ang-II and compared with the CTRL group at  $1 \times 10^{-4}$  M (Fig. 2). The time to reach basal relaxation was significantly lower in both the CTRL and HT+Los groups compared with the HT group at  $1 \times 10^{-6}$  M Ang-II. At the higher concentration of Ang-II tested ( $1 \times 10^{-3}$  M), the time to relaxation was significantly lower in all the groups compared with the HT group.

Dose–response curves to carbachol were carried out to explore whether avocado oil or losartan improved the endothelium-dependent renal vasodilation (Fig. 3). The renal vasculature from



**Fig. 4.** Effects of avocado oil (AO) or losartan (Los) on diastolic (A) and systolic (B) blood pressure and serum nitrite levels. (C) Blood pressure was measured the last 3 d of the treatment and the average of these determinations was calculated for each rat. The results are presented as the mean  $\pm$  SE.  $n = 8, 8, 7, 5,$  and  $5$  for CTRL, HT, CTRL+AO, HT+AO, and HT+Los groups, respectively, for panels A and B. For panel C,  $n = 8, 10, 13, 13$  and  $10$  for the same groups. Different letters indicate statistically significant differences at  $P < 0.05$ . CTRL, control; HT, hypertension.

HT rats was more resilient to the relaxing effects of carbachol, as a slight effect was observed at the first two smallest concentrations of this agonist. However, no significant differences from  $1 \times 10^{-4}$  M carbachol were observed among the HT, CTRL, and the CTRL+AO groups. In contrast, avocado oil or losartan ostensibly enhanced vasodilation in the HT group from  $1 \times 10^{-4}$  M or  $1 \times 10^{-5}$  M carbachol, respectively, bringing the percentage of vasodilation even higher than in the CTRL and the CTRL+AO groups at higher concentrations than  $1 \times 10^{-4}$  M carbachol.

*Avocado oil and losartan improved mitochondrial function in HT rats*

Massive  $\Delta\Psi$  dissipation was observed in mitochondria from hypertensive rats using glutamate-malate, a complex I-linked substrate (Fig. 5A), which was fully prevented by avocado oil. In mitochondria from HT+Los rats,  $\Delta\Psi$  increased 1.6 times with respect to mitochondria from CTRL animals, although no disturbances were induced by avocado oil in the latter group. When succinate, a complex II-linked substrate, was used to energize mitochondria (Fig. 5B), a 2.8-fold decrease in the  $\Delta\Psi$  of HT rats was detected. This was partially prevented by the treatments with avocado oil or losartan. However,  $\Delta\Psi$  was twofold higher in HT rats treated with losartan or avocado oil than in untreated HT rats.

Figure 6A shows that mitochondria from HT rats exhibited a 51% increment in ROS levels compared with CTRL rats when glutamate-malate was used as substrate, and this was prevented either by avocado oil or losartan. Moreover, both avocado oil and losartan normalized ROS levels to control values even when ROS generation was stimulated 1.6- and 2.3-fold in HT rats by disrupting the ETC with inhibitors like antimycin A or potassium cyanide (KCN), respectively. Avocado oil also decreased ROS levels in control mitochondria stimulated with these ETC inhibitors.

Figure 6B shows that in contrast with glutamate-malate, no differences were found in ROS levels between the CTRL and HT groups with succinate plus rotenone, neither in the presence of antimycin A or KCN. On the other hand, both avocado oil and losartan decreased ROS in mitochondria from HT rats with antimycin A or KCN added, but no differences were observed in the absence of these inhibitors.

*Avocado oil and losartan decreased mitochondrial oxidative stress in HT rats*

Redox state of mitochondrial glutathione pool is shown in the Figure 7A. The concentration of reduced glutathione (GSH) in mitochondria from HT rats was 1.6-fold lower compared with CTRL mitochondria. Only losartan fully prevented this effect, causing an increment of 2.2 times compared with the HT group. Additionally, a notable 2.25-fold increment in GSH was observed in mitochondria from the CTRL+AO group compared with the CTRL group. HT rats exhibited augmented levels of oxidized glutathione (GSSG) with respect to mitochondria from CTRL rats (Fig. 7B); treatment with avocado oil or losartan prevented this outcome.

Mitochondria from the HT group did not exhibit statistically significant alterations in the ratio of GSH to GSSG with respect to the CTRL group (Fig. 7C). Both avocado oil and losartan decreased oxidative stress in mitochondria from HT rats, as increments of 3.8- and 4.1-fold in this parameter were observed in mitochondria from HT+AO and HT+Los groups, respectively. Likewise, a 2.8-fold increase was detected in CTRL+AO rats compared with the CTRL group. Figure 7D shows that avocado



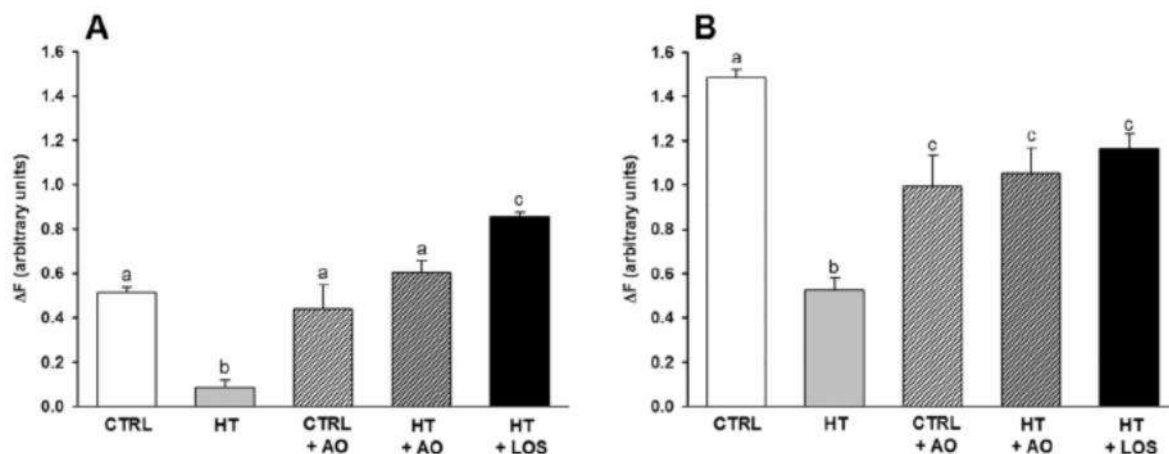


Fig. 5. Membrane potential of kidney mitochondria treated with avocado oil (AO) or losartan (Los) energized with (A) glutamate-malate (complex I substrate) or (B) succinate plus rotenone (complex II substrate). The results are presented as the mean  $\pm$  SE. For A, n = 8, 8, 5, 8, and 7 for CTRL, HT, CTRL+AO, HT+AO, and HT+LOS groups, respectively. For B, n = 9, 6, 6, 7, and 8 for the same groups. Different letters indicate statistically significant differences at  $P < 0.05$ . CTRL, control; HT, hypertension.

oil increased the total amount of GSH only in mitochondria from control rats.

#### Discussion

Avocado oil exhibited a partial antihypertensive effect compared with losartan, with improvement of endothelium-dependent renal vasodilation at the same level as this drug. These actions were paralleled to improved mitochondrial function and decreased oxidative stress. The antihypertensive effect of losartan has been attributed to decreased intravascular fluid volume due

to natriuresis [21] and to augmented serum NO levels [22]. Nevertheless, augmented NO may be ruled out as the mechanism improving BP by losartan or avocado oil, as the decrease of serum nitrite levels in the HT rats was not counteracted by these treatments (Fig. 4C). This outcome was expected as hypertension was induced by decreasing NO synthesis with L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor. We lack evidence to propose that avocado oil lowered BP by a natriuretic effect like losartan. An alternative explanation is that avocado oil decreases BP due to its high content of oleic acid (C18:1). C18:1 decreases BP in SHR by diminishing the actions of G proteins involved in the regulation of BP [23]. Thus, the possibility remains that avocado oil has an antihypertensive effect by a mechanism involving the vascular actions of C18:1.

Avocado oil decreased the time it takes renal vasculature to return to basal perfusion pressure after the contraction by Ang-II (Fig. 2), which was associated to an enhanced response to endothelium-dependent vasodilation (Fig. 3). The latter process depends on increased synthesis of NO through a pathway involving phospholipase-C, enhanced synthesis of inositol triphosphate and cGMP and changes in  $Ca^{2+}$  transients [24]. Thus, the repressed response to carbachol in kidney from HT rats at the lower concentrations of Ang-II might be related to decreased NO synthesis provoked by L-NAME, as reflected by the lower levels of serum nitrite of these rats (Fig. 4C). However, increased NO synthesis cannot explain the enhanced vasodilation in hypertensive kidney caused by avocado oil as depletion of serum nitrite was not corrected by this treatment (Fig. 4C). Instead,

it is feasible to hypothesize that the antioxidants from avocado oil might be preventing the conversion of NO into ONOO<sup>-</sup>, which is generated by the reaction of NO with ROS. Thus, instead of augmenting NO synthesis, avocado oil might be increasing NO by diminishing the level of ROS. Depressed nitrite levels in HT+AO or HT+Los rats does not agree with this hypothesis (Fig. 4C); however, it must be noted that nitrite levels reflect the overall amounts of NO synthesized by the nitric oxide synthases but not its conversion into others RNS, the reason by which a more precise technique to detect the absolute amounts of NO and ONOO<sup>-</sup> is needed to confirm this hypothesis.

It has been demonstrated that losartan counteracts kidney degeneration during hypertension and prevents mitochondrial  $\Delta\psi$  dissipation and excessive ROS generation, while it improves GSH redox state [9]. This agrees with the findings of this study as losartan exhibited similar effects (Figs. 5–7, respectively). The effects of avocado oil on mitochondrial function and GSSG levels mimicked those observed with losartan, which suggest that losartan and avocado oil might share some of their actions. Cytosolic ONOO<sup>-</sup> has been identified as a main contributor for the deleterious effects of Ang-II over mitochondria [4]. Avocado oil contains some carotenoids known to protect against oxidative damage induced by ONOO<sup>-</sup> [25–28]. If ONOO<sup>-</sup> plays a role on the mitochondrial defects observed in HT rats, it can be proposed that the protection conferred by avocado oil might be mediated by the cytosolic accumulation of these antioxidants and the quenching of ONOO<sup>-</sup>. This would lead to decreased mitochondrial damage and lower ROS generation as observed in the Figure 6, allowing, in consequence, the maintenance of GSH in a more reduced state (Fig. 7A). Conversely, the depletion of GSH observed in the HT rats correlated with exacerbated production of ROS and with a hypothetical augment of ONOO<sup>-</sup>, being the latter in concordance with data showing that GSH prevents mitochondrial damage by ONOO<sup>-</sup> [29,30]. On the other hand, there was a remarkable increment of GSH levels in the CTRL+AO group compared with CTRL animals (Fig. 7A). We lack direct experimental evidence to explain why the CTRL+AO group exhibited higher GSH levels, but this result could be explained taking into account that the levels of total glutathione were also higher in

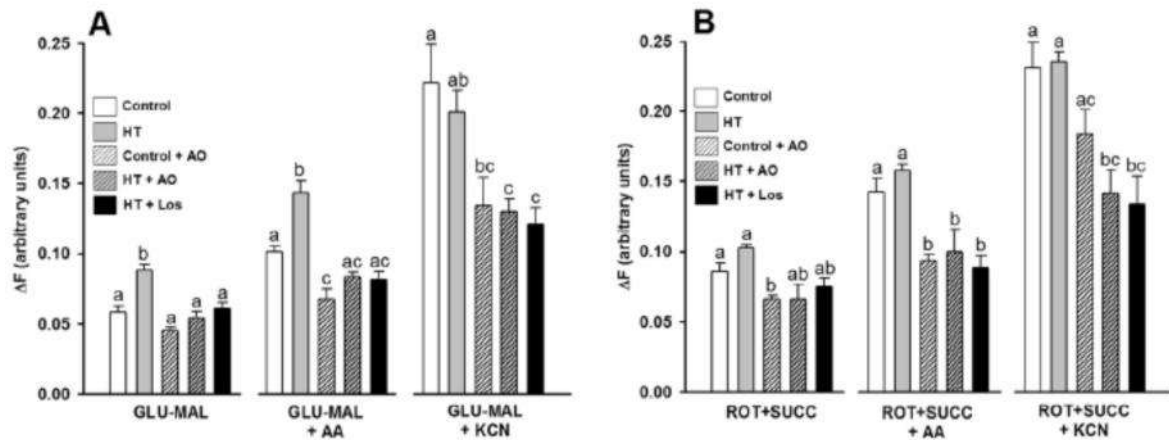


Fig. 6. ROS levels in kidney mitochondria from CTRL or HT rats treated with avocado oil (AO) or losartan (Los). ROS generation was supported with glutamate-malate (GLU-MAL) (A) or succinate (SUCC), plus rotenone (ROT) (B). ROS production was stimulated with antimycin A (AA) or cyanide (KCN). The results are presented as the mean  $\pm$  SE. For panel A,  $n = 9, 12, 9, 9,$  and  $9$  for CTRL, HT, CTRL+AO, HT+AO, and HT+Los groups, respectively. For panel B,  $n = 6, 7, 9, 8,$  and  $9$  for the same groups, except for the set of data with rotenone + succinate + KCN, where  $n = 6, 6, 7, 6,$  and  $9$  for the groups above mentioned. Different letters indicate statistically significant differences at  $P < 0.05$ . CTRL, control; HT, hypertension; ROS, reactive oxygen species.

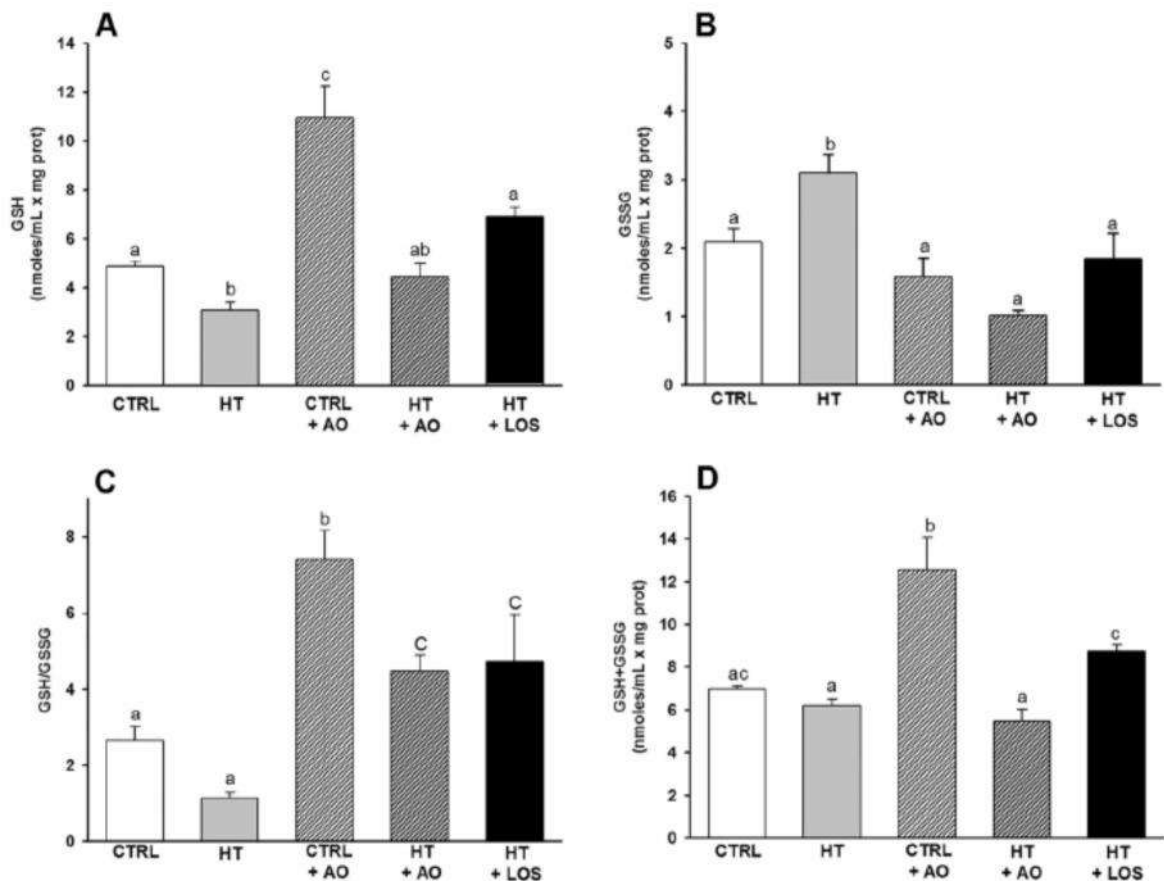


Fig. 7. Effects of avocado oil (AO) or losartan (Los) on mitochondrial levels of reduced glutathione (GSH) (A) oxidized glutathione, (GSSG) (B) the GSH/GSSG ratio, (C) total glutathione (GSH + GSSG). (D) The results are presented as the mean  $\pm$  SE. For the panels A, B, C, and D,  $n = 12, 15, 6, 6, 6$  for the CTRL, HT, CTRL+AO, HT+AO, and HT+Los groups, respectively. Different letters indicate statistically significant differences at  $P < 0.05$ . CTRL, control; HT, hypertension.



that group (Fig. 7D), suggesting that avocado oil enhances the transport of glutathione into control mitochondria by an unknown mechanism. Additionally,  $\beta$ -sitosterol, a phytosterol detected in a preliminary characterization of the avocado oil used in this study, is known to increase GSH levels through the activation of estrogen receptors [31]. Moreover, the levels of oxidative stress in this group were lower than in the other groups (Fig. 7C), which could be anticipated as these animals did not have any oxidative insults such as those caused by hypertension [2–5] and they were receiving antioxidant compounds from avocado oil.

Mitochondria from HT rats exhibited impaired  $\Delta\Psi$  when substrates were oxidized for complex I (i.e., glutamate-malate) or complex II (i.e., succinate; Fig. 5A, B, respectively). The inhibition of  $\Delta\Psi$  was higher with glutamate-malate than with succinate, suggesting that complex I has a more prominent role in  $\Delta\Psi$  impairment, which correlates with the higher ROS levels detected using glutamate-malate compared with testing succinate plus rotenone. Moreover, no differences in ROS were detected among mitochondria from HT and CTRL rats when antimycin A was added in the presence of succinate plus rotenone (Fig. 6B), which indicates that hypertension does not enhance electron leak upstream of complex I. In contrast, when electron transport was blocked with antimycin A along glutamate-malate as the substrate, higher levels of ROS were detected in mitochondria from HT rats, which revealed an enhanced electron leak at complex I. This is in agreement with the central role of complex I in the excessive ROS generation observed during hypertension, as described by Dikalov et al. [14].

Concerning the toxic effects of avocado oil and losartan at the doses and time administered, no adverse effects were observed by avocado oil in this nor in a previous study, where no alterations in liver, weight gain, food intake, or water consumption were seen [12]. Hepatic adverse effects by avocado oil have been observed at 1000 mg/kg [32]. No adverse effects with the dose used of losartan were detected aside from those alterations elicited

by L-NAME, which is consistent with the lack of toxic effects when a losartan dose one magnitude order above the dose of this study was used [33].

One limitation of this study was that kidney damage was not evaluated. In this regard, it has been established that decreased renal blood flow due to augmented vascular tone along with increased ROS generation led to a hypoxic state that is favored by physiological low oxygen tensions in the kidney [34,35]. This stimulates renal fibrosis via the activation of hypoxia-inducible factors (HIF) [36]. Thus, it is believed that therapies decreasing renal vascular tone and mitochondrial oxidative stress may be beneficial to delay the apparition of kidney disease by correcting two of the main factors limiting renal oxygenation [37]. It might be anticipated that avocado oil treatment could be beneficial to delay kidney damage as it decreased BP (Fig. 4), improved renal vasodilation (Fig. 3), diminished ROS (Fig. 6), and decreased mitochondrial oxidative stress (Fig. 7), which altogether, could improve renal oxygen tension and decrease HIF activation.

## Conclusion

In addition to decreasing systemic BP, avocado oil intake improves renal endothelium-dependent vasodilation in HT rats in association with improved kidney mitochondrial function and decreased ROS production in the complex I via diminution of CSSG levels. These effects probably are linked to the blocking of Ang-II actions, as avocado oil mimicked to a good degree the effects of losartan.

## Acknowledgements

This work was supported by Programa de Investigación 2016 to 2017 de la Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México [1821440 CCR]. Author contributions: Conceived and designed the experiments: CCR, DGH, ARRO. Performed the experiments: CAMR, JLHP, OOA, ARF. Analyzed and interpreted the results: CCR, DGH, ASM, RSG. Drafted the manuscript: CCR, JCGH, ARRO. All the authors approved the final version of the manuscript.

## References

- [1] Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002;82:47–95.
- [2] Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916–23.
- [3] Wattanapitayakul SK, Weinstein DM, Holycross BJ, Bauer JA. Endothelial dysfunction and peroxynitrite formation are early events in angiotensin-induced cardiovascular disorders. *FASEB J* 2000;14:271–8.
- [4] Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res* 2008;102:488–96.
- [5] Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W, et al. Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ Res* 2010;107:106–16.
- [6] Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:943–55.
- [7] Holdaas H, Hartmann A, Berg KJ, Lund K, Fauchald P. Renal effects of losartan and amlodipine in hypertensive patients with non-diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13:3096–102.
- [8] Ohno Y, Nishimura A, Iwai H, Hirota N, Yamauchi T, Fujimoto M, et al. Anti-albuminuric effect of losartan versus amlodipine in hypertensive Japanese patients with type 2 diabetes mellitus: a prospective, open-label, randomized, comparative study. *Curr Ther Res Clin Exp* 2007;68:94–106.
- [9] de Cavanagh EM, Toblli JE, Fender L, Piotrkowski B, Stella I, Insera F. Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006;290:R1616–25.
- [10] McLachlan J, Beattie E, Murphy MP, Koh-Tan CH, Olson E, Beattie W, et al. Combined therapeutic benefit of mitochondria-targeted antioxidant, MitoQ10, and angiotensin receptor blocker, losartan, on cardiovascular function. *J Hypertens* 2014;32:555–64.
- [11] Ortiz-Avila O, Sámano-García CA, Calderón-Cortés E, Pérez-Hernández IH, Mejía-Zepeda R, Rodríguez-Orozco AR, et al. Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2013;45:271–87.
- [12] Ortiz-Avila O, Gallegos-Corona MA, Sánchez-Briones LA, Calderón-Cortés E, Montoya-Pérez R, Rodríguez-Orozco AR, et al. Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *J Bioenerg Biomembr* 2015;47:337–53.
- [13] Ortiz-Avila O, Esquivel-Martínez M, Olmos-Orizaba BE, Saavedra-Molina A, Rodríguez-Orozco AR, Cortés-Rojo C. Avocado oil improves mitochondrial function and decreases oxidative stress in brain of diabetic rats. *J Diabetes Res* 2015;2015:485759.
- [14] Dikalov SI, Nazarewicz RR, Bikineyeva A, Hilenski L, Lassègue B, Griending KK, et al. Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:281–94.
- [15] Rivera-Jardón FF, Castro-Moreno P, Figueroa-Guillén ES, Gallardo-Ortiz IA, Godínez-Hernández D, Ibarra-Barajas M. Angiotensin II augments renal vasoconstriction via AT1 receptors in L-NAME-induced hypertensive rats. *Proc West Pharmacol Soc* 2009;52:47–9.
- [16] Zatz R, Baylis C. Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 1998;32:958–64.
- [17] Chance B, Cohen P, Jobsis F, Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science* 1962;137:499–508.
- [18] Anderson CM, Norquist BA, Vesce S, Nicholls DG, Soine WH, Duan S, et al. Barbiturates induce mitochondrial depolarization and potentiate excitotoxic neuronal death. *J Neurosci* 2002;22:9203–9.



- [19] Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5:62–71.
- [20] Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77:373–82.
- [21] Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, Ruiz P, Griffiths R, Kumar AP, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:17985–90.
- [22] Sosa-Canache B, Hernández-Hernández R, Armas-Padilla MC, Armas-Hernández MJ, Cammarata-Segura R, Pacheco B, et al. Effect of losartan therapy on endothelial function in hypertensive patients. *Am J Ther* 2007;14:166–71.
- [23] Terés S, Barceló-Coblijn G, Benet M, Alvarez R, Bressani R, Halver JE, et al. Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:13811–16.
- [24] Jin RC, Loscalzo J. Vascular nitric oxide: formation and function. *J Blood Med* 2010;2010:147–62.
- [25] Ashton OB, Wong M, McGhie TK, Vather R, Wang Y, Requejo-Jackman C, et al. Pigments in avocado tissue and oil. *J Agric Food Chem* 2006;54:10151–8.
- [26] Scheidegger R, Pande AK, Bounds PL, Koppenol WH. The reaction of peroxynitrite with zeaxanthin. *Nitric Oxide* 1998;2:8–16.
- [27] Santocono M, Zurria M, Berrettini M, Fedeli D, Faicioni G, Lutein zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. *J Photochem Photobiol B* 2007;88:1–10.
- [28] Böhm F, Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG. Beta-carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NOx. *FEBS Lett* 1998;436:387–9.
- [29] Bolaños JP, Heales SJ, Peuchen S, Barker JE, Land JM, Clark JB. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: A potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med* 1996;21:995–1001.
- [30] Heales SJ, Bolaños JP, Stewart VC, Brookes PS, Land JM, Clark JB. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta* 1999;1410:215–28.
- [31] Vivancos M, Moreno JJ.  $\beta$ -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radic Biol Med* 2005;39:91–7.
- [32] Nicoletta HD, Neto FR, Corrêa MB, Lopes DH, Rondon EN, Dos Santos LF, et al. Toxicogenetic study of *Persea americana* fruit pulp oil and its effect on genomic instability. *Food Chem Toxicol* 2017;101:114–20.
- [33] Fujihara CK, Velho M, Malheiros DM, Zatz R. An extremely high dose of losartan affords superior renoprotection in the remnant model. *Kidney Int* 2005;67:1913–24.
- [34] Aukland K, Krog J. Renal oxygen tension. *Nature* 1960;188:671.
- [35] Welch WJ, Blau J, Xie H, Chabrashvili T, Wilcox CS. Angiotensin-induced defects in renal oxygenation: Role of oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H22–8.
- [36] Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2007;117:3810–20.
- [37] Palm F, Nordquist L. Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2011;301:R1229–41.

## 8.2. Capítulo 2

### 8.2.1. Resumen

#### **Evaluación del efecto del aceite de aguacate sobre la función renal y la disfunción mitocondrial generada por activación adrenérgica en la hipertensión**

La hipertensión arterial puede provocar daño renal, sin embargo, la comprensión de los mecanismos que ligan a estos dos eventos no han sido completamente elucidados. Se ha sugerido a las especies reactivas de oxígeno (ERO) como mediadores primarios en la patogénesis del daño renal. En este sentido, se sabe que el sistema adrenérgico, el cual se encuentra sobreactivado durante la hipertensión, participa en la producción de ERO a través de activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, sin embargo, se desconoce su participación durante el daño renal. Por otro lado, se han propuesto a las terapias antioxidantes como una alternativa terapéutica para aliviar o retrasar la aparición del daño renal. Por ejemplo, se ha demostrado que el consumo de aceite de aguacate disminuye el estrés oxidante en mitocondrias de riñón de ratas diabéticas. En este trabajo proponemos que la administración del aceite de aguacate disminuye el probable estrés oxidante generado por la activación de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y que repercute benéficamente en la función mitocondrial y renal de ratas hipertensas. Se evaluó el efecto del aceite de aguacate sobre el daño renal hipertensivo generado por activación  $\alpha_1$ -adrenérgica durante la HT, se analizó su efecto sobre el estrés oxidante y el funcionamiento mitocondrial, y además se evaluó la vasorelajación derivada del endotelio en presencia de estrés oxidante provocado por rotenona en el riñón de ratas hipertensas. El aceite de aguacate disminuyó la presión arterial sistólica y diastólica al mismo nivel que el provocado por prazosina (antihipertensivo antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), mejoró las respuestas vasorelajantes posterior a la contracción generada por fenilefrina (agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico), previno el daño oxidante y de la función mitocondrial, mejorando consecuentemente la función renal y los daños estructurales en las nefronas causados por la hipertensión. El aceite de aguacate previene el daño glomerular y el deterioro de la función renal durante la hipertensión, disminuyendo el tiempo de la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica renal, la formación de ERO y el estrés oxidante, y mejora además el funcionamiento mitocondrial.

Palabras clave: hipertensión arterial, fenilefrina, prazosina, aceite de aguacate y estrés oxidante mitocondrial.

## **Evaluación del efecto del aceite de aguacate sobre la función renal y la disfunción mitocondrial generada por activación $\alpha_1$ -adrenérgica en la hipertensión**

### *8.2.2. Introducción*

La hipertensión arterial (HT) es un problema grave de salud a nivel mundial (Ikeda et al., 2013; OMS, 2013) y la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ERO) es uno de los principales factores que influyen en la patogénesis, mantenimiento y daño a diferentes órganos que provoca esta enfermedad (Araujo y Wilcox, 2014; Dikalov y Ungvari, 2013; Welch, 2006; Zalba et al., 2001). Bajo condiciones fisiológicas la producción de ERO juega un papel muy importante en la regulación de varios procesos metabólicos en los que se incluyen procesos de señalización celular, regeneración vascular, diferenciación celular, entre otros (Ray y Huang, 2012). Sin embargo, en condiciones patológicas la producción de ERO sobrepasa los sistemas antioxidantes, provocando un desequilibrio redox que favorece el daño funcional a biomoléculas en diferentes órganos (Taverne et al., 2013).

Durante la patogénesis y/o mantenimiento de la HT, diversos agentes vasoconstrictores presentan respuestas exacerbadas (Ibarra et al., 2006), y se han implicado diversos mecanismos responsables de este efecto tales como un incremento en la población de receptores para agonistas, aumento de las respuestas constrictoras, respuestas persistentes, disminución de efectos vasorelajantes que contrarrestan el efecto vasoconstrictor, y otras. Se ha propuesto que los cambios en el balance entre la vasoconstricción simpática y la vasodilatación dependiente de  $\text{NO}$  son decisivos en el mantenimiento de la presión arterial alta en varias formas de HT. En la fase sostenida del bloqueo crónico de  $\text{NO}$ , la HT es en gran medida debida a la actividad combinada de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y el receptor  $\text{AT}_1$  para angiotensina II (Qiu et al., 1994). Además del efecto exacerbado de las respuestas presoras de los agentes vasoconstrictores como la angiotensina II y la noradrenalina del sistema adrenérgico, se tienen evidencias de que la activación de sus respectivos receptores acoplados a proteínas G (RAPG) aumentan la producción de ERO en la que se destaca la activación de las enzimas proteína cinasa C (PKC) y NADPH oxidasa (Dikalova et al., 2010; Li et al., 2007; Hao et al, 2006; Tsai y Jiang, 2010), las cuales promueven el aumento del estrés oxidante que provoca daño a biomoléculas, entre las que se encuentran los complejos de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial, lo que provoca una mayor fuga de electrones de la cadena y por consecuencia, más estrés oxidante. Las ERO provenientes de la mitocondria retroalimentan de forma positiva la actividad enzimática de la NADPH oxidasa vía el  $\text{H}_2\text{O}_2$  mitocondrial, lo que resulta en un incremento en la producción de anión superóxido en los complejos de la CTE y en una disminución de la biodisponibilidad de  $\text{NO}$  y de sus efectos

vasorelajantes (Dikalova et al., 2010). El papel del estrés oxidativo mitocondrial en el desarrollo de la HT ha sido evidenciado mediante los efectos benéficos del tratamiento con antioxidantes dirigidos hacia la mitocondria, tales como el mitoTEMPO, el cual disminuye la presión arterial en modelos animales de HT, reduce el estrés oxidante mitocondrial y restaura la relajación dependiente del endotelio. (Dikalova et al., 2010).

A nivel renal, la disfunción vascular juega un papel preponderante en el daño hipertensivo al disminuir la biodisponibilidad de NO<sup>\*</sup>, lo que compromete su efecto vasodilatador, exagera la contracción vascular y activa vías de señalización involucradas en el daño por fibrosis (de Cavanagh et al., 2006). El endotelio juega un papel importante en el control de la contracción inducida por activación adrenérgica y este se encuentra deteriorado en aorta de ratas con HT, en especial durante la contracción inducida por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Ibarra et al., 2006). La disminución de la biodisponibilidad del NO<sup>\*</sup> derivado del endotelio representa el mecanismo más probable de la vasodilatación alterada en la HT (Ibarra et al., 2006; McIntyre et al., 1999).

Se ha demostrado que la disminución del estrés oxidante vascular generado por la mitocondria puede retrasar el daño renal en animales hipertensos (de Cavanagh et al., 2006). Asimismo, se ha reportado que la suplementación con aceite de aguacate, el cual posee un alto contenido de moléculas antioxidantes y ácido oleico, mejora el estado redox mitocondrial en diferentes órganos durante la diabetes (Ortiz-Avila et al., 2013, 2015, 2017). Además, se ha demostrado que el aceite de aguacate disminuye la presión arterial de ratas hipertensas (Márquez-Ramírez et al., 2018), probablemente debido a la gran proporción de ácido oleico presente en este aceite. Sin embargo, a la fecha se desconoce el efecto del aceite de aguacate sobre el daño vascular renal inducido por la activación adrenérgica en modelos animales de hipertensión, y su relación con el estrés oxidante y la disfunción mitocondrial.

### 8.2.3. Metodología

#### **Animales y grupos experimentales.**

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-350g de peso corporal las cuales fueron distribuidas en 5 grupos de 6 animales cada uno (CTRL (control); CTRL + AO (aceite de aguacate), HT (hipertensas); HT + AO y HT + PZS (prazosina). Todos los grupos de animales tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento con una dieta estándar para roedores (Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet, St. Louis, MO, USA), excepto que para generar hipertensión en los grupo correspondientes (HT; HT + AO y HT + PZS) se adicionó 75mg/kg de L-NAME (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en el agua de beber durante 8 días y posterior se disminuyó la dosis a 50mg/kg de L-NAME para mantener la hipertensión durante los siguientes 45 días. Todos los tratamientos fueron administrados vía oral cada día a una dosis de 1ml/250g de peso durante los 45 días de mantenimiento de la hipertensión. El grupo control (CTRL) recibió agua, el grupo CTRL + AO recibió aceite de aguacate de una presentación comercial (Ahuacatlán, DIRICOM S.A. de C.V., México), al grupo HT se le administró agua, al grupo HT + AO se le administró aceite de aguacate comercial y al grupo HT + PZS se le administró 1mg/kg de hidrocloreuro de prazosina (FARMASIERRA, S.A. San Sebastián de los Reyes, Madrid; antagonista selectivo  $\alpha_1$ -adrenérgico). La composición de ácidos grasos del aceite de aguacate utilizado fue previamente reportada (Ortiz-Avila et al., 2015) (C18:1; 55.9%, C18:2; 24.9%, C18:3; 10.1%, C16:0; 5.92%, C18:0; 1.86%, C16:1; 0.2% y 0.92% de un ácido graso no identificado).

Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo bajo las recomendaciones de la Norma para el uso de Animales de Experimentación expedida por la Secretaría de Agricultura en el párrafo de Regulaciones Federales para el uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999). Esta investigación también fue aprobada por el comité institucional para el uso de animales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

#### **Medición de la presión arterial**

La presión arterial fue medida en los animales de forma no invasiva por pletismografía con un monitor CODA (Kent Scientific, Torrington, CT, USA). Las ratas fueron colocadas en un tubo de inmovilización 5min antes de las determinaciones, se realizaron 3 lecturas de presión arterial sistólica y diastólica cada día para cada animal

durante los 3 últimos días de tratamiento. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### **Determinaciones bioquímicas**

**Proteinuria:** Al término de los tratamientos se recolectó la orina de 24h para la determinación de la concentración de proteínas con el método colorimétrico de rojo pirogalol utilizando un kit comercial (Spinreact, España).

**Creatinina sérica:** Al término de los tratamientos la sangre de las ratas fue colectada y el suero fue separado del paquete globular por centrifugación para la determinación espectrofotométrica de creatinina utilizando un Kit comercial (Spinreact, España).

### **Reactividad vascular renal**

Para investigar los efectos de los tratamientos sobre la reactividad vasculatura (vasoconstricción y vasorelajación) en el riñón, se realizaron curvas concentración-respuesta a diferentes fármacos. Las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital sódico a una dosis de 55mg/kg de peso vía intraperitoneal. La arteria renal derecha fue canulada, el riñón fue resecado y colocado en un sistema tipo Langendorff. El riñón fue perfundido con buffer tipo Krebs-Henseleit (NaCl 118mM, NaHCO<sub>3</sub> 20mM, glucosa 11.7mM, KCl 4.7mM, CaCl<sub>2</sub> 2.5mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2mM y EDTA 0.026mM, a pH 7.4) a 37°C. El buffer fue burbujeado con una mezcla de 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>, la velocidad del flujo del líquido se ajustó a 10mL/min. Antes del inicio del protocolo experimental se permitió la estabilización de la presión de perfusión basal por una hora.

Se evaluaron las respuestas vasoconstrictoras midiendo los cambios en la presión de perfusión que provocaban la adición de 10 $\mu$ L de fenilefrina a concentraciones de 0.1  $\mu$ M, 0.31  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 3.1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 31  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 310  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 3100  $\mu$ M y 10000  $\mu$ M. Los cambios en la presión de perfusión fueron monitoreados con un transductor de presión tipo Grass FT03 (Astro-Med, Inc. West Warwick, RI, USA).

En experimentos por separado se evaluó la dilatación vascular renal con carbacol (cloruro de (2 hidroxietil) trimetilamonio carbamato), el cual es un fármaco parasimpaticomimético que induce vasodilatación dependiente del endotelio. Después de que los riñones fueron perfundidos y estabilizados como se mencionó anteriormente, se administró una infusión de 100 $\mu$ M de fenilefrina a una velocidad constante de 10mL/h. Una vez que la presión de perfusión se estabilizó, se realizaron curvas concentración-respuesta a carbacol mediante la adición en 10 $\mu$ L de carbacol en concentraciones crecientes de 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 1000  $\mu$ M, 10 000  $\mu$ M y 100 000  $\mu$ M. Estos datos se expresaron como la

diferencia en la presión de perfusión obtenida por la adición de cada una de las concentraciones de carbacol menos la presión de perfusión basal en ausencia del agonista ( mmHg).

### **Aislamiento de mitocondrias**

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación al final del tratamiento y las mitocondrias de riñón fueron aisladas de acuerdo con el método modificado por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Se obtuvo el homogenado del riñón en medio 1 (manitol 220mM, sucrosa 70mM, MOPS 2mM y EGTA 1mM (pH 7.4)) el cual fue centrifugado a 314xg. El precipitado se descartó y el sobrenadante fue centrifugado a 4410xg. El precipitado fue lavado con medio 2 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM y MOPS 2 mM (pH 7.4)) y centrifugado a 6350xg. Finalmente, el precipitado obtenido fue resuspendido en 500  $\mu$ l de medio 2. Cada centrifugación se realizó durante 10 min a 4°C. La concentración de proteína mitocondrial se determinó por el método de Biuret con algunas modificaciones (Gornall et al., 1949).

### **Análisis de los niveles de ERO**

La producción de ERO fue determinada en mitocondrias de riñón midiendo la oxidación de la sonda fluorescente diacetato de 2´7´- diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA). 0.5mg/mL de mitocondrias y 1.25mM de H<sub>2</sub>DCFDA fueron incubados a 4°C durante 20 min bajo agitación constante en un buffer que contenía HEPES 10 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM (pH 7.4). Posteriormente, la suspensión de mitocondrias fue colocada en una celda de cuarzo, el análisis comenzó con el registro de la fluorescencia basal, después de 1 min, se adicionó glutamato/malato 10mM como sustrato del complejo I de la CTE y los cambios de fluorescencia del H<sub>2</sub>DCFDA fueron monitoreados durante 20 min. En experimentos por separado se agregó además rotenona para potenciar la producción de ERO. Los cambios de fluorescencia fueron detectados en un espectrofotómetro Shimadzu RF-5301PC (  $\lambda_{ex}$  485 nm;  $\lambda_{em}$  520 nm).

### **Análisis de los niveles y el estado redox del glutatión**

Para esta determinación se trataron 0.5mg/mL de mitocondrias con ácido sulfosalicílico y se centrifugó por 10 min a 5000 xg para remover las proteínas. El glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) fueron determinados del sobrenadante por un método enzimático (Akerboom y Sies, 1981). El contenido de glutatión total (GSH +GSSG) fue determinado en una celda que contenía 90 $\mu$ l del sobrenadante, ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) 3 mM y 0.115 unidades/mL de glutatión reductasa en un volumen final de 1mL con buffer de fosfato de sodio a pH 7.5. Después de 5min de incubación a

temperatura ambiente, se agregó 2mM de NADPH y se monitoreo la reacción por 5min. El incremento de la absorbancia fue leído a una longitud de onda de 412nm. Se utilizó una curva estándar de GSH conocida para calcular la concentración de las muestras. Para la determinación de GSSG, se realizó la misma metodología excepto que la muestra fue incubada previamente con 3% (v/v) de 4-vinilpiridina por 1h. La concentración de GSH fue calculada restando la concentración de GSH + GSSG menos la concentración de GSSG.

### **Consumo de Oxígeno**

Para la medición de la respiración mitocondrial, se utilizaron mitocondrias de riñón recién aisladas, las cuales fueron resuspendidas en un volumen final de 2mL de buffer (HEPES 10 mM, KCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 mM a pH 7.4) para medir el consumo de oxígeno en una cámara de vidrio sellada del oxígeno atmosférico y con agitación constante. La tasa del consumo de oxígeno fue determinada a 37°C usando un electrodo de oxígeno tipo Clark acoplado a un monitor de oxígeno YSI 5300A y a una computadora para la adquisición de datos. Las determinaciones comenzaron inmediatamente después de agregar 10mM de glutamato/malato como sustrato respiratorio para el complejo I (estado 4) y después de 5min se agregó ADP 1mM para determinar el consumo de oxígeno en el estado fosforilante (estado 3). Finalmente, se agregó KCN 1mM, inhibidor del complejo IV, para inhibir la respiración. Se calculó la tasa del control respiratorio mediante el cociente del estado 3/estado 4.

### **Examinación histológica del riñón**

Los animales fueron sacrificados por decapitación al término de los tratamientos, ambos riñones fueron resecados y fijados por inmersión en paraformaldehído al 10% y luego embebidos en parafina. Se realizaron cortes del riñón en un micrótopo con un grosor de 3  $\mu$ m, posteriormente colocados en portaobjetos para después teñirlos con Hematoxilina-eosina y finalmente fueron examinados bajo un microscopio Leica DM5500B para evaluar y comparar los cambios morfológicos en los diferentes grupos.

### **Análisis estadístico**

Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  error estándar de al menos 3 experimentos independientes usando muestras de diferentes animales para cada experimento. Las diferencias estadísticas de los datos fueron determinadas con análisis de varianza (ANOVA) y un análisis post-hoc de Tukey o Bonferroni, empleando el software GraphPad Prim 5.



#### 8.2.4. Resultados

##### **Comparación del efecto del aceite de aguacate y prazosina sobre la presión arterial**

Se midió el efecto producido por el tratamiento con PSZ en las ratas HT, los datos fueron comparados con estudios previos realizados de manera concomitante (figura 1) y se observó una disminución significativa de la presión arterial a valores similares que el grupo HT tratado con AO, sin embargo la presión arterial lograda en estos últimos no alcanzó valores similares a los del grupo normotenso control, como hemos reportado anteriormente el AO disminuye la presión arterial sistémica en ratas con HT comparadas con su grupo control.

##### **Participación del sistema adrenérgico renal en la hipertensión/L-NAME**

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la contracción adrenérgica renal se midieron las respuestas contráctiles al agonista fenilefrina (agonista selectivo  $\alpha_1$  adrenérgico) en riñón (figura 2a), la administración de fenilefrina generó respuestas concentración-dependiente, sin embargo no se presentó ninguna diferencia significativa entre los grupos, la administración de AO y PZS no produjo ningún cambio significativo sobre la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica renal en ratas normotensas ni hipertensas.

Interesantemente se observaban respuestas diferentes en el tiempo de recuperación de la presión de perfusión después de la administración de fenilefrina entre grupos (figura 2b). Se calculó el área bajo la curva para evaluar el efecto integral de cada tratamiento respecto al control (datos no mostrados). La HT provocó aumento de ~2.4 veces el tiempo de recuperación comparada con el grupo control y el tratamiento con AO previno este efecto incluso a valores similares al grupo control, el tratamiento con PZS no produjo cambios significativos en este parámetro.

##### **Evaluación de la vasorelajación renal derivada del endotelio**

Para evaluar si el AO y/o el fármaco antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico PZS promueven cambios en la vasodilatación renal dependiente del endotelio, se realizaron curvas concentración respuesta al agonista carbacol (figura 3) el cual promueve vasodilatación al activar receptores muscarínicos potenciando el lanzamiento de NO $\cdot$ . Durante la HT generada por L-NAME la vasorelajación dependiente del lanzamiento de NO $\cdot$  se encuentra deteriorada (disminución de ~14% la relajación provocada por carbacol 1000 $\mu$ M) y tanto el aceite de aguacate como el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico generan un efecto protector completo para este efecto.

### **Efecto del estrés oxidante sobre la vasodilatación renal en la hipertensión**

Con el objetivo de evaluar si el estrés oxidante generado por la administración de rotenona deteriora las respuestas vasorelajantes dependientes de la liberación de NO $\cdot$  en el endotelio, generamos curvas concentración respuesta a carbacol en presencia y ausencia de rotenona para cada grupo experimental (Figura 4), los resultados muestran que en presencia de rotenona los riñones de ratas HT presentan deterioro de la capacidad vasorelajante ((+) rotenona disminuye 13.2% la relajación al carbacol log 10 $^{-2}$  M), interesantemente, el tratamiento con AO y PZS previenen este efecto.

### **Efecto del aceite de aguacate y prazosina sobre la producción de ERO**

Para comparar el deterioro de la vasorelajación renal con la producción de ERO mitocondrial, evaluamos los cambios de fluorescencia de la sonda H $_2$ DCFDA en respuesta a la adición del sustrato glutamato/malato (figura 5). Los datos presentados en la figura muestran que los niveles de ERO están aumentados al doble en mitocondrias de riñón de ratas con HT cuando son comparadas con el grupo control. Se observó también que el AO previno completamente este efecto disminuyendo 44% la formación de ERO comparadas con el grupo HT mientras que el tratamiento con PZS tuvo un efecto evidente, sin embargo estadísticamente no significativo disminuyendo 37% la formación de ERO comparado con el grupo HT.

### **Evaluación del efecto antioxidante del aceite de aguacate en la hipertensión**

Medimos el cociente GSH/GSSG como marcador de estrés oxidante (figura 6) con el objetivo de determinar si el aumento de la producción de ERO en el grupo de ratas HT genera daño oxidante y si la disminución de la producción de ERO en mitocondrias de riñón de ratas HT conferida por el tratamiento con AO y PZS evita el daño oxidante durante la HT. El cociente GSH/GSSG de las ratas control presenta valores 9 veces mayor que el grupo HT evidenciando un estado de estrés oxidante mayor en esta última condición. Por otra parte, el AO previene significativamente este efecto pero no a valores como los del grupo control (aumentando 3 veces la relación GSH/GSSG respecto al grupo HT), el tratamiento con PZS no genera cambios significativos comparados con el grupo con HT.

### **Efecto de la capacidad antioxidante del aceite de aguacate sobre la funcionalidad de mitocondrias de riñón de ratas hipertensas**

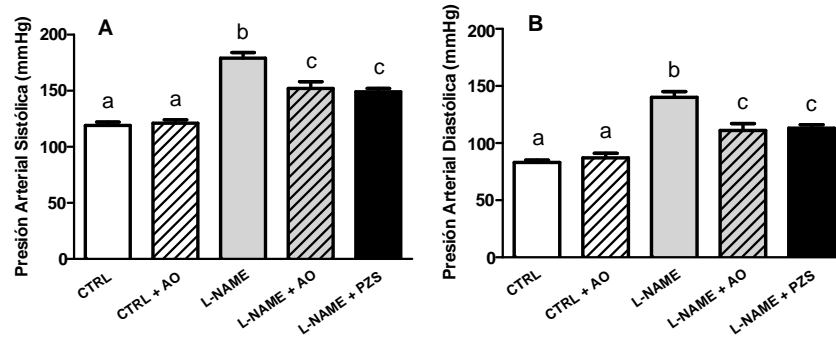
Una de las principales consecuencias del aumento del estrés oxidante es el daño a estructuras en los supercomplejos de la CTE, lo cual ocasiona mal funcionamiento en el transporte de electrones, desacoplamiento de los complejos de la CTE y como consecuencia una respiración mitocondrial deteriorada con bajo consumo de O $_2$ .

Evaluamos la funcionalidad mitocondrial del riñón obteniendo el TCR (tasa de control respiratorio) en el estado 4 y 3 mitocondrial utilizando como sustrato respiratorio glutamato/malato (figura 7) con el objetivo de comparar la función mitocondrial de riñón de ratas HT y el grupo CTRL, y además evaluar el efecto protector del AO durante la HT. La HT deteriora notablemente el TCR pues esta disminuye 45.2% (este efecto predomina en el estado 3, datos no mostrados). De manera importante se observa que el tratamiento con AO o PZS previenen este efecto cuando es comparada con el grupo control.

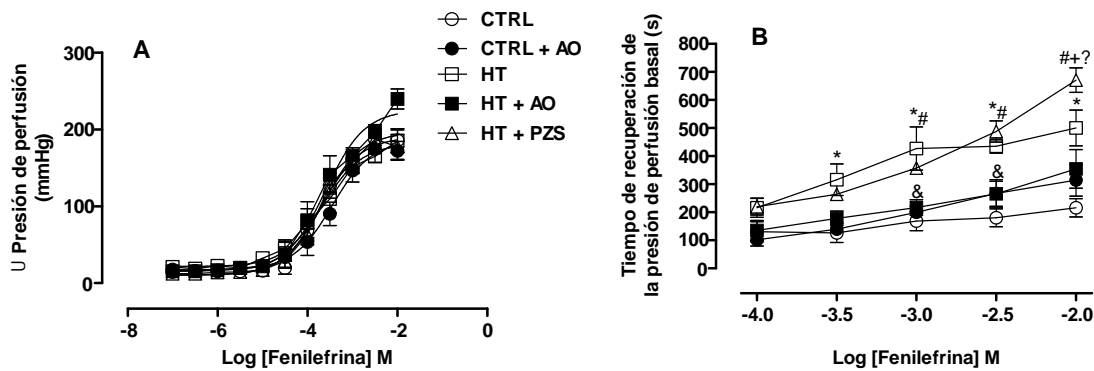
### **Efecto del aceite de aguacate sobre la función renal de ratas hipertensas**

Con la finalidad de evaluar la repercusión de los efectos benéficos del AO sobre parámetros bioquímicos que evidencian el estado de la función renal, al final del tratamiento se midió la cantidad de proteínas en orina excretadas en 24h (figura 8), se observa un aumento 2.9 veces la proteína excretada en orina en las ratas con hipertensión y el tratamiento con el AO previno este aumento en un 62%, en dichos parámetro la PZS no tuvo efectos significativos (A). Además, en la figura 8b se observa una disminución discreta de creatinina en suero promovida por el tratamiento con AO y PZS en las ratas HT comparadas con su respectivo control.

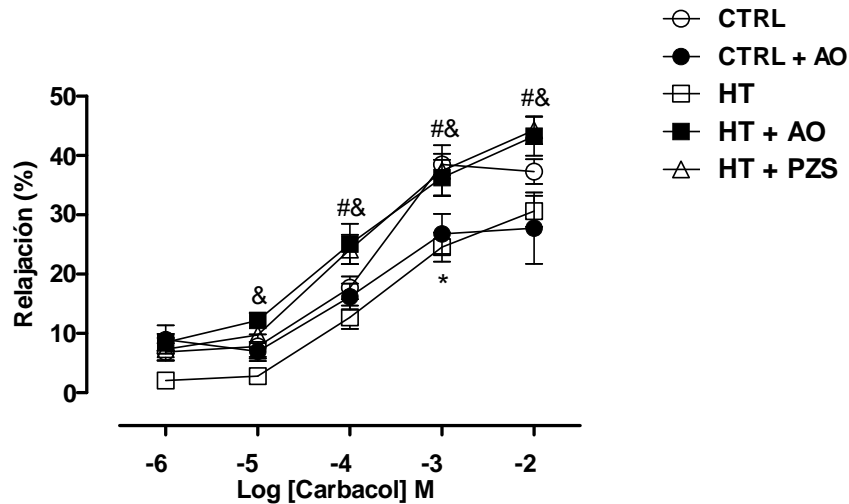
La proteinuria es generada principalmente por el daño estructural en los glomérulos renales por lo que se realizaron cortes histológicos (figura 9). Los cortes de riñón de las ratas control y control con AO presentan una arquitectura normal con glomérulos bien definidos, con cápsula de Bowman normal, túbulos contorneados distales y proximales sin cambios inflamatorios. El grupo de ratas HT presenta glomérulos fragmentados (incluso una mayor cantidad de glomérulos vacíos y disminución de la cantidad de estos), aumento del área de la cápsula de Bowman, escasa luz en el túbulo contorneado distal (TCD) y túbulo contorneado proximal (TCP) y mayor cantidad de residuos proteicos. El consumo de AO y PZS disminuyen los cambios inflamatorios observados en las ratas HT, los glomérulos presentan una mejor arquitectura, disminución de la cápsula de Bowman y menor cantidad de residuos proteicos.



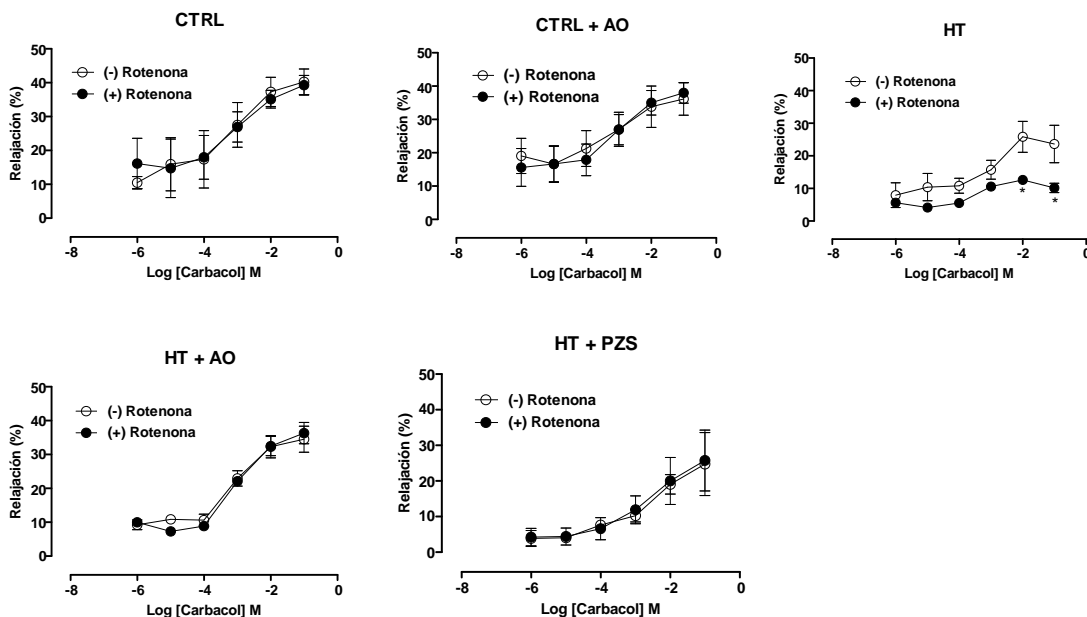
**Figura 1.** Efecto del tratamiento con aceite de aguacate (AO) o prazosina (PZS) sobre la presión arterial sistólica (A) y diastólica (B) de ratas hipertensas (L-NAME). La presión arterial fue medida 3 días antes del final de los tratamientos. Los datos representan la media  $\pm$  e.e., n=8. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas.  $P < 0.05$ .



**Figura 2.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre las respuestas vasoconstrictoras de fenilefrina (A) y el tiempo de recuperación de la presión de perfusión después de la administración de fenilefrina (B) en el riñón. Los datos representan la media  $\pm$  e.e., n=6-8. Los símbolos \* CTRL vs HT; # CTRL vs HT + PZS; & HT vs HT + AO; + HT vs HT + PZS y ? HT + AO vs HT + PZS representan diferencias significativas  $P < 0.05$ .

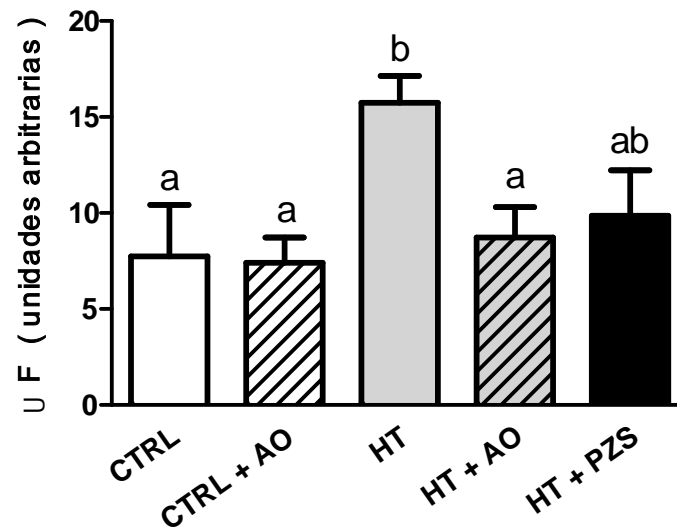


**Figura 3.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre las respuestas vasorelajantes renales a carbacol (endotelio dependientes). Se construyeron curvas concentración-respuesta a concentraciones creciente del agonista carbacol en riñones aislados y perfundidos colocados en un sistema tipo Langendorff. Los datos representan la media  $\pm$  e.e., n=4-8. Los símbolos \*CTRL vs HT; #HT vs HT + PZS; &HT vs HT + AO representan diferencias significativas  $P < 0.05$ .

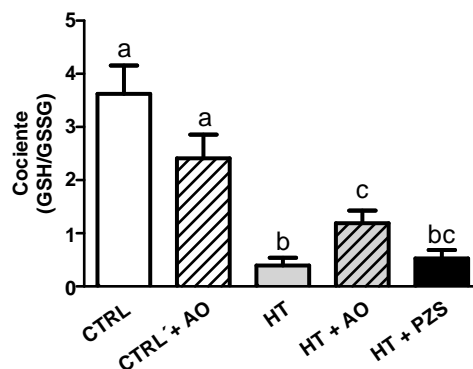


**Figura 4.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre las respuestas vasorelajantes renales a carbacol (endotelio dependientes) en presencia (+) o ausencia (-) de rotenona. Se construyeron curvas concentración-respuesta

a concentraciones creciente del agonista carbacol en riñones aislados y perfundidos. Los datos representan la media  $\pm$  e.e., n=4-8. El símbolo \* representa diferencias significativas vs <sup>(-)</sup> rotenona,  $P < 0.05$ .

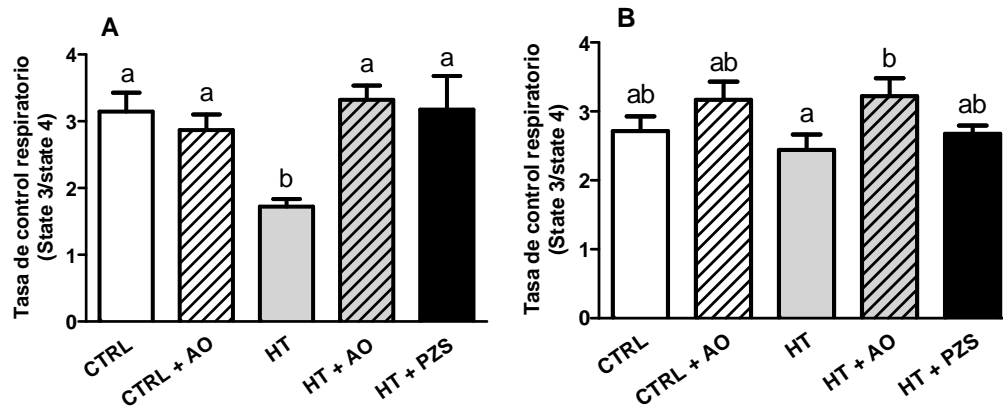


**Figura 5.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) en mitocondrias de riñón. Los experimentos se realizaron administrando glutamato/malato como sustrato respiratorio. Los niveles de ERO fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia. Los datos representan la media  $\pm$  e.e., n=4-7. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas,  $P < 0.05$ .

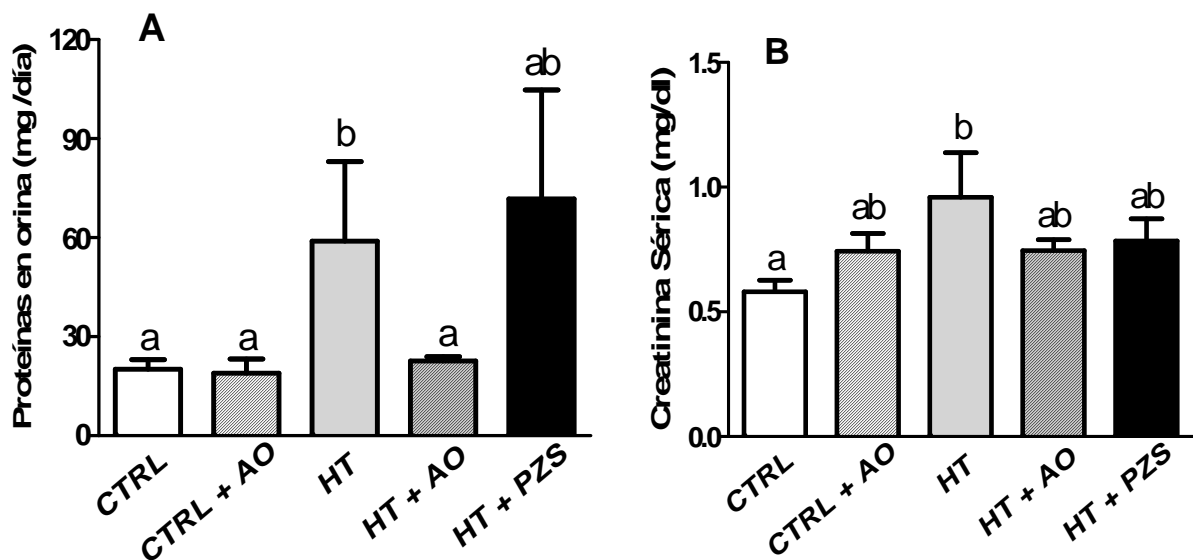


**Figura 6.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre el cociente GSH/GSSG en mitocondrias de riñón de rata. Los datos

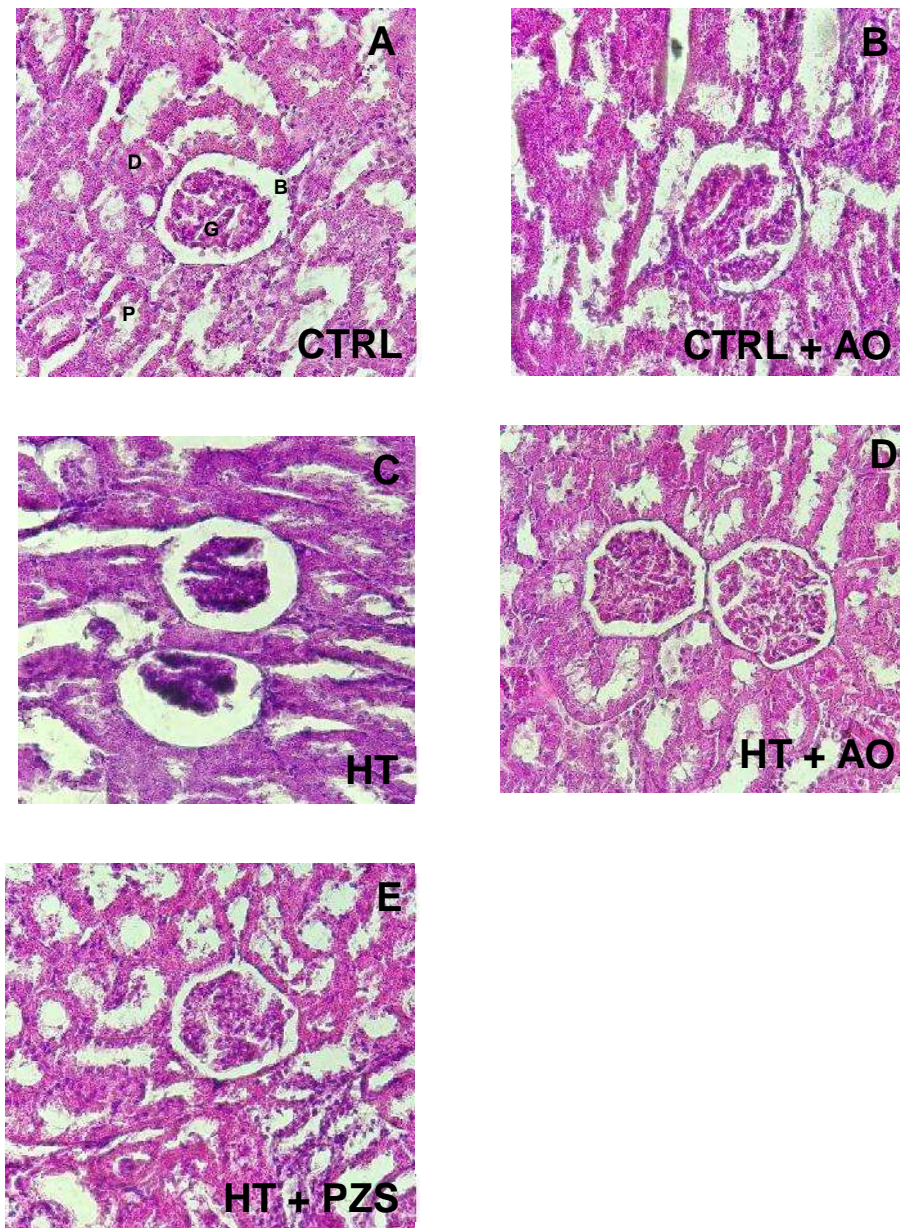
representan la media  $\pm$  e.e.,  $n=3$ . Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas,  $P<0.05$ .



**Figura 7.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre la tasa de control respiratorio (TCR) en mitocondrias de riñón. Los experimentos se realizaron administrando glutamato/malato (A) o succinato (B) como sustrato respiratorio. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.,  $n=4-5$ . Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas,  $P<0.05$ .



**Figura 8.** Efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre la proteinuria y las concentraciones séricas de creatinina. Estos parámetros fueron determinados al final del tratamiento. Los datos representan la media  $\pm$  e.e.  $n=4-5$ . Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas,  $P<0.05$ .



**Figura 9.** Microfotografías representativas de la histología glomerular (teñidas con hematoxilina-eosina), efecto del aceite de aguacate (AO) y el antagonista  $\alpha_1$ -adrenérgico prazosina (PZS) sobre el daño glomerular causado por la hipertensión. (A) CTRL, (B) CTRL + AO, (C) HT, (D) HT + AO y (E) HT + PZS. Cortes observados a 20x. B; cápsula de Bowman, D; Túbulo contorneado distal, G; Glomérulo y P; Túbulo contorneado proximal.



### 8.2.5. *Discusión*

El daño persistente a órganos provocado por la hipertensión arterial se debe *per se* al aumento y el mantenimiento de la presión arterial sistémica. A nivel renal, este aumento de la presión repercute en daños estructurales debido a la tensión marcadamente baja de  $O_2$  (10 - 60 mmHg) que este órgano mantiene de manera fisiológica (Welch, 2006), por lo que un aumento en la presión arterial sistémica por pequeño que sea puede provocar daño a los vasos sanguíneos y de manera especial al riñón. Un estudio epidemiológico demostró que el riesgo de daño renal incrementa gradualmente con el incremento de la presión arterial sistémica (Lifton et al., 2001), por lo que una disminución incluso discreta de la presión arterial puede significar un efecto benéfico a órganos blanco de la hipertensión arterial como lo es el riñón.

Con base en estos antecedentes, es evidente que el efecto antihipertensivo promovido por la administración del aceite de aguacate puede mejorar la función renal, lo cual concuerda con lo encontrado en este estudio (Fig. 9). Se ha observado que el ácido oleico posee un efecto antihipertensivo, lo cual concuerda con estudios de poblaciones del mediterráneo cuyo alto consumo de ácido oleico en forma de aceite de oliva presentan una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares (Dreher y Davenport, 2013; Terés et al., 2008). En el grupo de ratas HT tratadas con el aceite de aguacate presentó un efecto antihipertensivo tanto en la PAS como en la PAD, incluso al mismo nivel que el provocado por el fármaco antihipertensivo prazosina, lo que podría ser explicado por el alto contenido de ácido oleico presente en el aceite de aguacate de aproximadamente un 60% (Ortiz-Avila et al., 2013). Por otro lado, se ha reportado que la disminución del estrés oxidante, específicamente la disminución del estrés oxidante mitocondrial, puede disminuir la presión arterial sistémica de ratas con HT experimental. Este efecto antihipertensivo se ha atribuido al aumento de la biodisponibilidad del  $NO^*$  (agente vasodilatador) que se contrapone a los efectos presores de moléculas vasoconstrictoras (Dikalova et al., 2010). A este respecto, reportes previos de nuestro grupo de investigación ha demostrado que el consumo de aceite de aguacate disminuye el estrés oxidante mitocondrial en ratas diabéticas (Ortiz-Avila et al., 2013, 2017), por lo que existe la posibilidad de que este mecanismo pueda también explicar la disminución de la presión arterial de las ratas HT tratadas con el aceite de aguacate.

Se ha encontrado que la actividad adrenérgica se encuentra exacerbada durante la hipertensión (Ibarra et al., 2006), además de que el aumento de la actividad del sistema

renina-angiotensina-aldosterona, que se encuentra también aumentado durante la HT, ejerce un efecto potenciador de las respuestas adrenérgicas y en especial las dependientes de la activación  $\alpha_1A$ - y  $\alpha_1D$ -adrenérgicas (Jerez et al, 2004). Se ha demostrado que la actividad adrenérgica puede ser modulada de manera diferencial dependiendo de la composición de los ácidos grasos presentes en la membrana celular de las células endoteliales, de tal modo que la incorporación de ácido oleico (C18:1) en las membranas biológicas promueve la disminución de la presión arterial en modelos de HT, por un mecanismo que involucra la regulación a nivel de la señalización asociada con proteínas G (Terés et al., 2008; Yang, 2005). El efecto antihipertensivo del aceite de aguacate podría ser debido en parte a modificaciones en las respuestas no solo adrenérgicas sino también a todas aquellas señales moleculares dependientes de la activación de receptores acoplados a proteínas G, sin embargo, esta hipótesis requiere de más investigación.

El sistema nervioso simpático participa de manera importante en la regulación del flujo de sangre a nivel renal y la tasa de filtración glomerular (Pallone et al. 2012; Salomonsson et al., 2000). En la vasculatura renal las catecolaminas son liberadas de las terminales nerviosas y activan receptores acoplados a proteínas G (RAPG) en la superficie celular lo que causa contracción al incrementar las concentraciones de  $Ca^{+2}$  citosólico y activar la maquinaria contráctil de actina y miosina (Salomonsson et al., 2000). Los resultados de este estudio muestran respuestas contráctiles dependientes de la activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos similares en magnitud en todos los grupos (Fig. 2A). Sin embargo, el tiempo necesario para que la vasculatura renal vuelva a su presión de perfusión basal después de un estímulo adrenérgico, es decir, el tiempo que tarda la vasculatura en relajarse después de un estímulo vasoconstrictor adrenérgico, se encuentra significativamente aumentado en las ratas del HT (Fig. 2B), lo cual puede ser debido a un mayor tiempo de activación de los receptores adrenérgicos, lo que genera una respuesta persistente. Una de las rutas posteriores a la activación del RAPG por fenilefrina es la activación de varias isoformas de PKC, la cual es una cinasa ubicua que tiene varios sustratos en el músculo liso vascular. Una de sus principales rutas conduce a la inhibición de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina, lo que potencia la contracción vascular (Salamanca, 2006), por lo que un aumento en el tiempo de contracción producido por la activación  $\alpha_1$ -adrenérgica podría aumentar la activación de PKC y por lo tanto inhibir persistentemente la fosfatasa de la cadena ligera de miosina.

Por otra parte, la disminución de la biodisponibilidad del  $NO^*$  como agente vaso relajante se ha propuesto como el mecanismo más probable de vasodilatación atenuada en

la HT (Mcintyre et al., 1999) lo que provocaría un mayor tiempo de contracción vascular adrenérgica. Como muestra la Fig. 3, el grupo HT presenta una disminución de los efectos vasorelajantes inducidos por carbacol, lo que puede ser debido al aumento del estrés oxidante presente en este grupo como se observa en la Fig. 6, lo cual concuerda con la observación de que la activación de los RAPG incrementan la actividad de la NADPH oxidasa, con lo que aumentan los niveles de anión superóxido el cual reacciona rápidamente con  $\text{NO}^*$  generando  $\text{ONOO}^-$  y con ello disminuye la vasodilatación dependiente de  $\text{NO}^*$  (Dikalova et al., 2010), manteniendo de este modo por más tiempo las respuestas contráctiles.

El efecto benéfico del aceite de aguacate sobre las respuestas vasorelajantes del endotelio en ratas con HT puede ser explicado por la disminución del estrés oxidante (Fig. 6), lo cual concuerda con varios reportes de nuestro grupo de trabajo donde el aceite de aguacate disminuyó el estrés oxidante en mitocondrias de hígado, riñón y cerebro de ratas diabéticas (Ortiz-Avila et al. 2013, 2014a,b, 2017). Esto podría ser debido a la presencia en el aceite de  $\beta$ -sitosterol, el cual modula la actividad de enzimas antioxidantes (Vivancos y Moreno, 2005; Yoshida y Niki, 2003). Además, diversos carotenoides presentes en el aceite de aguacate también poseen efectos antioxidantes (Dutta, et al., 2005), y se ha demostrado que la administración concomitante de diversos antioxidantes, como sería el caso de administrar aceite de aguacate, promueve un efecto sinérgico que disminuye aún más el estrés oxidante (Böhm, et al. 1998). Esto hace factible la hipótesis de que al disminuir el estrés oxidante, el aceite de aguacate aumenta la disponibilidad del  $\text{NO}^*$  como agente vasodilatador, generando un mayor efecto, disminuyendo el tiempo de contracción adrenérgica y aumentando la vasodilatación generada por carbacol.

El efecto de la PZS sobre la vasodilatación renal dependiente del endotelio (Fig. 3) podría ser debido al antagonismo de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, la consecuente inhibición de la ruta DAG-PKC y, por lo tanto, la disminución en la producción de ERO y de ERN, ya que se ha demostrado que existe un aumento en la producción de ERO dependiente de la activación de PKC y NADPH oxidasa en células endoteliales, células del músculo liso vascular y células mesangiales renales (Salamanca, 2006). Por ende, la atenuación del estrés oxidante podría aumentar la vasodilatación dependiente de  $\text{NO}^*$ .

La rotenona se ha utilizado como un inductor de la producción de ERO en el complejo I de la CTE (Li et al., 2003). Los resultados de la Fig. 4C muestran que la rotenona disminuye aún más las respuestas vasorelajantes a carbacol en los riñones de las ratas HT, lo cual podría ser debido a que el aumento del estrés oxidante mitocondrial por la adición

de rotenona genera una disminución de la biodisponibilidad de  $\text{NO}^*$  como agente vasodilatador ya que se favorece la formación de  $\text{ONOO}^-$ , siendo este efecto prevenido por el tratamiento con aceite de aguacate y PZS (Fig. 4D y E) lo cual es congruente con el resultado donde estos dos tratamientos disminuyen también el estrés oxidante generado durante la HT (Fig. 6).

La producción de ERO aumentó en el grupo HT usando como sustrato respiratorio del complejo I al glutamato/malato (Fig. 5), mientras que el aceite de aguacate disminuyó la producción de ERO. Estos datos también son concordantes con la observación del aumento del estrés oxidante en el grupo HT y su disminución por el aceite de aguacate (Fig. 6). La disminución de la producción de ERO en el grupo HT+PZS (Fig. 5), podría ser explicada por el antagonismo de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, la inactivación de su cascada de señalización y una probable disminución de la actividad NADPH oxidasa (Fig. 6). Por su parte los resultados con aceite de aguacate (Fig. 6) pueden ser atribuidos a su contenido de antioxidantes incluso de manera independiente a sus efectos antihipertensivos, ya que se ha reportado que la disminución de la presión arterial *per se* no es suficiente para mitigar el estrés oxidante en modelos de HT (de Cavanagh et al., 2006). Además, es importante mencionar que la ingesta de aceite de aguacate promueve cambios en la composición lipídica de las membranas (Ortiz-Avila et al., 2015), y se ha reportado que la translocación de PKC a la membrana celular se estimula al incrementar la hidrofobicidad de PKC y es modificable dependiendo de la composición lipídica de las membranas, por lo que cambios en la composición de lípidos de membrana podría modificar la activación de PKC y sus posteriores efectos (Jin et al., 2006; Newton, 1995; Salamanca, 2006)

Como se ha mencionado anteriormente, se tienen evidencias de la formación de un círculo vicioso de generación de ERO entre la NADPH oxidasa y la mitocondria (Dikalova et al., 2010). El daño mitocondrial se hace evidente por el aumento del estrés oxidante y por la disminución del cociente respiratorio, además de que la disminución de la función mitocondrial está directamente relacionada con el estrés oxidante ya sea como causa o como consecuencia (Bernatova, 2014). La disfunción del complejo I de la CTE participa de manera importante durante la generación de estrés oxidante en diversos estados patológicos (Hirst et al., 2008; Murphy, 2009), lo cual ha sido asociado a la peroxidación del fosfolípido cardiolipina, el cual estabiliza la estructura del complejo I y optimiza su actividad (Lenaz et al., 2006). La peroxidación de la cardiolipina ha sido vinculada al deterioro de la actividad del complejo I y al aumento de la generación de ERO en este sitio de la CTE

(Paradies et al., 2002). En concordancia con lo anterior, en el grupo HT se observó una disminución en la respiración mitocondrial con un sustrato del complejo I (Fig. 7A), lo cual no ocurrió con succinato, un sustrato del complejo II (Fig. 7B). El aceite de aguacate y la PZS (Fig. 7) mejoraron la función mitocondrial de forma significativa, lo cual correlacionó con los resultados donde disminuyó la producción de ERO por dichos tratamientos (Fig. 5), lo cual podría ser debido a la presencia de una amplia variedad de antioxidantes presentes en el aceite de aguacate como se explicó anteriormente. El efecto antioxidante es más evidente en las ratas que consumieron aceite de aguacate en comparación con las ratas tratadas con PZS.

Para evaluar si el efecto benéfico del aceite de aguacate y la PZS sobre la disminución de la presión arterial, el estrés oxidante, la función mitocondrial y la función vascular tenía repercusiones sobre el funcionamiento renal, se evaluaron parámetros bioquímicos que determinan el estado fisiológico de la función renal (Fig. 8). En las ratas HT + AO se observó una disminución de la proteinuria que no fue observada con el tratamiento con PZS (Fig. 8A), a pesar de que ambos tratamientos bajaron al mismo nivel la presión arterial en las ratas HT. Sin embargo, los resultados muestran que el aceite de aguacate disminuye el estrés oxidante en una proporción mayor que la PZS. Ambos tratamientos no disminuyeron la cantidad de creatinina en suero (Fig. 8B).

El daño estructural a los glomérulos durante la HT causa deterioro en la filtración de proteínas y por lo tanto estas son excretadas en orina, por lo que se decidió evaluar la morfología glomerular en cortes histológicos de riñón (Fig. 9). Durante la HT aumenta la presión de filtración en los glomérulos y de esta manera, aumenta la carga filtrada y eliminación urinaria de sodio. Una de las consecuencias más relevantes de esto es la disminución del número de nefronas debido a la hiperfiltración que promueve cambios hemodinámicos glomerulares. Al disminuir el número de nefronas, se produce un aumento de la filtración glomerular en cada uno de los glomérulos remanentes para mantener la filtración glomerular global y la carga filtrada total de sodio. El aumento de la presión intraglomerular aumenta el tráfico de proteínas a través del glomérulo y del túbulo proximal, contribuyendo al desarrollo de esclerosis glomerular y fibrosis túbulointersticial. El efecto profibrótico ha sido demostrado en numerosos estudios: activa a los fibroblastos aumentando la síntesis de proteínas de la matriz extracelular en el intersticio renal, activa las células mononucleares y citocinas proinflamatorias, aumenta la expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ). Estos factores de crecimiento promueven la fibrosis intersticial renal, y son claves en el deterioro progresivo de la función renal (Qi et

al., 2004; Schieppati y Remuzzi, 2003). A través de la mayor liberación de TGF-beta también se estimula la síntesis de matriz mesangial, favoreciendo la esclerosis glomerular. El efecto antioxidante del aceite de aguacate y el antagonismo de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico durante la HT promueven un efecto benéfico tanto a nivel fisiológico (Fig. 8) como a nivel estructural renal (Fig. 9), los datos correlacionan con los resultados obtenidos en el estudio de estrés oxidante, la función mitocondrial, la presión arterial y proteinuria. Histológicamente se observan estructuras renales mejor conservadas en las ratas HT que consumieron aceite de aguacate y PZS (Figs. 9D y 9E) y se puede observar una disminución de las características inflamatorias que presentan las ratas HT.

#### *8.2.6. Conclusión*

El aceite de aguacate previene el daño glomerular y el deterioro de la función renal durante la hipertensión en ratas, disminuyendo el tiempo de la vasoconstricción  $\alpha_1$ -adrenérgica renal, la formación de ERO y el estrés oxidante, y mejora además el funcionamiento mitocondrial.

### 8.2.7. Bibliografía

Akerboom, T., y Sies, H. (1981). Assay of Glutathione Disulfide and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology*, 77; 373-382.

Araujo, M., y Wilcox, C. S. (2014). Oxidative Stress in Hypertension: Role of the Kidney. *Antioxidants y Redox Signaling*, 20(1), 74–101.

Bernatova, I. (2014). Endothelial dysfunction in experimental models of arterial hypertension: Cause or consequence? *BioMed Research International*.

Böhm, F., Edge, R., McGarvey, D. J., y Truscott, T. G. (1998).  $\beta$ -Carotene with vitamins E and C offers synergistic cell protection against NO(x). *FEBS Letters*, 436(3), 387–389.

de Cavanagh, E. M. V, Toblli, J. E., Ferder, L., Piotrkowski, B., Stella, I., y Inserra, F. (2006). Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(6), R1616–R1625.

Dikalov, S. I., Nazarewicz, R. R., Bikineyeva, A., Hilenski, L., Lassè Gue, B., Griendling, K. K., Dikalova, A. E. (n.d.). Nox2-Induced Production of Mitochondrial Superoxide in Angiotensin II-Mediated Endothelial Oxidative Stress and Hypertension. 20, 281–294.

Dikalov, S. I., y Ungvari, Z. (2013). Role of mitochondrial oxidative stress in hypertension. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 305(10), H1417–H1427.

Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., Dikalov, S. I. (2010). Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation Research*, 107(1), 106–116.

Dreher, M. L., y Davenport, A. J. (2013). Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53:738–750.

Dutta, D., Utpal-Ray, C., y Runu, C. (2005). Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. *African Journal of Food Science*, 4(13), 1510–1520.

GORNALL, A. G., BARDAWILL, C. J., y DAVID, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 177(2), 751–766.

Hao, L., Nishimura, T., Wo, H., y Fernandez-Patron, C. (2006). Vascular responses to  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(4), 819–825.

Hirst, J., King, M. S., y Pryde, K. R. (2008). The production of reactive oxygen species by complex I, 36, 976–980.

Ibarra, M., López-Guerrero, J. J., Mejía-Zepeda, R., y Villalobos-Molina, R. (2006). Endothelium-dependent inhibition of the contractile response is decreased in aorta from aged and spontaneously hypertensive rats. *Archives of Medical Research*, 37(3), 334–341.

- Ikedá, N., Lozano, R., Murray, C. J., Guerrero, R., Aekplakorn, W., Sapienza, D., ... Naghavi, M. (2013). Control of hypertension with medication: a comparative analysis of national surveys in 20 countries. *Bulletin of the World Health Organization*, 92(1), 10–19C.
- Jerez, S., De Bruno María, P., y Alfredo, C. (2004). Cross Talk between Angiotensin II and Alpha 1 Adrenergic Receptors in Rabbit Aorta: Role of Endothelium. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 43(3), 402–409.
- Jin, L., Ying, Z., Hilgers, R. H. P., Yin, J., Zhao, X., Imig, J. D., y Webb, R. C. (2006). Increased RhoA/Rho-kinase signaling mediates spontaneous tone in aorta from angiotensin II-induced hypertensive rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(1), 288–295.
- Lenaz, G., Fato, R., Genova, M. L., Bergamini, C., Bianchi, C., y Biondi, A. (2006). Mitochondrial Complex I: Structural and functional aspects. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1757(9–10), 1406–1420.
- Li, J., Cao, Y. X., Liu, H., y Xu, C. B. (2007). Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium-dependent relaxation in hypertension. *European Journal of Pharmacology*, 557(2–3), 186–194.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J. A., y Robinson, J. P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8516–8525.
- Lifton, R. P., Gharavi, A. G., Geller, D. S., y Hughes, H. (2001). *Molecular Mechanisms Review of Human Hypertension*, 104, 545–556.
- Márquez-Ramírez, C. A., Hernández de la Paz, J. L., Ortiz-Avila, O., Raya-Farias, A., González-Hernández, J. C., Rodríguez-Orozco, A. R., Cortés-Rojo, C. (2018). Comparative effects of avocado oil and losartan on blood pressure, renal vascular function, and mitochondrial oxidative stress in hypertensive rats. *Nutrition*, 54, 60–67.
- Mcintyre, M., Bohr, D. F., y Dominiczak, A. F. (1999). The Role of Superoxide Anion, 539–545.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species, 13, 1–13.
- Newton, A. C. (1995). Protein kinase C: Structure, function, and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(48), 28495–28498.
- Ortiz-Avila, O., Figueroa-García, M. del C., García-Berumen, C. I., Calderón-Cortés, E., Mejía-Barajas, J. A., Rodríguez-Orozco, A. R., ... Cortés-Rojo, C. (2017). Avocado oil induces long-term alleviation of oxidative damage in kidney mitochondria from type 2 diabetic rats by improving glutathione status. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49(2), 205–214.
- Ortiz-Avila, O., Gallegos-Corona, M. A., Sánchez-Briones, L. A., Calderón-Cortés, E., Montoya-Pérez, R., Rodríguez-Orozco, A. R., Cortés-Rojo, C. (2015). Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative



stress in liver mitochondria from diabetic rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(4), 337–353.

Ortiz-Avila, O., Sámano-García, C. A., Calderón-Cortés, E., Pérez-Hernández, I. H., Mejía-Zepeda, R., Rodríguez-Orozco, A. R., ... Cortés-Rojo, C. (2013). Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type I diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45(3), 271–287.

Pallone, T. L., Edwards, A., y Mattson, D. L. (2012). Renal medullary circulation. *Comprehensive Physiology*, 2(1), 97–140.

Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., y Ruggiero, F. M. (2002). Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage, 286, 135–141.

Paul D. Ray, Bo-Wen Huang, y Yoshiaki T. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell signal*, 29(6), 997–1003.

Qi, W., Chen, X., Polhill, T. S., Gilbert, R. E., Pollock, C. A., Twigg, S., y Poronnik, P. (2004). Integrated actions of transforming growth factor- $\beta$  1 and connective tissue growth factor in renal fibrosis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 288(4), F800–F809.

Qiu, C., Engels, K., y Baylis, C. (1994). Angiotensin II and alpha 1-adrenergic tone in chronic nitric oxide blockade-induced hypertension. *The American Journal of Physiology*, 266(5 Pt 2), R1470-6.

Saavedra-Molina A, Devlin TM (1997) Effect of extra-and intra-mitochondrial calcium on citrulline synthesis. *Amino Acids* 12(3–4): 293–298.

Salamanca, D. A. (2006). Protein Kinase C isoforms as Specific Targets for Modulation of Vascular Smooth Muscle Function in Hypertension. *Biochemical Pharmacology*, 70(11), 1537–1547.

Salomonsson, M., Brännström, K., y Arendshorst, W. J. (2017).  $\alpha_1$ -Adrenoceptor subtypes in rat renal resistance vessels: in vivo and in vitro studies. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 278(1), F138–F147.

Schieppati, A., y Remuzzi, G. (2003). The future of renoprotection: Frustration and promises. *Kidney International*, 64(6), 1947–1955.

Taverne, Y. J., Bogers, A. J., Duncker, D. J., y Merkus, D. (2013). Reactive oxygen species and the cardiovascular system. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 862423.

Terés, S., Barceló-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J. E., y Escribá, P. V. (2008). Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(37), 13811–6.

Tsai, M.-H., y Jiang, M. J. (2010). Reactive oxygen species are involved in regulating alpha1-adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction. *Journal of Biomedical Science*, 17, 67.

Vivancos, M., y Moreno, J. J. (2005). -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(1), 91–97.

Welch, W. J. (2006). Intrarenal oxygen and hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(10), 1002–1005.

World Health Organization (2013). Información general sobre la hipertensión en el mundo. *Oms*, 1–39.

[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO\\_DCO\\_WHD\\_2013.2\\_spa.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/87679/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_spa.pdf)

Yang, Q. (2005). Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Molecular Pharmacology*, 68(1), 210–217.

Yoshida, Y., y Niki, E. (2003). Antioxidant Effects of Phytosterol and Its Components Human Stress Signal Research Center ( HSSRC ), National Institute of Advanced Industrial Science and Technology phatidylcholine ( PLPC ) and dimyristoyl phosphatidyl choline ( 14 : 0 PC ) were purchase. *J Nutr Sci Vitaminol*, 49, 277–280.

Zalba, G., Jose, G. S., Moreno, M. U., Fortuno, M. a., Fortuno, a., Beaumont, F. J., y Diez, J. (2001). Oxidative Stress in Arterial Hypertension: Role of NAD(P)H Oxidase. *Hypertension*, 38(6), 1395–1399.

## 9. Discusión general

La hipertensión arterial cursa como una enfermedad silenciosa al no presentar síntomas, debido a esto cerca de la mitad de las personas con HT no son diagnosticadas a tiempo, lo que favorece el desarrollo de los efectos crónicos de la HT en la población (ENSANUT, 2016). De manera general, la hipertensión arterial genera una disminución en el aporte de nutrientes y oxígeno a todo el organismo, sin embargo, hay órganos particularmente susceptibles a estos efectos, como el riñón.

Las complicaciones de la HT se relacionan directamente con la magnitud del aumento de la presión arterial y el tiempo de evolución; en la encuesta del año 2012, 47.8% de los adultos con HT fueron hallazgo de la encuesta, es decir, no habían sido diagnosticados (ENSANUT, 2012), y por lo tanto, tienen mayor riesgo de padecer enfermedades secundarias a la hipertensión. La importancia de la disminución y mantenimiento de la presión arterial en un paciente con hipertensión radica en que los daños a órganos blanco aumentan proporcional al aumento de la presión arterial, inclusive se tienen evidencias que el aumento de la PAS y PAD en valores de 20 y 10mmHg, respectivamente, aumentan el riesgo de mortalidad (Prospective Studies Collaboration, 2002), datos particularmente relevantes para la American Heart Association y la American Stroke Association que han recomendado nuevas cifras para evaluar la presión arterial de las personas, estableciendo considerar elevada la presión arterial en valores de PAS de 120-129mmHg y recomendando cambios en el estilo de vida y una reevaluación de la presión en 3-6 meses posteriores, con la finalidad de retardar los efectos secundarios (Smith et al., 2017). En nuestros resultados el AO disminuyó la presión arterial en las ratas HT incluso a valores similares a las ratas que tomaron el fármaco antihipertensivo prazosina, un antagonista de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgico. En experimentos conjuntos se evaluó también el antihipertensivo losartán cuyo efecto fue más eficaz al normalizar la presión arterial de las ratas HT. Estos datos sugieren una mayor participación de los receptores  $AT_1$  en este modelo de HT. Por otro lado, el aceite de aguacate disminuyó la PAS en 28mmHg y la PAD en 29mmHg, por lo que con base en los antecedentes, podría disminuir el riesgo de mortalidad al doble (Prospective Studies Collaboration, 2002).

Identificar a tiempo a los pacientes con hipertensión permitiría tomar medidas correspondientes para disminuir la presión arterial y con ello evitar o al menos retrasar la

aparición de enfermedades como el daño renal, una enfermedad incapacitante y de altos costos económicos tanto para el paciente como para los sistemas de salud. (ENSANUT, 2012).

Existen cada vez más pruebas científicas que sostienen la hipótesis de que ciertos alimentos, como el aceite de aguacate, contienen componentes que poseen efectos fisiológicos benéficos, y que además son propuestos como una opción en las dietas saludables.

La HT es una enfermedad cuyas causas aún no son completamente conocidas, pero se conoce que ciertas moléculas y sus rutas de acción están alteradas en humanos y en diversos modelos de hipertensión experimental, como los receptores que se encuentran acoplados a proteínas G, de los cuales se tienen evidencias que tienen una alta actividad durante la hipertensión y además participan en la disfunción del endotelio vascular, el cual juega un papel central en la relajación de las arterias (Li, Cao, Liu, y Xu, 2007). La Ang II y la noradrenalina son moléculas vasoactivas que han sido ampliamente investigadas y relacionadas con la génesis y el mantenimiento de la hipertensión, y ambas tienen receptores específicos en la membrana de las células del músculo liso vascular acoplados a proteínas  $G_{q/11}$ , por lo que al ser activados estos receptores generan movilización de calcio al citosol provocando contracción vascular. Se investigó la participación de la activación de los receptores  $AT_1$  y  $\alpha_1$ -adrenérgicos durante la HT y se observó que las respuestas a Ang II se encuentran alteradas a nivel renal al menos a una concentración de Ang II de  $1 \times 10^{-6}$  M, mientras que las respuestas vasoconstrictoras de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos no se encuentran alteradas. Una posibilidad no explorada en esta investigación para la explicación de estos resultados es la remodelación de receptores presentes en la vasculatura renal de estas ratas y la posible internalización de estos como mecanismo para disminuir la presión arterial. Sin embargo, algo notable en los grupos HT que recibieron aceite de aguacate fue la rápida disminución de la presión de perfusión renal después de la contracción en respuesta a Ang II y fenilefrina.

El control de la presión arterial se lleva a cabo mediante mecanismos de vasoconstricción y vasorelajación que se contraponen para mantener un equilibrio y mantener en sus límites normales la presión arterial. La relajación vascular dependiente del endotelio a través de la liberación de  $NO^*$  juega un papel central en este equilibrio de contracción-relajación. En nuestros resultados las ratas con HT muestran deterioro de la función relajante derivada del endotelio posterior a la contracción renal con Ang II y

fenilefrina, mientras que el aceite de aguacate, el losartán y la prazosina previnieron este efecto por un mecanismo aún pendiente de investigar, pero que presumiblemente involucra la disminución de la presión arterial sistémica y/o la disminución del estrés oxidante mitocondrial. Sin embargo, para dilucidar el mecanismo propuesto es necesario investigar la participación de dos enzimas clave en el modelo hipotético propuesto, la NADPH oxidasa y la PKC y por otra parte, la participación de enzimas antioxidantes.

El aceite de aguacate contiene  $\beta$ -sitosterol, el cual induce la actividad de enzimas antioxidantes tales como la superóxido dismutasa de manganeso y la glutatión peroxidasa (Vivancos y Moreno, 2005). El aceite de aguacate mejoró la función mitocondrial renal y disminuyó el estrés oxidante, por lo que una hipótesis que podría explicar esto es que el aceite de aguacate puede mimetizar los efectos antioxidantes indirectos del losartán (de Cavanagh et al., 2003, 2006) al igual que la prazosina, pero por un mecanismo distinto que involucre las respuestas dependientes de la activación de proteínas G, y por lo tanto, atenuando la formación de ERO.

Los resultados de este estudio revelan que el bloqueo de los receptores  $AT_1$  para Ang II (losartán) y de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (prazosina) disminuyen la formación de ERO en mitocondrias de riñón de ratas HT y esto genera un efecto benéfico en la función mitocondrial. El aceite de aguacate reproduce resultados similares pero el mecanismo permanece pendiente de explicar. Sin embargo, los efectos de los tratamientos con losartán, prazosina y aceite de aguacate en ratas hipertensas, repercuten de manera fisiológica en la función renal, disminuyendo la proteinuria y el daño glomerular presentes durante la hipertensión. Se puede proponer que el efecto benéfico de todos los tratamientos se debe en gran medida a la disminución del desequilibrio redox mitocondrial encontrado en las ratas HT, cuyos efectos fueron más pronunciados con el tratamiento con aceite de aguacate y losartán que con prazosina. Hipotéticamente, al disminuir el estrés oxidante podría aumentar la biodisponibilidad del  $NO^*$  como agente vasodilatador, lo que mejoraría las respuestas vasorelajantes, el aporte de nutrientes y la detoxificación renal. Además, disminuiría la producción de  $O_2^-$  y de  $ONOO^-$ , y con ello aumenta la tensión de  $O_2$  renal, lo que reduciría el estado hipóxico y la fibrosis renal, que a su vez prevendría el deterioro estructural de las nefronas y mejoraría la reabsorción de proteínas y evitaría la proteinuria.

## **10. Conclusión general**

El aceite de aguacate previene el daño de la función renal, mejorando la vasodilatación renal dependiente del endotelio frente a estímulos constrictores dependientes de la activación de receptores  $AT_1$  y  $\alpha_1$ -adrenérgicos, por un mecanismo que involucra disminución del estrés oxidante y una mejor función mitocondrial.

## 11. Perspectivas

- Dilucidar si la NADPH oxidasa es un blanco de los efectos benéficos del aceite de aguacate en el daño hipertensivo renal.
- Determinar si el aceite de aguacate modula la actividad de PKC en la vasculatura renal hipertensiva.
- Evaluar si el aceite de aguacate aumenta la actividad de algunas enzimas antioxidantes que podrían mediar sus efectos benéficos en la hipertensión.

## 12. Bibliografía complementaria

B, C. Zehnder. (2005). Riñón e Hipertensión Resumen. *Rev. Med. Clin. Condes*, 16, 110–116.

Berasategi, I., Barriuso, B., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2012). Stability of avocado oil during heating: Comparative study to olive oil. *Food Chemistry*, 132(1), 439–446. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.018>.

Campos-Nonato, I., Hernández-Barrera, L., Rojas-Martínez, R., Pedroza-Tobías, A., Medina-García, C., & Barquera Dr., S. (2013). Hipertensión arterial: Prevalencia, diagnóstico oportuno, control y tendencias en adultos mexicanos. *Salud Pública de México*, 55(SUPPL.2), 144–150.

Chen, K., Thomas, S. R., Albano, A., Murphy, M. P., & Keaney, J. F. (2004). Mitochondrial function is required for hydrogen peroxide-induced growth factor receptor transactivation and downstream signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 279(33), 35079–35086. <http://doi.org/10.1074/jbc.M404859200>.

Choi, H., Allahdadi, K. J., Tostes, R. C., & Webb, R. C. (2011). Augmented S-nitrosylation contributes to impaired relaxation in angiotensin II hypertensive mouse aorta: Role of thioredoxin reductase. *Journal of Hypertension*, 29(12), 2359–2368. <http://doi.org/10.1097/HJH.0b013e32834d2554>.

Cotecchia, S. (2010). The  $\alpha_1$ -adrenergic receptors: Diversity of signaling networks and regulation. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 30(6), 410–419. <http://doi.org/10.3109/10799893.2010.518152>.

de Cavanagh, E. M. V, Piotrkowski, B., Basso, N., Stella, I., Inserra, F., Ferder, L., & Fraga, C. G. (2003). Enalapril and losartan attenuate mitochondrial dysfunction in aged rats. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(9), 1096–1098. <http://doi.org/10.1096/fj.02-0063fje>.

de Cavanagh, E. M. V, Toblli, J. E., Ferder, L., Piotrkowski, B., Stella, I., & Inserra, F. (2006). Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(6), R1616–R1625. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00615.2005>.

Dencher, N. A., Hermann, M., Pircher, H., Koziel, R., Jansen-Dürr, P., Lener, B., & Kratochwil, M. (2013). Mitochondrial respiratory chain complex I is inactivated by NADPH oxidase Nox4. *Biochemical Journal*, 452(2), 231–239. <http://doi.org/10.1042/bj20121778>.

Dikalov, S. I., Nazarewicz, R. R., Bikineyeva, A., Hilenski, L., Lassè Gue, B., Griendling, K. K., ... Dikalova, A. E. (2014). Nox2-Induced Production of Mitochondrial Superoxide in Angiotensin II-Mediated Endothelial Oxidative Stress and Hypertension. <http://doi.org/10.1089/ars.2012.4918>.



- Dikalova, A. E., Bikineyeva, A. T., Budzyn, K., Nazarewicz, R. R., McCann, L., Lewis, W., ... Dikalov, S. I. (2010). Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circulation Research*, 107(1), 106–116. <http://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.214601>.
- Dreher, M. L., & Davenport, A. J. (2013). Hass Avocado Composition and Potential Health Effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2011.556759>.
- ENSANUT Encuesta nacional de salud. (2016). Informe de resultados, 67–80. <http://doi.org/10.1111/acem.12546>.
- Franklin, S. S. (2010). The pathobiology of isolated systolic hypertension. *Hipertension Y Riesgo Vascular*, 27(1), 23–26. <http://doi.org/10.1016/j.hipert.2009.02.004>.
- Goodman Gilman A., Ruddon R. W., Molinoff P. B., Limbird L. E. y hardman J. G (1996). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. McGraw-Hill Interamericana. Vol. I Cap. 31. Pp 785-790.
- Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, H.-Á. M. (2012). Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Instituto Nacional de Salud Pública; Morelos, Cuernavaca: <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- Guyton A. C. y Hall J. E (1997). Tratado de fisiología médica. 9ª Edición, Edit. McGraw Hill Interamericana, México. Capítulo 18. pp 223-225.
- Hamm H. E., Gilchrist A (1998). Heterotrimeric G protein, *Curr. Oper. Cell. Biol.* 8, 189-196.
- Hao, L., Nishimura, T., Wo, H., & Fernandez-Patron, C. (2006). Vascular responses to  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in small rat mesenteric arteries depend on mitochondrial reactive oxygen species. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(4), 819–825. <http://doi.org/10.1161/01.ATV.0000204344.90301.7c>.
- Higgins, D. F., Kimura, K., Iwano, M., & Haase, V. H. (2008). Hypoxia-inducible factor signaling in the development of tissue fibrosis. *Cell Cycle*, 7(9), 1128–1132. <http://doi.org/10.4161/cc.7.9.5804>.
- Koriyama, H., Nakagami, H., Nakagami, F., Osako, M. K., Kyutoku, M., Shimamura, M., Morishita, R. (2015). Long-Term Reduction of High Blood Pressure by Angiotensin II DNA Vaccine in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. <http://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04534>.
- Li, J., Cao, Y. X., Liu, H., & Xu, C. B. (2007). Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium-dependent relaxation in hypertension. *European Journal of Pharmacology*, 557(2–3), 186–194. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.11.057>.
- Lifton, R. P., Gharavi, A. G., Geller, D. S., & Hughes, H. (2001). Molecular Mechanisms Review of Human Hypertension, 104, 545–556.

Lu, X., Roksnoer, L. C. W., & Danser, A. H. J. (2013). The intrarenal renin-angiotensin system: Does it exist? Implications from a recent study in renal angiotensin-converting enzyme knockout mice. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(12), 2977–2982. <http://doi.org/10.1093/ndt/gft333>.

Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species, 13, 1–13. <http://doi.org/10.1042/BJ20081386>.

Ortiz-Ávila, O., Figueroa-García, M. del C., García-Berumen, C. I., Calderón-Cortés, E., Mejía-Barajas, J. A., Rodríguez-Orozco, A. R., Cortés-Rojo, C. (2017). Avocado oil induces long-term alleviation of oxidative damage in kidney mitochondria from type 2 diabetic rats by improving glutathione status. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 49(2), 205–214. <http://doi.org/10.1007/s10863-017-9697-9>.

Ortiz-Ávila, O., Gallegos-Corona, M. A., Sánchez-Briones, L. A., Calderón-Cortés, E., Montoya-Pérez, R., Rodríguez-Orozco, A. R., Cortés-Rojo, C. (2015). Protective effects of dietary avocado oil on impaired electron transport chain function and exacerbated oxidative stress in liver mitochondria from diabetic rats. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 47(4), 337–353. <http://doi.org/10.1007/s10863-015-9614-z>.

Ortiz-Ávila, O., Sámano-García, C. A., Calderón-Cortés, E., Pérez-Hernández, I. H., Mejía-Zepeda, R., Rodríguez-Orozco, A. R., Cortés-Rojo, C. (2013). Dietary avocado oil supplementation attenuates the alterations induced by type i diabetes and oxidative stress in electron transfer at the complex II-complex III segment of the electron transport chain in rat kidney mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45(3), 271–287. <http://doi.org/10.1007/s10863-013-9502-3>.

Pokrzywinski, K. L., Biel, T. G., Kryndushkin, D., & Rao, V. A. (2016). Therapeutic targeting of the mitochondria initiates excessive superoxide production and mitochondrial depolarization causing decreased mtDNA integrity. *PLoS ONE*, 11(12), 1–22. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0168283>.

Prospective Studies Collaboration. (2002). 1-s2.0-S0140673602119118-main. *Lancet* (London, England), 360(9349), 1903–1913. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)11911-8](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11911-8).

Qiu, C., Engels, K., & Baylis, C. (1994). Angiotensin II and alpha 1-adrenergic tone in chronic nitric oxide blockade-induced hypertension. *The American Journal of Physiology*, 266(5 Pt 2), R1470-6. <http://doi.org/10.1103/PhysRevC.87.055807>.

Raveendran, R., Parasuraman, S., & Priyadharsini, R. (2014). Evaluation of the antihypertensive activity and alpha adrenergic receptor interaction of cleistanthins A and B. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 5(4), 109. <http://doi.org/10.4103/0976-0105.141950>.

Sayeski, P. P., & Bernstein, K. E. (2001). Signal transduction mechanisms of the angiotensin II type AT1-receptor: Looking beyond the heterotrimeric G protein paradigm. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 2(1), 4–10. <http://doi.org/10.3317/jraas.2001.007>.

Smith, S. C., Birtcher, K. K., Ballantyne, C. M., Orringer, C. E., Daly, D. D., Minissian, M. B., Morris, P. B. (2017). 2017 Focused Update of the 2016 ACC Expert Consensus Decision

Pathway on the Role of Non-Statins Therapies for LDL-Cholesterol Lowering in the Management of Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(14), 1785–1822. <http://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.07.745>.

Timmermans P B, Wong P C, Chiu A T, Herblin W F, Benfield P, Carini D J, Lee R J, Wexler R R, Saye J A and Smith R D. (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*. 45 (2) 205-251.

Sociedad Española de Nefrología., R., & Gorostidi, M. (2015). Hipertensión arterial secundaria: cuándo y cómo debe investigarse. *Nefrología*, 7(1), 11–21. <http://doi.org/10.3265/NefroPlus.pre2015.Jan.12946>.

Villalobos-molina, R., & Gallardo-ortiz, I. A. (2005). Mensaje Bioquímico, Participación de los adrenoceptores, XXIX, 81–93.

Vivancos, M., & Moreno, J. J. (2005). -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW 264.7 macrophages. *Free Radical Biology and Medicine*, 39(1), 91–97. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.025>.

Wangensteen, R., Valle, F. O., Del, R. G., Vargas, F., & Osuna, A. (2002). Chronic  $\alpha_1$ -adrenergic blockade improves hypertension and renal injury in L-NAME and low-renin L-NAME-DOCA hypertensive rats, 8(9), 378–385.

Welch, W. J. (2006). Intrarenal oxygen and hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 33(10), 1002–1005. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2006.04478>.

WHO World Health Organisation, (2010). Global status report on noncommunicable diseases. *World Health*, 176. <http://doi.org/ISBN 978 92 4 156422 9>.

Xu, J. Q., Harder, B. A., Uman, P., & Craig, R. (1996). Myosin filament structure in vertebrate smooth muscle. *Journal of Cell Biology*, 134(1), 53–66. <http://doi.org/10.1083/jcb.134.1.53>.

Yang, Q. (2005). Influence of the membrane lipid structure on signal processing via G protein-coupled receptors. *Molecular Pharmacology*, 68(1), 210–217. <http://doi.org/10.1124/mol.105.011692>.