



Universidad Michoacana de San Nicolás de
Hidalgo
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas



EFFECTO DEL ACEITE DE AGUACATE CONTRA EL DAÑO
OXIDATIVO MITOCONDRIAL INDUCIDO POR LA
ACTIVIDAD DE LA NADPH OXIDASA EN RIÑONES DE
RATAS HIPERTENSAS

TESIS

QUE PRESENTA:

Q.F.B BERENICE ERIDANI OLMOS ORIZABA

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ASESORES DE TESIS:

D.C ROCÍO DEL CARMEN MONTOYA PÉREZ

D.C CHRISTIAN CORTÉS ROJO

Morelia, Michoacán

Diciembre, 2018

ÍNDICE	
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Hipertensión.....	1
1.1.1 Tipos de hipertensión.....	1
1.2 Mecanismos de regulación de la presión arterial.....	2
1.2.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).....	3
1.3 Nefropatía hipertensiva.....	3
1.4 La mitocondria y el estrés oxidante.....	4
1.5 Hipertensión y estrés oxidante.....	6
1.5.1 Disfunción mitocondrial inducido por la actividad de la NAPH oxidasa....	7
1.6 Papel del Calcio en la mitocondria.....	10
1.7 Terapia antioxidante.....	10
1.8 El aceite de aguacate.....	11
2. JUSTIFICACIÓN	14
3. HIPÓTESIS	15
4. OBJETIVO GENERAL.....	16
4.1 Objetivos particulares.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS	17
5.1 Animales y grupos de experimentación.....	17
5.2. Aislamiento de mitocondrias.....	18
5.3 Medición de la actividad de la NADPH oxidasa.....	18
5.4 Medición de los niveles de NO.....	19
5.5 Medición de los niveles de ONOO.....	19
5.6 Niveles de peroxidación lipídica.....	20
5.7 Determinación de la actividad de los complejos I y II de la CTE.....	20
5.8 Evaluación del estrés oxidativo.....	21
5.9 Captación de calcio por la mitocondria.....	21
5.10 Evaluación histológica del riñón.....	22
5.11 Análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS	23
6.1 Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad de la NAPH oxidasa.....	23

6.2. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de ERN.....	24
6.3. Efecto del aceite de aguacate sobre la susceptibilidad al estrés oxidativo.	25
6.4 Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de peroxidación lipídica. ...	28
6.5 Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad de los complejos I y II de la CTE.....	29
6.6 Efecto del aceite de aguacate sobre la captación de calcio por la mitocondria.	31
6.7 Efecto del aceite de aguacate sobre los cambios histopatológicos en el riñon.	32
7. DISCUSION	34
8. CONCLUSIÓN	40
9. BIBLIOGRAFIA	41

RESUMEN

México registra la prevalencia más alta de hipertensión arterial en todo el mundo. La hipertensión arterial es una de las principales causas de insuficiencia renal terminal y también es un factor de riesgo importante para la progresión de enfermedades glomerulares y tubulointersticiales a insuficiencia renal crónica. Recientemente se ha demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis del daño renal en la hipertensión, la excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) por la NADPH oxidasa y por la mitocondria participan tanto en el establecimiento de la nefropatía hipertensiva como en la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, mejorar la función mitocondrial y disminuir el estrés oxidativo es esencial para la prevención del daño renal durante la terapia antihipertensiva. El aceite de aguacate contiene una amplia variedad de antioxidantes y ácidos grasos monoinsaturados que se ha demostrado son beneficiosos para la salud. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue determinar si el consumo de aceite de aguacate atenúa el daño renal al disminuir los niveles de ERO y ERN por la actividad de la NADPH oxidasa en la hipertensión. Para lo cual se utilizó un modelo de hipertensión en ratas en donde se evaluó la actividad de la NADPH oxidasa, los niveles de especies reactivas de nitrógeno (ERN), la susceptibilidad al estrés nitrosativo y oxidativo además de evaluar el daño renal causado por la hipertensión. La hipertensión produjo un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa y, tanto los niveles de ONOO⁻ así como la actividad del complejo I aumentaron. Además se observó una mayor captación de calcio por la mitocondria durante esta enfermedad, dando como resultado el desarrollo de la nefropatía hipertensiva, que se observó como cambios histopatológicos en el riñón. El aceite de aguacate corrigió todos estos efectos además de incrementar los niveles de GSH citoplasmático. Estos datos sugieren que el aceite de aguacate podría ser beneficioso para disminuir la progresión de la nefropatía hipertensiva al mejorar la función mitocondrial y el estado redox de la célula.

Palabras clave: hipertensión, NADPH oxidasa, nefropatía, mitocondria, ERO

ABSTRACT

Mexico registers the highest prevalence of hypertension in the world. Hypertension is one of the main causes of end-stage renal failure and is also an important risk factor for the progression of glomerular and tubulointerstitial diseases to chronic renal failure. Recently it has been shown that oxidative stress plays an important role in the pathogenesis of renal damage in hypertension, the excessive production of reactive oxygen species (ROS) by NADPH oxidase-mitochondria are involved in the establishment and progression of hypertensive nephropathy. Therefore, improving mitochondrial function and decreasing oxidative stress is essential for the prevention of kidney damage during antihypertensive therapy. Avocado oil contains a wide variety of antioxidants and monounsaturated fatty acids that have been shown to be beneficial for health. Therefore, the objective of this work was to determine if the consumption of avocado oil attenuates the renal damage by decreasing the levels of ROS and ERN due to the activity of NADPH oxidase in hypertension. For which a model of hypertension was used in rats where the activity of NADPH oxidase was evaluated, the levels of reactive nitrogen species (NRE), the susceptibility to nitrosative and oxidative stress as well as to evaluate the renal damage caused by hypertension. Hypertension exhibited an increase in activity levels of the NADPH oxidase, ONOO⁻ levels were increased as well as the in the activity of the complex I. In addition to a higher calcium uptake to the mitochondria. All these parameters resulted in the development of hypertensive nephropathy. Observed as histopathological changes in the kidney. The avocado oil corrected all of these effects. Furthermore, the treatment increase the levels of cytoplasmic GSH. These data suggest that avocado oil could be beneficial to decrease hypertensive nephropathy progression by improving mitochondrial function

Key words: hypertension, NADPH oxidase, nephropathy, mitochondria, ROS

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Hipertensión.

La hipertensión (HT) es un trastorno en el que los individuos tienen una presión arterial (PA) persistentemente elevada (OMS, 2018). La PA es expresada como la relación de la PA sistólica (la presión que la sangre ejerce sobre las paredes arteriales cuando el corazón se contrae) y la PA diastólica (la presión cuando el corazón se relaja). A nivel mundial, más de uno de cada cinco adultos tiene hipertensión (OMS 2018). En México, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (ENSANUT) reportó en 2016 que la prevalencia de la hipertensión es de un 25.5%, siendo que una de cada cuatro personas padece esta enfermedad, lo que aumenta a un 50% en personas mayores de 60 años (ENSANUT, 2016). Por lo anterior, la hipertensión se considera un problema grave de salud pública debido a que es la causa del 45% de las muertes por cardiopatías y del 51% de las muertes por accidente cerebrovascular y por sus consecuencias sociales y económicas. En Michoacán, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) reportó para el 2017, 179 fallecimientos por hipertensión (IMSS, 2018).

El diagnóstico de esta enfermedad y su tratamiento se basa en la medición de la PA. La PA normal en adultos es de 120/80 mmHg. Cuando el promedio de tres mediciones en los niveles de presión arterial es igual o mayor que 140/90 mmHg se considera un estado de hipertensión sistémica en estadio 1 y en estadio 2 cuando los niveles de PA son mayores o iguales a 160/100 mmHg (OMS, 2018).

1.1.1 Tipos de hipertensión.

Existen tres tipos principales de hipertensión:

- Hipertensión primaria o esencial: alrededor del 95% de los adultos con PA alta tienen hipertensión primaria con una etiología desconocida, aunque se conocen algunos factores que afectan la regulación de la presión arterial tales la ingesta excesiva de sal, la obesidad y el estilo de vida sedentario.

- Hipertensión sistólica aislada o predominante: es debida a la rigidez de la aorta a medida que aumenta la edad y se caracteriza por presiones sistólicas elevadas en personas de edad avanzada.
- Hipertensión secundaria: se refiere a un número relativamente pequeño de casos, alrededor del 5% de todos los tipos de hipertensión, donde la causa de la presión arterial alta puede identificarse y, a veces, tratarse. Los principales tipos de hipertensión secundaria son la enfermedad renal crónica, la estenosis de la arteria renal, la secreción excesiva de aldosterona y la apnea del sueño. (Lifton et al., 2011) (Martins et al., 2011).

1.2 Mecanismos de regulación de la presión arterial.

La regulación de la PA está determinada por la acción del sistema nervioso autónomo (SNA) y los centros de regulación cardiovascular del sistema nervioso central (SNC), los factores vasodilatadores y vasoconstrictores y el riñón. La regulación nerviosa mantiene los niveles de PA mediante la corrección y el reajuste instantáneo de los cambios de PA. Los sistemas humorales participan junto con el sistema nervioso simpático (SNS) en la regulación del diámetro de las arterias, por lo que son responsables de los cambios de la resistencia periférica. Tanto el SNS como los sistemas humorales participan en la regulación del crecimiento de los distintos tipos de células de la pared arterial, que tienen influencia sobre la resistencia periférica. El riñón participa en la regulación de la PA a largo plazo, a través del control de la volemia y por tanto, del gasto cardíaco, mediante la regulación de la excreción de iones y agua. Además, el SNS y muchos agentes humorales vasoactivos participan también en la regulación de la función renal, al ser responsables indirectos de la acción del riñón en la regulación de la PA (Lahera et al., 2010).

1.2.1 Sistema renina-angiotensina-aldosterona.

El sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) es uno de los mecanismos hormonales más importantes del control de la estabilidad hemodinámica, mediante la regulación de la presión arterial, el volumen de líquidos y el equilibrio sodio-potasio (Te Riet et al., 2015).

La renina se sintetiza en los riñones en su forma inactiva y se libera a la circulación en respuesta a bajos niveles de sodio intratubular, hipotensión en las arteriolas aferentes del glomérulo renal y activación simpática. En el torrente sanguíneo, la pro-renina es activada y cataliza la hidrólisis del angiotensinógeno a angiotensina I, la que, a su vez, por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), se convierte en angiotensina II, el principal efector del SRAA (Putnam et al., 2012). La angiotensina II se une en la vasculatura a su receptor AT_1 , que es miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G con siete dominios transmembranales (Pérez-Díaz et al., 2006). Una vez activo, su proteína efectora tipo $G_{q/11}$ activa a la fosfolipasa C (PLC). A su vez, la PLC hidroliza al fosfatidilinositol bifosfato (PIP_2) convirtiéndolo en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP_3). Por su parte el IP_3 se une a receptores específicos de calcio, lo que promueve un aumento de la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular libre y la formación del complejo Ca^{2+} -calmodulina que activa la maquinaria contráctil del músculo liso vascular (Khalil et al., 2010).

1.3 Nefropatía hipertensiva.

En cuanto mayor es la PA de una manera persistente, más alto es el riesgo de desarrollar complicaciones como insuficiencia cardíaca, accidente cerebrovascular y enfermedades renales (OMS, 2018).

Una de las complicaciones de la hipertensión es la nefropatía hipertensiva, que se refiere al daño renal o insuficiencia renal derivado de la presencia de hipertensión arterial como único factor etiológico (Romero et al., 2001). La

hipertensión es un factor de riesgo tanto para el desarrollo de la enfermedad renal crónica (ERC) como para su progresión. En México, las cifras de morbilidad son alarmantes al ser la ERC hipertensiva una de las principales causas de atención en hospitalización y en los servicios de urgencias (Méndez-Durán et al., 2009).

Existe una relación directa entre el control de la PA y el riesgo de desarrollar ERC. La elevación de la presión arterial sistémica tiene como consecuencia un incremento en la presión intraglomerular, que puede activar factores de crecimiento que contribuyen al desarrollo de hipertrofia, provocando daño glomerular y disminuyéndose así el número de nefronas funcionales, con la consecuente reducción de la capacidad del filtrado glomerular (Olmo et al., 2013).

No obstante que la PA alta es un factor clave en el riesgo de desarrollar ERC, se ha demostrado que este no es el único factor determinante que participa en el progreso de esta enfermedad, ya que la normalización de la PA por sí misma no previene la progresión de la ERC, sino que también es necesaria la disminución del estrés oxidante que se genera en el citosol y la mitocondria para atenuar su desarrollo (Cavanagh et al., 2006).

1.4 La mitocondria y el estrés oxidante.

La mitocondria produce la mayor parte del trifosfato de adenosina (ATP) que se utiliza como fuente de energía química en la célula. Además, las mitocondrias están implicadas en los procesos de señalización celular, diferenciación, crecimiento y muerte celular programada, así como en el control del ciclo celular (McBride et al., 2006).

La producción de ATP se lleva a cabo mediante la fosforilación oxidativa gracias al funcionamiento de la cadena transportadora de electrones (CTE) (Fig. 1). Los electrones de los equivalentes reducidos NADH y FADH₂ generados durante el catabolismo, son transportados secuencialmente a través de los diferentes complejos de la CTE. Los electrones son transferidos a los complejos I (NADH deshidrogenasa) y II (succinato deshidrogenasa) respectivamente. La ubiquinona o

coenzima Q acepta los electrones de estos dos complejos, sufriendo dos reacciones de reducción a ubisemiquinona y ubiquinol, recibiendo un electrón a la vez.

Estos electrones son transportados al complejo III (ubiquinol-citocromo c oxidorreductasa), al citocromo *c* y al complejo IV (citocromo *c* oxidasa) que los utiliza para reducir al O_2 hasta H_2O . Acoplado al transporte de electrones, los complejos I, III y IV de la cadena translocan protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana dado que las reacciones redox que ocurren en esos complejos de la CTE son lo suficientemente exergónicas para impulsar a los H^+ en contra de su gradiente de concentración. Esto genera un potencial de membrana que utiliza la F_1F_0 -ATP sintasa para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Martínez-Abundis et al., 2009).

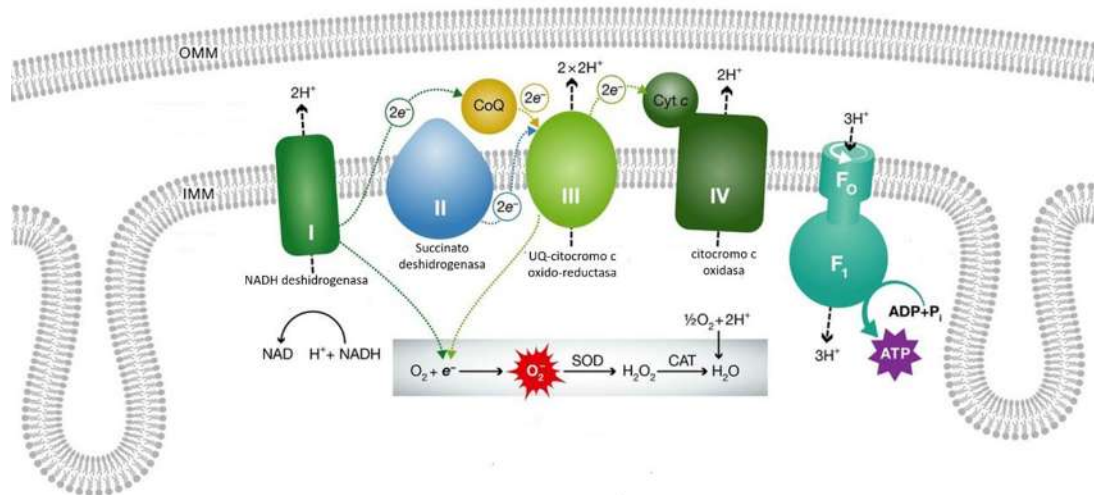


Figura 1. Funcionamiento de la CTE, la fosforilación oxidativa y la generación de especies reactivas de oxígeno. Tomada y modificada de Dorn, 2015.

Debido al alto potencial redox del par O_2/H_2O se generan especies reactivas de oxígeno (ERO) en conjunto con la fuga de electrones en los sitios redox de los complejos I y III. Los electrones reaccionan con el O_2 dando como resultado la formación de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que es la ERO primaria producida por la mitocondria. La superóxido dismutasa mitocondrial (SODmt) dependiente de Mn convierte al $O_2^{\cdot-}$ en peróxido de hidrógeno H_2O_2 , el cual en presencia de iones Fe^{2+} o Cu^{+1} forma el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), un radical altamente reactivo con toda clase

de biomoléculas. Para equilibrar la respuesta oxidante, la célula dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de ERO preservando la integridad mitocondrial. Estos incluyen los sistemas antioxidantes enzimáticos (SAE) y no enzimáticos (SAN), los principales SAE son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GSH-PX), mientras que dentro de los SAN se incluyen compuestos de bajo peso molecular, como vitaminas (vitaminas C y E), β -carotenos, ácido úrico y el glutatión (GSH). La regulación del estado redox es fundamental para la viabilidad, activación, proliferación y función de las células (Birben et al., 2012)

1.5 Hipertensión y estrés oxidante.

El estrés oxidante ocurre cuando existe un desequilibrio entre la generación de ERO y los sistemas de defensa antioxidante. Enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, la aterosclerosis o el envejecimiento están relacionadas con una sobreproducción de ERO.

Recientemente, se ha encontrado que la angiotensina II promueve la producción vascular de ERO tanto en el citoplasma celular como en la mitocondria (Dikalova et al., 2010), lo que induce disfunción endotelial debido a que el $O_2^{\cdot-}$ inactiva al óxido nítrico (NO), que es crucial para el mantenimiento del tono vascular como factor vasorelajante del endotelio. Además, se ha observado una reducción en la actividad de la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa así como una mayor producción de H_2O_2 en sujetos hipertensos recién diagnosticados y no tratados (Amanullah et al., 2012). El estrés oxidante también se incrementa notablemente en pacientes hipertensos con enfermedad renovascular.

Existen diferentes fuentes de ERO en los vasos sanguíneos, una de las mejor caracterizadas es la NADPH oxidasa (Nox), otras enzimas incluyendo la óxido nítrico sintasa (NOS), la xantina oxidasa y, como se mencionó anteriormente, la mitocondria pueden contribuir a la generación de ERO. En la vasculatura y en el riñón, la Nox es una fuente importante de ERO por lo que tiene un papel importante en el daño vascular y la disfunción renal (Fearheller et al., 2009).

1.5.1 Disfunción mitocondrial inducido por la actividad de la NAPH oxidasa.

Las NADPH oxidasas (Nox) son una familia de complejos enzimáticos que catalizan la transferencia de electrones del NADPH al O_2 a través del sitio catalítico de la enzima, generando $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Dikalov et al., 2014). Se han identificado diferentes isoformas de esta enzima (Nox1, Nox2, Nox4 y Nox5) siendo la Nox2 la principal fuente de $O_2^{\cdot-}$ en células endoteliales (Murdoch et al., 2011). Este complejo multiproteico consta de cinco subunidades distribuidas en el citoplasma y la membrana plasmática. Las subunidades que se localizan en el citoplasma son las proteínas p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox} y Rac (figura 2) mientras que en la membrana plasmática se localizan las subunidades p22^{phox} y gp91^{phox} (Figura 3) (Arango et al., 2010).

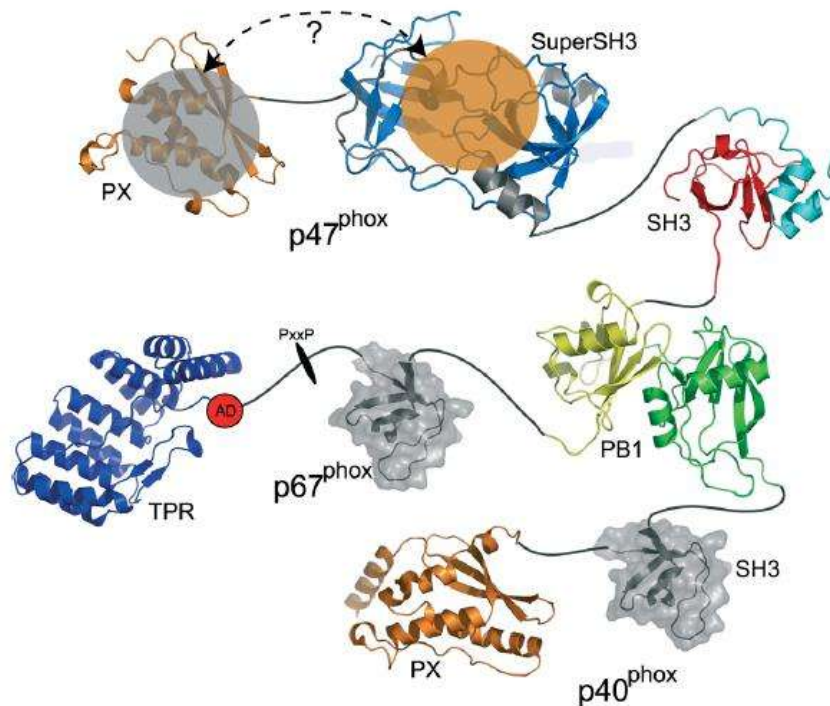


Figura 2. Estructura de las subunidades citoplasmáticas de la NADPH oxidasa en donde se muestran las interacciones proteína-proteína formadas durante el estado de reposo, basadas en estructuras disponibles de rayos X y RMN. Tomada y modificada de Groemping et al., 2005.

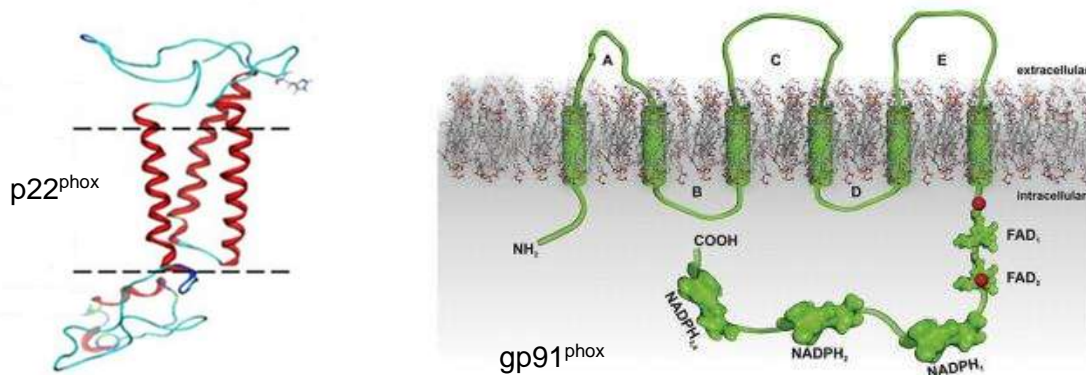


Figura 3. Estructura de las subunidades p22^{phox} y gp91^{phox} de las Nox localizadas en la membrana plasmática. Tomada y modificada de Hayes et al., 2015.

La activación vascular de la Nox por la Angiotensina II incrementa la producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (Nazarewicz et al., 2013) al aumentar las concentraciones de diacil glicerol (DAG), la cual activa a la proteína cinasa C (PKC) (Khalil et al., 2010). La PKC es capaz de fosforilar a la subunidad de la Nox p47^{phox} que cuenta con dos dominios SH3 en el centro de la molécula, un motivo rico en prolinas PP en el extremo C-terminal y un domino PX/PB2 en el N-terminal. Durante la activación del sistema, p47^{phox} es fosforilada aproximadamente en nueve sitios, generando cambios de conformación que le permiten interactuar con p67^{phox} para dar inicio a la translocación de los factores citosólicos a la membrana citoplasmática. El complejo es traslocado a la membrana y ensamblado a través de la interacción SH3 de p47^{phox} y las regiones ricas en prolina de p22^{phox} (Arango et al., 2010).

La Nox activada cataliza la generación de $O_2^{\cdot-}$ mediante la transferencia de un electrón desde el NADPH hacia el O_2 . El anión $O_2^{\cdot-}$ formado puede reaccionar con el NO en una reacción no enzimática, para formar radical peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) que es una especie altamente oxidante capaz de reaccionar y modificar a un gran número de biomoléculas como aminoácidos, proteínas, y cofactores. Además, puede inducir nitración de residuos de tirosina promoviendo la formación de 3-nitrotirosina. El $ONOO^{\cdot-}$ puede difundir a través de las membranas mitocondriales y

llevar a cabo reacciones de oxidación y nitración de componentes críticos de la mitocondria, conduciendo a alteraciones en la función mitocondrial, la homeostasis del Ca^{2+} y promoviendo la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP) (Radi R. et al., 2002). Bajo estas condiciones, se incrementa la producción de ERO en la mitocondria por la cadena de transporte de electrones (CTE) que pueden activar aún más a la NADPH oxidasa a través de PKC y vías dependientes de la tirosina cinasa de proteínas c-Src (Dikalov S. et al., 2014), por lo que existe una interacción importante entre estas dos fuentes de ERO y el daño endotelial durante la hipertensión (Figura 4).

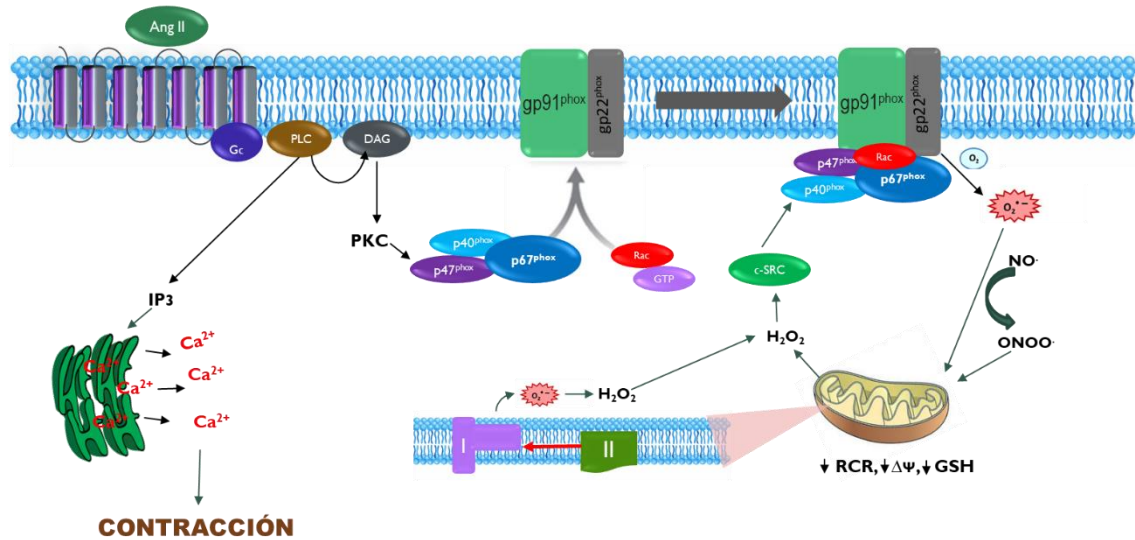


Figura 4. Papel de la mitocondria en la disfunción endotelial y la hipertensión. Tomada y modificada por Doughan et al., 2008.

Si bien las ERO sirven como moléculas de señalización para regular los procesos biológicos y fisiológicos que van desde la regulación de la expresión génica hasta la estimulación del factor de crecimiento y la generación de la respuesta inflamatoria (Finkel et al., 2011), durante la hipertensión existe una disminución de sistemas antioxidantes como la SOD y el GSH debido al incremento

en la producción de ERO, por lo que el aumento en las ERO puede inducir daño a las membranas plasmáticas por peroxidación lipídica, lo que conduce a cambios en la fluidez, aumento de la permeabilidad y disminución del potencial de membrana. Las ERO pueden inducir también daño al ADN, y si el estrés oxidante persiste conducirá a daño eventual en los tejidos.

Se ha investigado el uso de agentes antihipertensivos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina I y de antagonistas de los receptores de angiotensina II, los cuales han demostrado ser capaces de disminuir el estrés oxidante (Johnson et al., 2002). El losartán, un antagonista de los receptores de angiotensina II, atenuó la disfunción mitocondrial en un modelo de hipertensión espontánea en ratas (SHR), lo que mejoró el estado redox de la mitocondria, disminuyó los niveles de ERO y mantuvo el potencial de membrana mitocondrial, lo que fue asociado con la prevención del daño funcional y estructural causado por la hipertensión en el riñón (Cavanagh et al., 2006).

1.6 Papel del calcio en la mitocondria.

El Ca^{+2} en la mitocondria regula funciones intrínsecas como la producción de ATP, la regulación de la actividad de la F_1F_0 ATP sintasa y tres deshidrogenasas del ciclo de Krebs (McCormack et al., 1990; Hansford., 1994). Sin embargo, un incremento en la concentración de Ca^{+2} en la mitocondria junto con la acumulación de ERO favorecen la liberación al citosol del citocromo *c* o el factor inductor de apoptosis (AIF), llevando a las células a la muerte celular apoptótica además de que la fragmentación y el hinchamiento del orgánulo disparan la apertura del PTP. Esto supone el colapso del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y la muerte celular (Rizzuto et al., 2012; Patron et al., 2013).

1.7 Terapia antioxidante.

Los antioxidantes son compuestos que pueden neutralizar a las ERO y por lo tanto, pueden reducir el daño oxidante. Se ha demostrado una disminución del estrés oxidante a través de la suplementación de vitaminas C y E que se relacionó

con una reducción de la presión arterial en pacientes con hipertensión esencial. (Rodrigo et al.,2008).

Algunas investigaciones han demostrado el efecto benéfico de la disminución del estrés oxidante en a través del tratamiento con antioxidantes dirigidos hacia la mitocondria que consisten en la unión de una molécula antioxidante como la ubiquinona (MitoQ) o el Tempol (MitoTempo) con un catión trifenilfosfonio (TPP⁺) que permite su acumulación en la matriz mitocondrial de una manera dependiente del potencial de membrana mitocondrial (Pokrzywinski et al., 2016). Por ejemplo, el MitoTempo disminuyó la presión arterial en un modelo de hipertensión arterial mediante infusión con angiotensina II al aumentar la biodisponibilidad del NO (Doughan et al., 2008; Dikalova et al., 2010). Además, el daño renal hipertensivo ha sido disminuido en ratas SHR por el tratamiento con MitoQ (McLachlan et al., 2014).

Además de lo anterior, existen estudios que confirman que la contribución de los antioxidantes presentes en los alimentos juega un papel muy importante en la defensa frente al estrés oxidante implicado en distintos procesos fisiológicos y fisiopatológicos donde el estrés oxidante está incrementado (Baradaran et al., 2014). En este sentido, en nuestro grupo de trabajo se realizó un estudio respecto del efecto que tiene el aceite de aguacate sobre la disfunción mitocondrial en el riñón durante la diabetes, en donde se observó que, en las mitocondrias de riñones de ratas diabéticas, la actividad del complejo III se encontraba disminuida, lo que aumentó la producción de ERO debido a una disminución de las concentraciones del grupo hemo c₁ de este complejo. El aceite de aguacate previno estos efectos, lo que se atribuyó a la amplia variedad de antioxidantes presentes en el aceite (Ortíz-Avila et al., 2013).

1.8 El aceite de aguacate.

El aguacate es el fruto del árbol *Persea americana*, que pertenece a la familia Lauraceae. Es oval o piriforme, según la variedad y de tamaño muy variado con cáscara de color verde a púrpura oscuro. De pulpa firme y oleica de un color que varía desde el amarillo al verde claro. En el aguacate se pueden encontrar

compuestos como carotenoides, tocoferoles y fitosteroles (Tabla 1). Del fruto del aguacate se puede obtener el aceite que mantiene como componente mayoritario al ácido oleico, así como otros ácidos grasos (Tabla 2).

Carotenoides	Tocoferoles	Esteroles
β -Caroteno	α -Tocoferol	β -Sitosterol $\Delta 7$ -sitosterol
α -Caroteno	β -Tocoferol	Campesterol
β - Criptoxantina	γ -Tocoferol	Campestanol
Luteína	δ -Tocoferol	Stigmasterol
Zeaxantina		Lanosterol
Anteraxantina		Sitostanol
Neoxantina		$\Delta 5$ y 7 Avenasterol
Zeaxantina		α -Amirina
Violaxantina		Lupeol + gramisterol
		Cicloartenol
		Cicloeucalemol
		24-metilencicloartanol
		Citrostadienol

Tabla 1. Compuestos presentes en el aguacate. Tomada y modificada de Ashton et al., 2006 y Berasategi et al., 2012.

Ácidos grasos	Aceite de aguacate
Palmítico C16:0	5.92%
Palmitoléico C16:1	0.2%
Esteárico C18:0	1.86%
Oleico C18:1	55.9%
Linoleico C18:2	24.9%

Tabla 2. Proporción de ácidos grasos presentes en el aceite de aguacate. Tomada y modificada de Ortíz-Avila et al., 2015.

En nuestro grupo de trabajo también se ha demostrado que la suplementación con aceite de aguacate disminuye el estrés oxidante en mitocondrias de riñón de ratas con diabetes tipo 2 al disminuir la hiperglucemia, proteger de la peroxidación lipídica y mejorar el estado redox del GSH (Ortíz-Avila *et al.*, 2017). Además, en un reciente estudio se demostró que el aceite de aguacate disminuye la presión arterial en ratas hipertensas al igual que el fármaco losartán, de la misma manera que mejoran la vasodilatación renal después de la contracción inducida por angiotensina II (Márquez-Ramírez *et al.*, 2018). En este mismo estudio se reportó que el aceite de aguacate mejora la función mitocondrial, al prevenir el abatimiento del $\Delta\Psi$ que se presenta en la hipertensión, además de evitar la sobreproducción de ERO e impidiendo el aumento de los niveles de GSSG que durante la HT se encontraron incrementados, relacionando estos efectos posiblemente al bloqueo de los receptores de Ang II debido a que el aceite de aguacate imito los efectos del losartán.

2. JUSTIFICACIÓN

La hipertensión favorece la aparición de complicaciones como la nefropatía, que se asocia con un incremento en la producción de ERO por la NADPH oxidasa, lo cual afecta a la función mitocondrial y contribuye a la progresión de la enfermedad. En estudios previos, se ha observado que el aceite de aguacate disminuye tanto la presión arterial sistémica, así como la producción mitocondrial de ERO y restituye el potencial de membrana en mitocondrias de riñón de ratas hipertensas. Sin embargo, se desconoce si los efectos del aceite de aguacate en la función mitocondrial renal y el estrés oxidativo son atribuibles a una disminución de la actividad de la NADPH oxidasa y de la producción de especies reactivas del oxígeno tales como el ONOO^- . Además, pese a los efectos benéficos del aceite de aguacate en la función mitocondrial, el estrés oxidativo, la presión arterial y la función vascular renal, no se conoce si el aceite de aguacate confiere protección contra el daño renal hipertensivo.

3. HIPÓTESIS

El aceite de aguacate atenúa el daño renal hipertensivo al disminuir los niveles de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN) inducido por la actividad de la NADPH oxidasa.

4. OBJETIVO GENERAL

Determinar si el consumo de aceite de aguacate atenúa el daño renal al disminuir los niveles de ERO y ERN por la actividad de la NADPH oxidasa en ratas hipertensas.

4.1 Objetivos particulares

- Evaluar el efecto del aceite de aguacate sobre la actividad de la NADPH oxidasa en riñones de ratas hipertensas.
- Determinar el efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de ERN en riñones de ratas hipertensas.
- Determinar el efecto del aceite de aguacate sobre la susceptibilidad al estrés nitrosativo y oxidativo en riñones de ratas hipertensas.
- Analizar el efecto del aceite de aguacate sobre el daño renal causado por la hipertensión.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales y grupos de experimentación.

Se emplearon ratas Wistar macho de entre 250-350 g de peso, las cuales fueron mantenidas en un bioterio bajo condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12h. Para el manejo de los animales se siguieron las recomendaciones de la norma para el uso de animales 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.

Los animales se distribuyeron en 5 grupos con 6 ratas cada uno: grupo control (CTRL) que consistía en ratas alimentadas con alimento para roedores (Laboratory Rodent Diet 5001, LabDiet, St. Louis, MO, USA); un grupo control con aceite de aguacate (AA), al cual se le administró una presentación comercial de aceite de aguacate (Ahuacatlan, DIRICOM S.A. de C.V., México); un grupo hipertenso (HT), que se administró con el inhibidor de las NOS L-NAME (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.); un grupo hipertenso más aceite de aguacate (HT+AA), que consistió en animales administrados con L-NAME y aceite de aguacate y un grupo hipertenso más el inhibidor de los receptores AT₁ Losartan (HT+ Los), al cual se le administró L-NAME y Losartan (Merck Sharp & Dohme, Kenilworth, N.J, EE. UU.). En los grupos HT, HT+ AA y HT+Los, las ratas recibieron 75 mg/kg de L-NAME durante siete días para establecer la hipertensión (Rivera-Jardón et al., 2009). Los siguientes 45 días, recibieron 50 mg/kg de L-NAME como dosis de mantenimiento solo o concomitantemente con el aceite de aguacate a una dosis diaria de 1.0 mL/250 g por vía oral o Losartan en una dosis diaria de 40 mg/kg en agua potable (Cavanagh *et al.*, 2006). La administración de L-NAME se mantuvo para evitar la regresión de la hipertensión. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados por decapitación y se extrajeron los dos riñones para el aislamiento de mitocondrias y obtención de homogenado.

5.2. Aislamiento de mitocondrias.

Las mitocondrias de riñón se aislaron mediante centrifugación diferencial con el método descrito por Saavedra-Molina y Devlin (1997). Para obtener las mitocondrias, los riñones fueron triturados y lavados con medio 1 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM, MOPS 2 mM y EGTA 1 mM, a un pH de 7.4). Los fragmentos fueron homogeneizados y centrifugados a 2000 rpm, el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 7500 rpm y la pastilla resultante fue lavada con medio 2 (manitol 220 mM, sacarosa 70 mM y MOPS 2 mM, a pH 7.4) y centrifugada a 9000 rpm. Finalmente, la pastilla se resuspendió en 500 μ L de medio 2. Todas las centrifugaciones se realizaron durante 10 minutos a 4 °C. La concentración de proteína mitocondrial fue determinada mediante el método de Biuret (Gornall *et al.*, 1949).

5.3 Medición de la actividad de la NADPH oxidasa.

La actividad de la Nox se analizó mediante la evaluación de la reducción del citocromo *c* (Someya *et al.*, 1997). 0.5 mg/mL de homogenado de riñón se resuspendió en un medio con NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM y KH₂PO₄ 1.5 mM (pH 7.4). Se incubó la mezcla de ensayo contenía 1 mM de KCN, 1 μ g de antimicina A, 1 mM de rotenona y 1 mM de TTFA. Después de 5 min se añadió CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 1 mM y se incubó durante 5 min más. Después de la incubación se añadió 60 mM de citocromo *c* y la absorbancia se midió durante 1 minuto a 550 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550. Después de un minuto se agregó NADPH la reacción se midió por 4 min. La reacción se detuvo al agregar DPI el cual es un inhibidor de la NADPH oxidasa. La actividad se calculó restando a la pendiente del trazo en presencia de NADPH la pendiente del trazo en presencia de DPI. Usando el coeficiente de extinción molar del citocromo *c* de 21 mM⁻¹ cm⁻¹.

5.4 Medición de los niveles de NO.

1 mg/mL de homogenado de riñón se desproteinizó en una relación de 1:4 con etanol absoluto durante 1 h. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 20,000 rpm durante 10 min. Las centrifugaciones se llevaron a cabo con el rotor SS-34 de una centrifuga Sorvall. Los niveles de NO se evaluaron mediante el método de Griess de acuerdo con el método de Miranda et al., 2001. Una vez desproteinizadas las muestras se incubaron con HCL 1.5 %, VCL₃ 0.015 M, sulfanilamida 0.3 % y NEDD 0.015 % a 37 °C durante 40 min en la obscuridad. Las muestras se centrifugaron a 20,000 RPM durante 10 min y el sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis a 540 nm. La concentración de NO se calculó utilizando una curva de calibración de nitratos y nitritos.

5.5 Medición de los niveles de ONOO⁻.

La generación de ONOO⁻ se determinó mediante la evaluación de la oxidación de la sonda diacetato 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) en el compuesto fluorescente 2',7'-Diclorofluoresceína (DCF) después de su hidrólisis intramitocondrial en diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF). A 0.5 mg/mL de proteína mitocondrial se añadieron 500 mM de H₂DCFDA en buffer que contenía KCl 100 mM, HEPES 10 mM, KH₂PO₄ 3 mM y MgCl₂ 3 mM (pH 7,4) y se incubó durante 20 min en agitación a 4 °C. Esta mezcla se colocó en una cubeta de cuarzo y la fluorescencia basal se registró en un espectrofluorómetro Shimadzu RF5301PC (λ_{ex} 491 nm; λ_{em} 518 nm). Después de 1 min se agregó un generador de óxido nítrico el S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) 500 mM y 10 mM de glutamato/malato. Los cambios en la fluorescencia de la H₂DCF fueron seguidos por 20 min y expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia.

5.6 Niveles de peroxidación lipídica.

Los niveles de peroxidación lipídica se midieron utilizando el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) (Buege y Aust, 1978). A 0.5 mg/mL de mitocondrias en un volumen de 1 mL de buffer de fosfatos (KH_2PO_4 50 mM, pH 7.6), se le agregaron 2 mL de una solución ácida compuesta por ácido tricloroacético 15 %, ácido tiobarbitúrico 0.375 % y HCl 0.25 N. Posteriormente, las muestras se calentaron a baño maría durante 15 min y después fueron enfriadas en hielo y centrifugadas a 7500 rpm durante 5 min a 4 °C. Finalmente, se extrajeron 2 mL del sobrenadante y se leyeron en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis a 532 nm. Los resultados se expresaron como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)/mg de proteína, las cuales se calcularon con base al coeficiente de extinción molar del malondialdehído de $1.56 \times 10^5 \text{ Mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

5.7 Determinación de la actividad de los complejos I y II de la CTE.

Para evaluar las actividades de los complejos I y II de la CTE, las mitocondrias se solubilizaron antes de cada ensayo para mejorar la accesibilidad de los sustratos e inhibidores a los sitios redox de los complejos, esto se llevó a cabo en medio de solubilización que contenía KCl 100 mM, MgCl_2 10 mM y Tris base. Se adicionó Triton X-100 al 10 % y se agitó en vortex durante 30 segundos, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 12,400 rpm 15 min a 4°C, el pellet se resuspendió en buffer de KH_2PO_4 50 mM (Hallberg *et al.* 1993) La actividad del complejo I fue analizada por una modificación de la técnica reportada por Chomova *et al.* (2012). 0.1 mg/mL de mitocondrias solubilizadas se resuspendieron en 1 mL de buffer de KH_2PO_4 50 mM y se incubaron con 1 μg de antimicina A y 1 mM de KCN. Después de 5 min, se añadió $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 5 mM y la absorbancia se midió durante 1 min a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550. Después se agregó NADH y su oxidación fue medida durante 4 min adicionales. La tasa de oxidación de NADH se calculó usando el coeficiente de extinción molar de $16.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el NADH. La actividad del complejo II se

midió espectrofotométricamente a 600 nm mediante la reducción del 2,6-diclorofenolindofenol (DCIP) con presencia y ausencia de rotenona usando succinato 10 mM como sustrato (Ortiz-Avila *et al.*, 2013).

5.8 Evaluación del estrés oxidativo.

Este parámetro se estimó midiendo la relación de glutatión reducción (GSH) a glutatión oxidado (GSSG). Primero, para medir la concentración de glutatión total (GSH + GSSG), 0.1 mg/mL de homogenado fue desproteinizado mediante la adición de ácido sulfosalicílico al 5 % y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 min. El pellet fue descartado y se añadieron 90 µL del sobrenadante a una reacción que contenía buffer de fosfatos 0.1 M, 3 mM de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), 0.1 M de EDTA y 0,125 U/mL de glutatión reductasa. Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente, se añadió NADPH 2 mM y la reducción de DTNB se siguió espectrofotométricamente a 412 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550, siendo la tasa de reducción de DTNB directamente proporcional a la concentración de GSH (Akerboom y Sies 1981). Los niveles de GSSG fueron determinados por el procedimiento descrito anteriormente, excepto que el GSH se derivatizó con 3 % de 4-vinilpiridina durante 60 min. Finalmente, la cantidad de glutatión reducido se obtuvo restando la concentración de GSH + GSSG menos la concentración de GSSG.

5.9 Captación de calcio por la mitocondria.

Para evaluar la captación de calcio por la mitocondria, 0.5 mg/mL de mitocondrias se incubaron 5 min con 1 mM de rotenona, 0.5 mM de arsenazo y 1 mM de succinato en medio que contenía 40 mM de HEPES, 195 mM de manitol y 25 mM de sacarosa. Después de la incubación se agregó 0.00176 mM de CaCl₂ cada minuto durante 9 min y los cambios en la absorbancia se midieron a longitudes de onda de 675-685 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV2550.

5.10 Evaluación histológica del riñón.

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, secciones de riñón se fijaron en paraformaldehído al 10 %, se incrustaron en bloques de parafina y fueron seccionados a 3 μm mediante el uso de un micrótomo, los cuales fueron teñidos con la tinción de hematoxilina-eosina en portaobjetos de vidrio para evaluar posteriormente el nivel de daño renal mediante la identificación de parámetros que indicaron daño renal como engrosamiento de la lámina basal, acumulación de fibrina y colágeno, inflamación y necrosis .

5.11 Análisis estadístico.

Los datos se expresaron como la media \pm error estándar de al menos 6 experimentos independientes. La significancia estadística de las diferencias entre las medias ($P < 0.05$) se determinó mediante la prueba ANOVA y la prueba post-hoc de Tukey.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad de la NAPH oxidasa.

Al evaluar la actividad de la NAPH oxidasa en el homogenado de riñón, se observó que las ratas hipertensas presentaron una mayor actividad de esta enzima en un 30 % comparadas con las ratas controles, sin embargo, las ratas tratadas con el aceite de aguacate mantuvieron dicha actividad elevada, a diferencia de las ratas tratadas con Losartán, que mantuvieron los niveles de actividad a valores similares a las ratas controles.

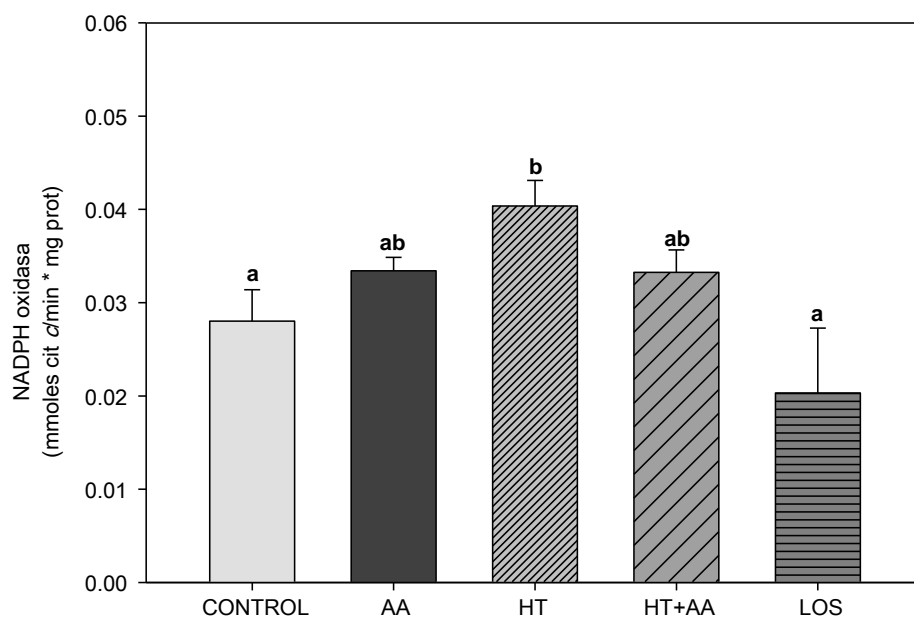


FIGURA 5.- Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad de la NADPH oxidasa. Los datos se presentan como la media \pm E.E. $n > 5$. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

6.2. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de ERN.

Se midieron los niveles de NO en el homogenado de riñón mediante el método de Griess modificado, en donde se puede observar en la figura 6, que los niveles de NO se mantuvieron similares en todos los grupos experimentales. Con respecto a los niveles mitocondriales de ONOO \cdot (Figura 7), se observó un incremento de un 42 % en las ratas hipertensas, a diferencia de las ratas hipertensas tratadas con el aceite de aguacate en donde se contrarrestó el aumento en los niveles de ONOO \cdot , manteniéndolos a valores cercanos a los de las ratas controles. Además, este mismo efecto se pudo observar en las ratas hipertensas tratadas con losartán.

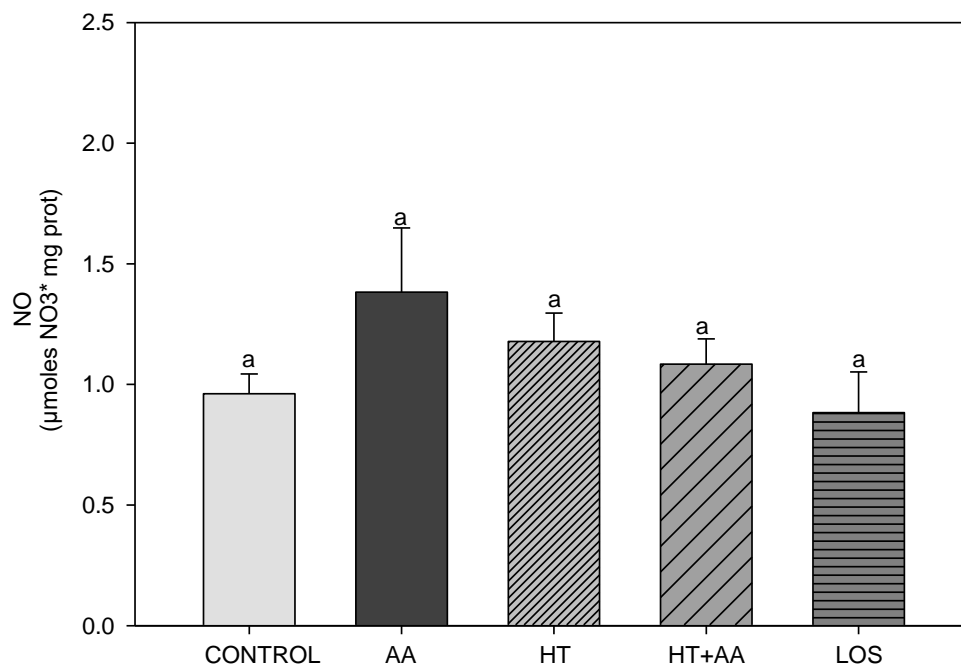


Figura 6. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de NO. Los datos se presentan como la media \pm E.E. $n > 5$. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

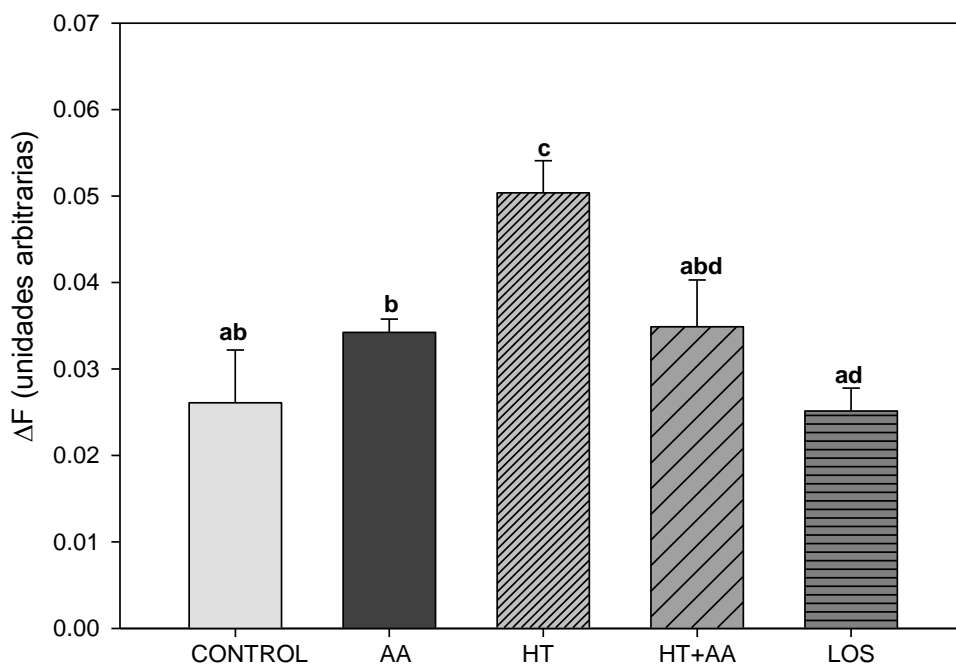


Figura 7. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de ONOO· en mitocondrias de riñón. Los cambios en la fluorescencia de la H₂DCF (ΔF) en respuesta a glutamato-malato y en presencia de SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) fueron cuantificados durante 20 min y expresados como unidades arbitrarias. Los datos se presentan como la media \pm E.E. $n > 5$. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

6.3. Efecto del aceite de aguacate sobre la susceptibilidad al estrés oxidativo.

Se evaluaron los niveles de glutatión como marcador de estrés oxidativo en homogenado de riñón, en la figura 8 panel A, se puede observar que el contenido de glutatión reducido (GSH) en las ratas hipertensas se mantiene a valores similares a las ratas controles, sin embargo, los niveles de GSSH se encontraron incrementados en los grupos tratados con el aceite de aguacate, lo cual se ve reflejado como un aumento en los niveles de glutatión total (Figura 9 panel A). Mientras que los niveles de GSSG se mantuvieron similares en los diferentes grupos (Figura 8 panel B).

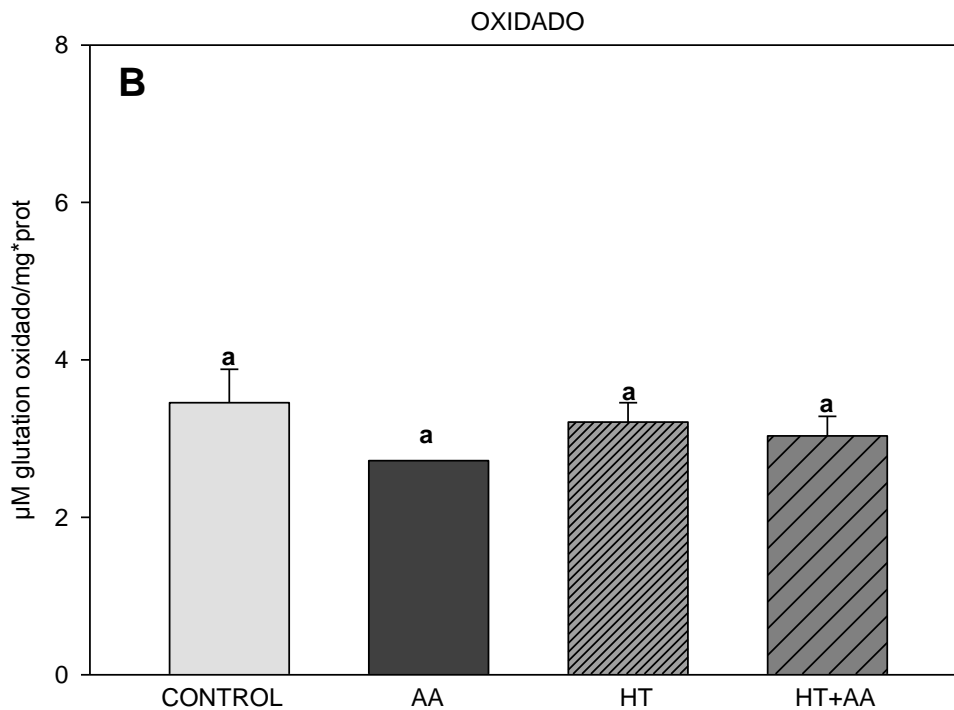
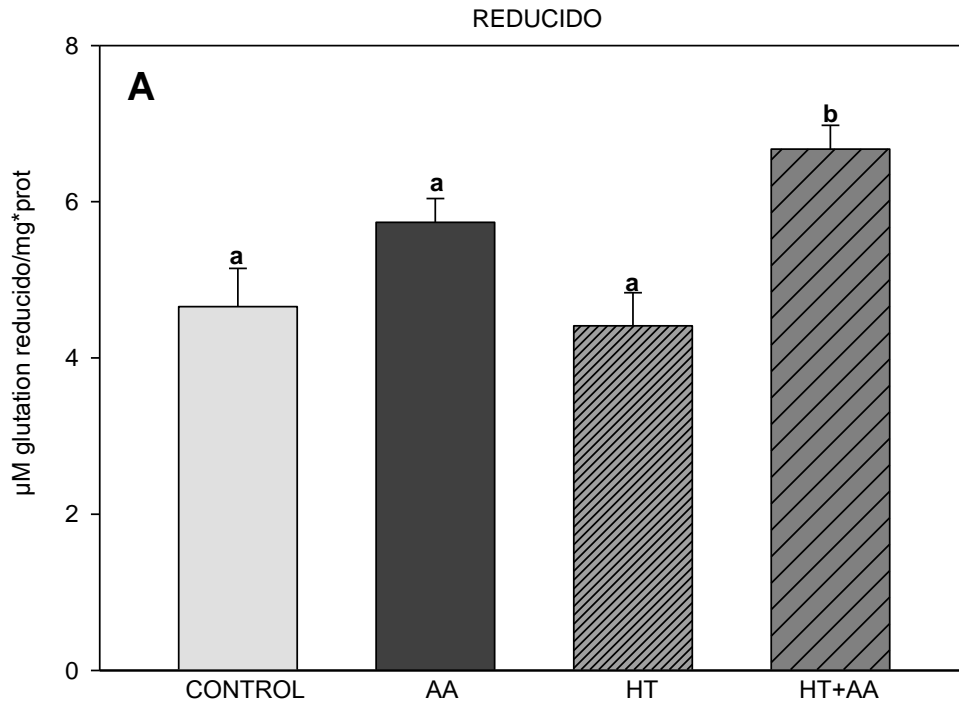


Figura 8. Efecto del aceite de aguacate en los niveles de glutatión oxidado y reducido en homogenado de riñón. Los datos se presentan como la media \pm E.E. $n > 3$. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

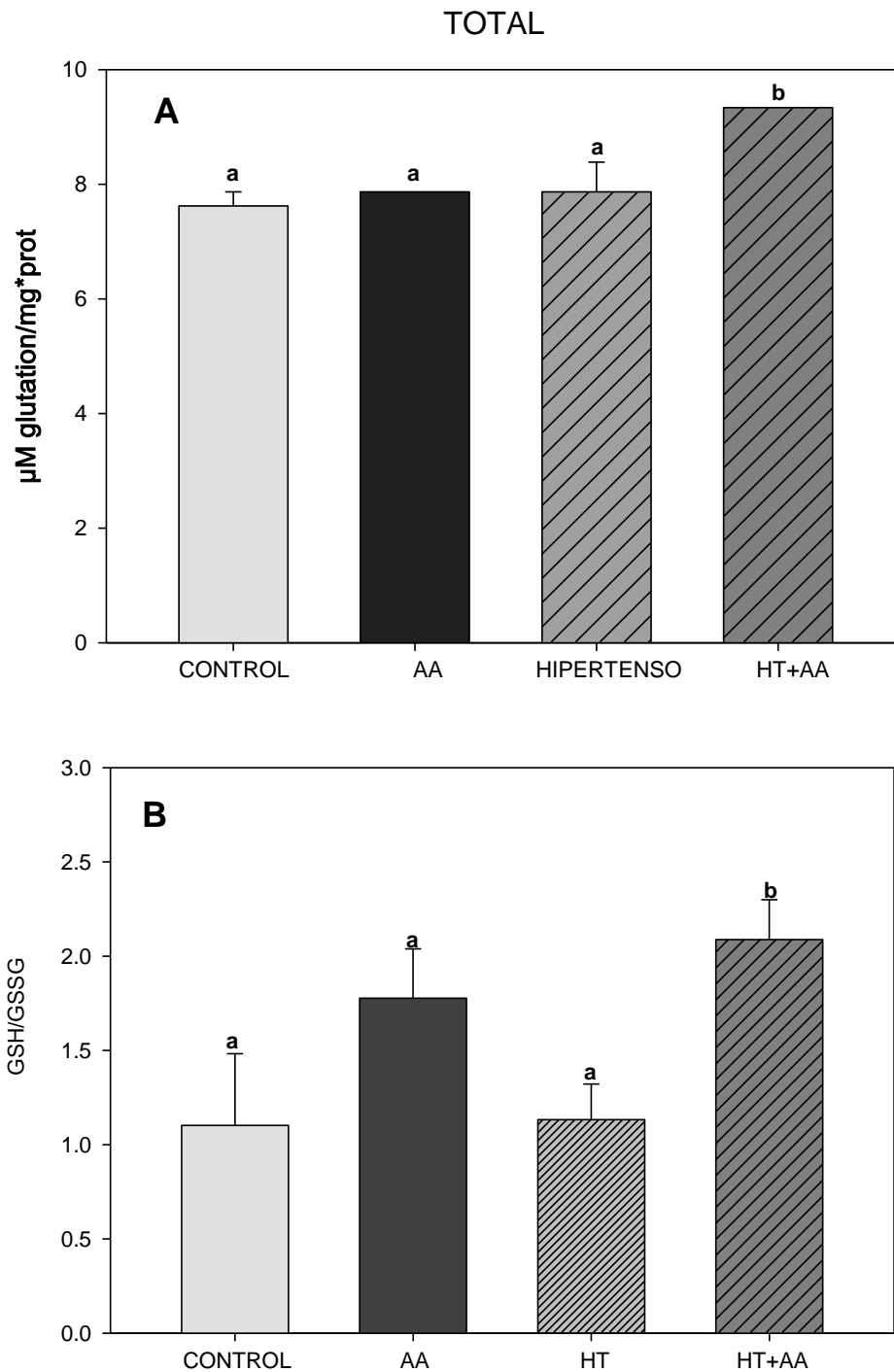


Figura 9. Efecto del aceite de aguacate en los niveles de glutatión total y la relación GSH/GSSG en homogenado. Los datos se presentan como la media \pm E.E. $n>3$. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P<0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

6.4. Efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de peroxidación lipídica.

Los niveles de peroxidación lipídica se evaluaron como un marcador de daño por el estrés oxidante, en donde no se observaron diferencias significativas en los diferentes grupos como se muestra en la figura 10, no obstante se puede observar en comparación con las ratas controles, una tendencia en las ratas hipertensas en mantener niveles inferiores de TBARS, además de que ésta tendencia se vio reflejada en las ratas hipertensas tratadas con el aceite de aguacate y las tratadas con Losartán.

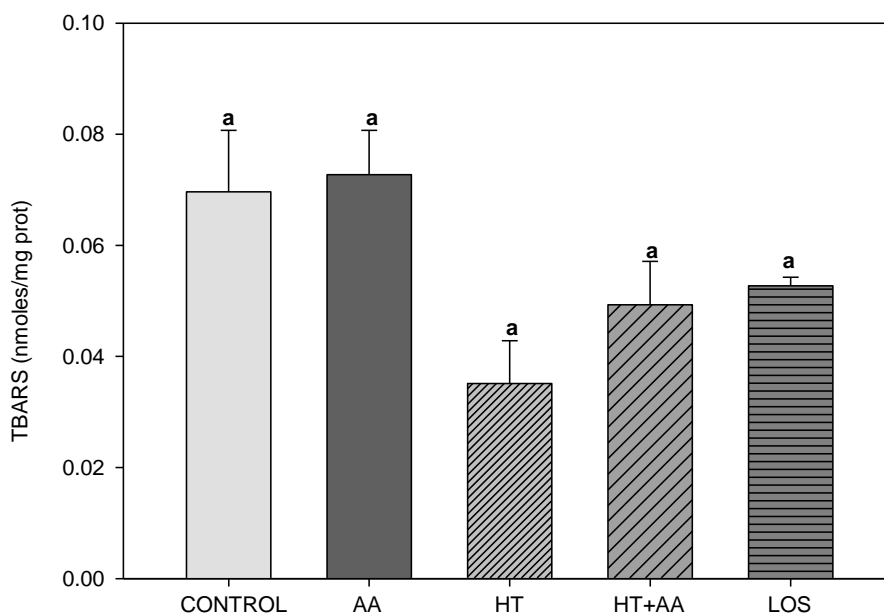


Figura 10. Efecto del aceite de aguacate en los niveles de peroxidación lipídica. Los datos se presentan como la media \pm E.E. $n > 3$. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

6.5. Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad de los complejos I y II de la CTE.

En relación a la actividad de los complejos I y II de la CTE en las mitocondrias de riñón, se observó un incremento en la actividad del complejo I en las ratas hipertensas respecto a las ratas controles de hasta dos veces más (Figura 11), mientras que el aceite de aguacate mantuvo la actividad de este complejo a valores similares al grupo control, este efecto se pudo observar de igual forma en las ratas tratadas con el fármaco Losartán. Para la actividad del complejo II no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los diferentes grupos experimentales cuando se evaluó la actividad de este complejo con la presencia o ausencia de rotenona como se muestra en la figura 12.

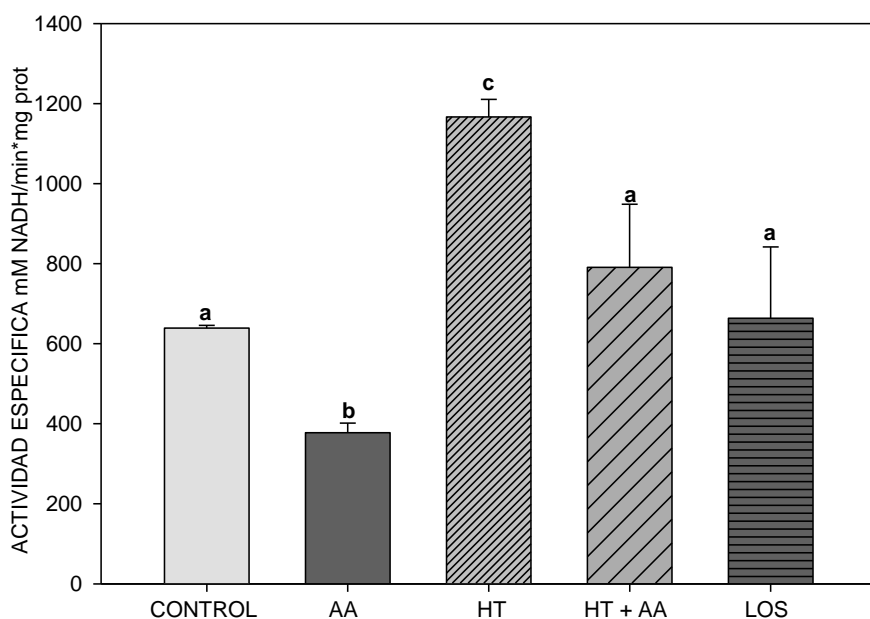


Figura 11. Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad de del complejo I de la CTE. Los datos se presentan como la media \pm E.E. $n > 5$. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

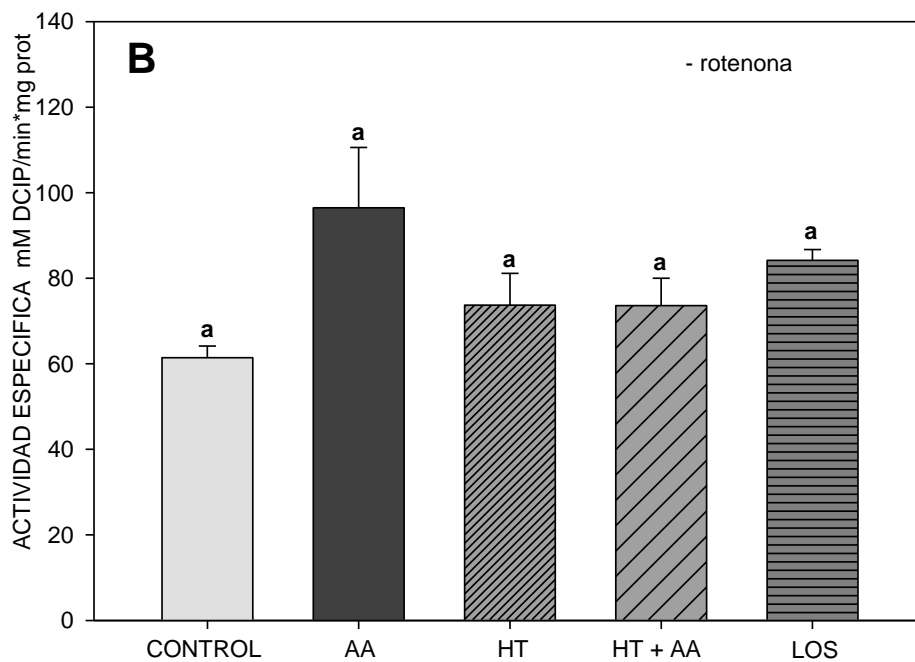
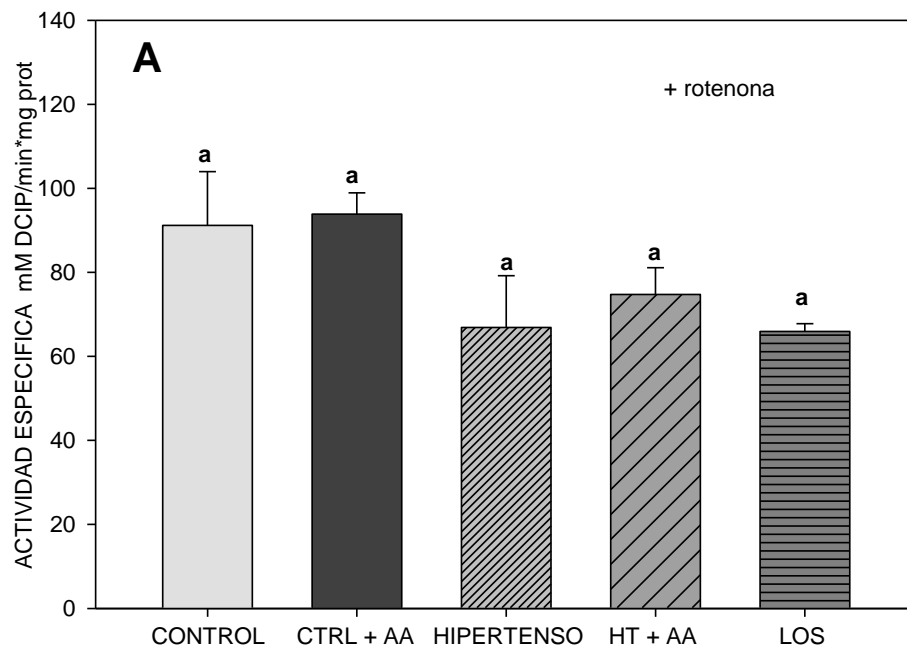


Figura 12. Efecto del aceite de aguacate sobre la actividad del complejo II de la CTE, en el panel A se muestra la actividad en presencia de rotenona y en el panel B en ausencia de rotenona. Los datos se presentan como la media \pm E.E. $n > 5$. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($P < 0.05$) (ANOVA de 1 vía con prueba post-hoc de Tukey).

6.6 Efecto del aceite de aguacate sobre la captación de calcio por la mitocondria.

En la siguiente figura se muestran los trazos representativos de los diferentes tratamientos en donde se evaluó la captación de calcio por la mitocondria. Se destaca en color negro, que las ratas controles mostraron una entrada de calcio basal por la mitocondria, mientras que en las ratas hipertensas (línea roja) se pudo observar una mayor captación de calcio, observándose esto como un cambio en la absorbancia tras las adiciones de calcio. Sin embargo, la captación de calcio por la mitocondria en las ratas hipertensas tratadas con el aceite de aguacate (línea verde) difirió de las ratas hipertensas que no recibieron el aceite, mostrando un comportamiento similar al de las ratas controles. En el caso de las ratas hipertensas que recibieron el tratamiento con losartán respondieron de manera similar a las ratas controles tras las adiciones consecutivas de calcio.

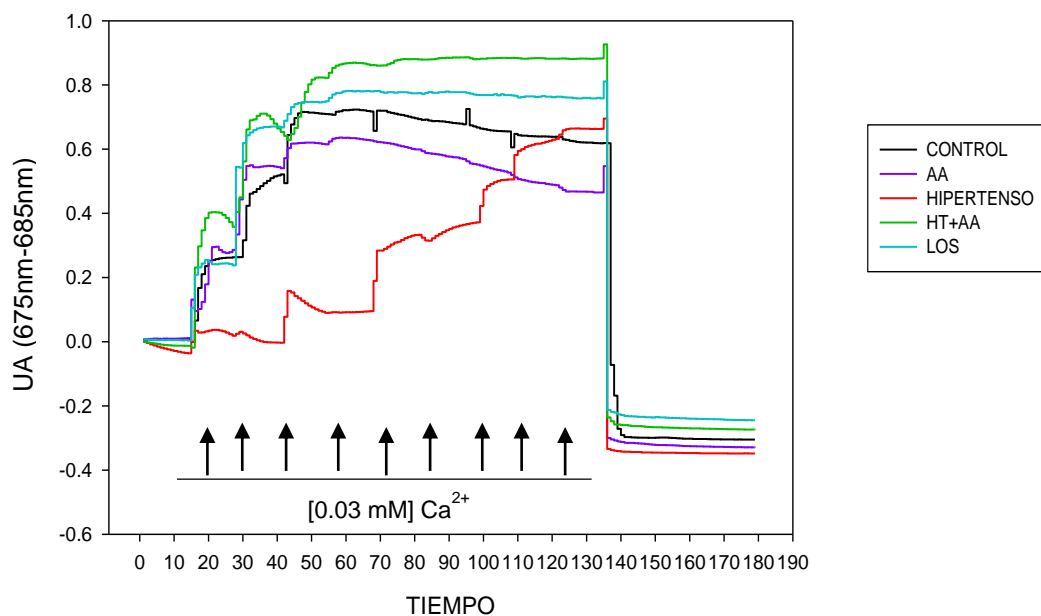


Figura 13. Efecto del aceite de aguacate sobre la captación de calcio por la mitocondria. En la figura se muestran trazos representativos de los diferentes tratamientos mostrados con diferentes colores para cada uno de los grupos.

6.7 Efecto del aceite de aguacate sobre los cambios histopatológicos en el riñón.

Al evaluar los cambios histopatológicos, las ratas controles presentaron glomérulos normocelulares (cuadro) y sistema tubular conservado (túbulo contorneado proximal (flecha), el asa de Henle, el túbulo contorneado distal (flecha verde) y los túbulos colectores), membrana basal glomerular normal. Por otra parte, las histologías de las ratas hipertensas presentaron un menor número de glomérulos, además de que estos presentaron esclerosis, túbulos renales dilatados, se observó un engrosamiento de la lámina basal glomerular y necrosis e inflamación. En contraste con las ratas tratadas con el aceite de aguacate que mostrando alteraciones histopatológicas poco evidentes al igual que el fármaco losartán (Figura 14).

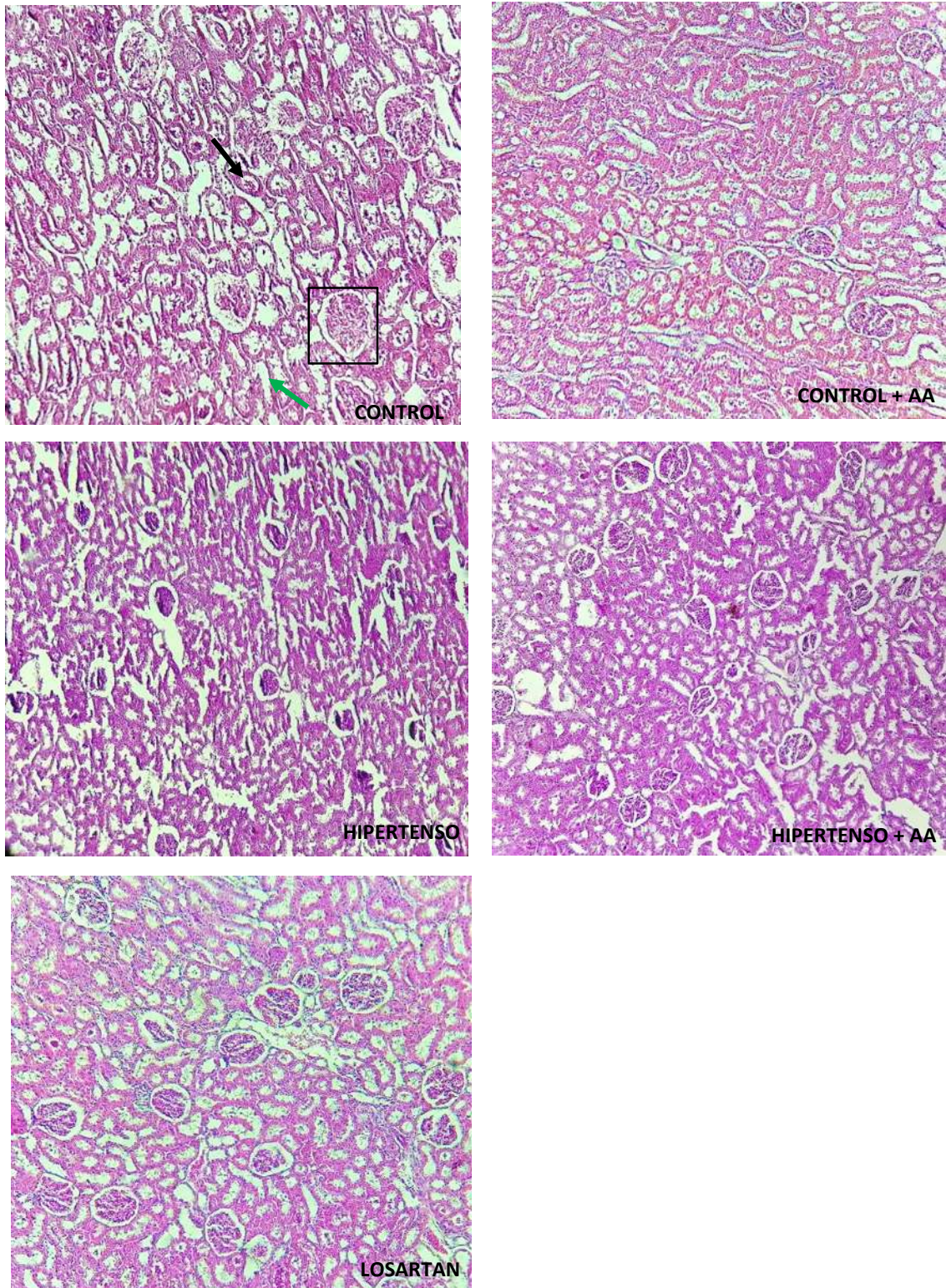


Figura 14. Efecto del aceite de aguacate sobre los cambios histopatológicos en riñón. Fotografías representativas de cada uno de los grupos. Aumento 10x.

7. DISCUSION

México registra la prevalencia más alta de hipertensión arterial en todo el mundo y es el factor de riesgo principal para el desarrollo de insuficiencia renal y enfermedad cardiovascular (ENSANUT, 2012), además de que las complicaciones derivadas de la hipertensión son la causa de 9,4 millones de defunciones cada año en el mundo (OMS, 2108). Es por esto que el tratamiento de la hipertensión y la prevención de la aparición de las complicaciones asociadas a esta enfermedad se tornan de suma importancia en el mejoramiento de la calidad de vida de las personas que padecen esta enfermedad.

En este estudio se analizó el efecto del aceite de aguacate sobre la actividad de la NADPH oxidasa en riñones de ratas hipertensas. Los resultados muestran que durante la hipertensión la actividad de la NADPH oxidasa se encuentra incrementada (Fig. 5), lo cual es consistente con otro estudio donde se encontró que la producción de $O_2^{\cdot-}$ por la NADPH oxidasa debido a su activación por la angiotensina II, está implicada en la patogénesis de la disfunción endotelial y la hipertensión (Nazarewicz *et al.*, 2013). El tratamiento con aceite de aguacate no disminuyó la actividad de esta enzima en las ratas hipertensas, lo cual podría atribuirse a que no se conoce que el aceite contenga algún compuesto estructuralmente análogo a la angiotensina II que pudiera antagonizar a los receptores de Ang II, a diferencia del Losartán que actúa mediante este mecanismo y que sí disminuyó la actividad de esta enzima a niveles del grupo Control. Uno de los mecanismos de regulación de la actividad de la NADPH oxidasa es la fosforilación de la subunidad $p47^{phox}$, la cual es mediada por la actividad de PKC (Arango *et al.*, 2010). A este respecto, se ha demostrado que el ácido oleico (C18:1), el principal ácido graso presente en el aceite de aguacate se incorpora en la membrana lipídica, modifica la estructura de los lípidos de la membrana plasmática y modula la señalización mediada por proteínas G (Terés *et al.*, 2008). Lo anterior puede favorecer el acoplamiento de ciertas proteínas de señalización como PKC (Martínez *et al.*, 2005) Por lo tanto, una posible explicación por la cual el aceite de aguacate no tuvo ningún efecto sobre la actividad de NADPH oxidasa es que la

dosis de aceite de aguacate que se utilizó en esta investigación no es suficiente para que se incorpore una cantidad suficiente de C18:1 a las membranas para observar un cambio en la actividad de la NADPH oxidasa mediante la regulación de PKC, por lo cual habría que determinar el contenido de C18:1 en las membranas plasmáticas y la activación de PKC para corroborar esta hipótesis.

Con la finalidad de evaluar el efecto del aceite de aguacate sobre los niveles de ERN se evaluaron los niveles de NO, en donde no se observaron diferencias entre los grupos experimentales. Las ratas del grupo HT presentaron valores de NO similares a los de las ratas del grupo Control, lo cual contradice los efectos del L-NAME aplicado en las ratas del grupo HT dado que este compuesto es un inhibidor de las NOS. El NO y sus derivados se descomponen en iones nitrato y nitrito. Con la técnica utilizada para medir los niveles de NO, se reducen los nitratos a nitritos con VCl_3 , y estos son detectados por el reactivo de Griess (Miranda et al., 2001). Esta es una limitación de este método porque no permite distinguir la fracción de nitratos proveniente del NO de la proveniente del anión $ONOO^-$. Esto podría explicar por qué no se observan diferencias entre los diferentes grupos, por lo que se requiere de una técnica más directa para la medición del NO tal como la resonancia paramagnética electrónica para corroborar lo anterior. En un estudio previo (Ramírez-Márquez et al. 2018), si se observó por la técnica de Griess la reducción de los niveles de NO en plasma de ratas hipertensas tratadas con L-NAME. Por lo tanto, otra posible explicación de las diferencias nulas en los niveles de NO entre los grupos es que la dosis utilizada de L-NAME es suficiente para inhibir la producción de NO a nivel endotelial pero no la producción intracelular de NO.

Durante la hipertensión, la producción excesiva de $ONOO^-$ produce daño a nivel mitocondrial, con lo cual se estimula el flujo reverso de electrones del complejo II al complejo I y la sobreproducción de ERO en el complejo I que perpetúa la activación de la Nox, la disminución del NO y la presión arterial alta persistente (Doughan et al., 2008; Dikalov et al. 2014). En concordancia con lo anterior, se observó en los riñones del grupo HT mayor formación de $ONOO^-$ inducido por la producción de ERO en la mitocondria con glutamato malato como sustrato del

complejo I y la presencia de un donador de NO (Fig. 7), mientras que este efecto fue prevenido por el aceite de aguacate a niveles del grupo Control. El aceite de aguacate contiene antioxidantes que pueden neutralizar al anión ONOO^- tales como los β -carotenos, la luteína y la zeaxantina (Ashton et al., 2006; Kikugawa et al., 1997; Rodrigues et al., 2012). Por otro lado, el aceite de aguacate disminuye la producción de ERO en el complejo I de mitocondrias de riñones de ratas hipertensas (Márquez-Ramírez et al., 2018). Por lo tanto, es factible proponer que la disminución de los niveles de ONOO^- por el aceite de aguacate es debida a la acción directa de los antioxidantes del aceite sobre el ONOO^- y por una disminución en la producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ en la mitocondria, lo cual limita su reacción con el NO y por ende, la producción de ONOO^- .

El aceite de aguacate aumentó el contenido de GSH citosólico en los riñones de las ratas del grupo HT+AA (Fig. 8a), lo que disminuyó el estrés oxidante como lo reflejó el aumento en el cociente GSH/GSSH (Fig. 9b) y podría ser el resultado en parte de una mayor síntesis de glutatión en virtud del mayor nivel de glutatión total observado en este grupo (Fig. 9a). Esto podría contribuir a la disminución de los niveles de ONOO^- en el grupo HT+AA. El incremento en la concentración total de GSH por el aceite de aguacate podría ser atribuido a su contenido de β -sitosterol, ya que se ha reportado que este fitosterol incrementa los niveles intracelulares de GSH a través de inducir la expresión de enzimas antioxidantes tales como la SOD, catalasa, y la Gpx mediante la activación de la vía de señalización de estrógenos/ β -PI3K/AKT (Vivancos y Moreno 2005). Además, el aceite de aguacate al prevenir la formación de las ERO Y ERN podría impedir también el agotamiento de las reservas GSH, mejorando el estado redox de la célula.

En relación a los niveles de peroxidación lipídica que se evaluaron como un marcador de daño en las membranas mitocondriales, se observó una tendencia a la disminución de sus niveles en los grupos con hipertensión (grupos HT, HT+AA y Los, Fig. 10). A pesar de que se ha reportado que durante la hipertensión existe una actividad y contenido reducido de enzimas antioxidantes, como la SOD, GPx y catalasa (Lassegue et al., 2004) algunos estudios también han descrito un aumento

adaptativo de las actividades de las enzimas antioxidantes en algunos modelos experimentales de hipertensión (Sousa et al., 2008; Farmand et al., 2005; Sainz et al., 2005). Este comportamiento podría deberse a una respuesta adaptativa al estrés oxidante, en la cual las células preservan su supervivencia a través de la activación de vías de señalización que aumentan la expresión de proteínas antioxidantes (Ayala et al., 2014). Esto podría explicar la disminución de los niveles de peroxidación de lípidos en las mitocondrias de ratas hipertensas, aunado a que se ha reportado un aumento de la actividad de la SOD, catalasa y GPx en riñón en un modelo de HT inducida por L-NAME (Sainz et al., 2005; Sousa et al., 2012). En concordancia con los resultados de este estudio, se ha reportado que los niveles de peroxidación lipídica se mantienen sin cambios en plasma y en la medula renal, debido probablemente al aumento de las enzimas antioxidantes, mientras que en la corteza renal se reportó en este mismo estudio un aumento significativo de grupos SH. La alteración de la síntesis de tioles puede contribuir al desarrollo de alteraciones patológicas en la estructura y función renal (Wójcicka et al., 2005).

La actividad del complejo I de la CTE incrementó drásticamente en el grupo HT (Figura 11). Como se mencionó anteriormente, se ha descrito que el estrés oxidativo y nitrosativo durante la hipertensión induce daño en la mitocondria al favorecer el flujo reverso de electrones hacia el complejo I y estimular la producción de ERO (Dikalov et al. 2014). Por lo tanto, el incremento en la actividad del complejo I podría contribuir a una mayor producción de ERO si el flujo reverso ocurre en nuestro modelo de hipertensión, lo cual ha sido corroborado en un estudio previo donde se observó aumento de la formación de ERO en mitocondrias de riñón hipertensas con un sustrato del complejo I (Márquez-Ramírez et al. 2018). La inhibición del complejo I por MPP⁺ (1-metil-4-fenilpiridinio), disminuye las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ y de ERO en células del músculo liso de la arteria pulmonar, por lo que las ERO producidas en el complejo I fueron asociadas al desarrollo de vasoconstricción pulmonar hipóxica y de hipertensión pulmonar (Yang et al., 2016). El compuesto R188, otro inhibidor del complejo I, redujo la hipertrofia ventricular izquierda al (HVI) mejorar el metabolismo energético del corazón, así como la función diastólica, sin comprometer la función sistólica. Estos

efectos demuestran el papel preponderante de la disfunción de la actividad del complejo I en el desarrollo de la HVI, incluso en la presencia de hipertensión persistente (Matsumura *et al.*, 2017). Todo lo anterior apoya la noción de que la actividad anormal del complejo I está involucrado en las alteraciones del metabolismo energético en la hipertensión y, en consecuencia, en el establecimiento del estrés oxidante en dicha enfermedad. Es importante mencionar que el aceite de aguacate normalizó la actividad del complejo I en el grupo HT+AA a valores similares a los del grupo Control (Fig. 11), por lo que se puede deducir que este efecto contribuye a un menor flujo reverso de electrones al complejo I y a una menor producción de ERO durante la hipertensión, tal como se ha demostrado anteriormente en riñones de ratas hipertensas (Márquez-Ramírez *et al.* 2018). Por otra parte, no se observaron diferencias en la actividad del complejo II en los diferentes grupos experimentales, lo que sugiere que la mayor producción de ERO en la mitocondria durante la hipertensión es a través del complejo I y no del II. Estos datos son consistentes con lo anteriormente descrito en otras enfermedades como la diabetes en donde se reportó que la generación excesiva de ERO en mitocondrias de hígado procede en el complejo I (Ortiz-Avila *et al.*, 2015).

Como se mencionó anteriormente, la captación de Ca^{2+} mitocondrial juega un papel importante en la transducción de señales fisiológicas y patológicas de la célula. Al evaluar la captación de Ca^{2+} por la mitocondria se observó que durante la hipertensión existe una mayor entrada de este catión (Fig. 13), lo que puede implicar la afectación a procesos dependientes de Ca^{2+} tales como el plegamiento de proteínas, la respiración y la producción de ATP (De Marchi *et al.*, 2014). Además, una sobrecarga de Ca^{2+} puede inducir un aumento en los niveles de ERO, la despolarización mitocondrial, el hinchamiento de la matriz y la permeabilización de la membrana externa que finalmente conduce a la liberación del citocromo c y otras proteínas pro-apoptóticas que desencadenan eventos como el inicio de la apoptosis (Webster., 2012). Por lo tanto, la normalización en el transporte de calcio por el tratamiento con el aceite de aguacate podría prevenir dichas alteraciones y disminuir la muerte celular en el riñón, lo cual concuerda con la disminución del daño histológico observado en el grupo HT+AA (Fig. 14). Es importante señalar que el

cerebro también sufre también alteraciones en el transporte mitocondrial de Ca^{2+} durante la hipertensión (Calderón – Cortés et al. 2007).

En relación con los cambios histopatológicos se pudo observar alteraciones asociadas con el desarrollo de nefropatía en las ratas hipertensas. Se ha reportado que en todos los casos de insuficiencia renal el estrés oxidativo desempeña un papel importante en el daño renal. El estrés oxidativo afecta la reactividad vascular y la hemodinámica renal, la filtración, así como la reabsorción y secreción tubular en todos los segmentos de la nefrona (Ratliff et al., 2016) Además, las ERO alteran vías de señalización que conducen a la apoptosis, la necrosis, la expresión génica alterada, la progresión del daño tisular promoviendo la fibrosis y la función renal anormal (Araujo et al., 2014). El tratamiento con el aceite de aguacate previno el desarrollo de la nefropatía hipertensiva. Dentro de la nefrona, el túbulo proximal es un sitio importante de generación de ERO debido a su inmensa producción de ATP (Terry et al., 2011) Se ha demostrado que, a diferencia de otros segmentos de la nefrona, los túbulos proximales no pueden sintetizar GSH, sino que dependen de glutatión circulante para la protección antioxidante contra las ERO generadas por la mitocondria. Un aumento de los niveles de GSH por el aceite de aguacate podría explicar, en parte, el efecto protector contra el daño renal. Este efecto protector se puede atribuir además a los antioxidantes del aceite de aguacate, lo que mejora el funcionamiento mitocondrial y la capacidad antioxidante del riñón, disminuyendo así el estrés oxidativo el cual, como se mencionó, tiene un papel clave en el desarrollo de esta enfermedad (de Cavanagh et al., 2006).

8. CONCLUSIÓN

El aceite de aguacate previene el daño renal hipertensivo, disminuye la producción de ERN y mejora el estado redox del glutatión en el citosol, asociado a una mejora en las alteraciones inducidas por la hipertensión en la captación mitocondrial de Ca^{2+} y la actividad del complejo I de la CTE.

9. REFERENCIAS

Akerboom, T. P., & Sies, H. (1981). [48] Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. In *Methods in enzymology* (Vol. 77, pp. 373-382). Academic Press.

Amanullah, M., Zaman, G. S., Rahman, J., & Rahman, S. S. (2012). Lipid peroxidation and the levels of antioxidant enzymes in hypertension. *Free Radicals and Antioxidants*, 2(2), 12-18.

Arango Rincón, J. C., Gámez Díaz, L. Y., & López Quintero, J. Á. (2010). NADPH oxidase system: new challenges and perspectives. *Iatreia*, 23(4), 362-372.

Araujo, M., & Wilcox, C. S. (2014). Oxidative stress in hypertension: role of the kidney. *Antioxidants & redox signaling*, 20(1), 74-101.

Ashton, O. B., Wong, M., McGhie, T. K., Vather, R., Wang, Y., Requejo-Jackman, C., & Woolf, A. B. (2006). Pigments in avocado tissue and oil. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(26), 10151-10158.

Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014.

Baradaran, A., Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(4), 358.

Baradaran, A., Nasri, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 19(4), 358.

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.

Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9.

Calderón-Cortés, E., Cortés-Rojo, C., Clemente-Guerrero, M., Manzo-Avalos, S., Villalobos-Molina, R., Boldogh, I., & Saavedra-Molina, A. (2008). Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age. *Mitochondrion*, 8(3), 262-272.

Chomova, M., Tatarkova, Z., Dobrota, D., & Racay, P. (2012). Ischemia-induced inhibition of mitochondrial complex I in rat brain: effect of permeabilization method and electron acceptor. *Neurochemical research*, 37(5), 965-976.

Chow, C. K., Ibrahim, W., Wei, Z., & Chan, A. C. (1999). Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(5-6), 580-587.

De Marchi, U., Thevenet, J., Hermant, A., Dioum, E., & Wiederkehr, A. (2014). Calcium co-regulates oxidative metabolism and ATP-synthase dependent respiration in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M113.

de Cavanagh, E. M., 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.

Dikalov, S. I., Nazarewicz, R. R., Bikineyeva, A., Hilenski, L., Lassegue, B., Griending, K. K., ... & Dikalova, A. E. (2014). Nox2-induced production of mitochondrial superoxide in angiotensin II-mediated endothelial oxidative stress and hypertension. *Antioxidants & redox signaling*, 20(2), 281-294.

Dikalova AE, Bikineyeva AT, Budzyn K, Nazarewicz RR, McCann L, Lewis W, Harrison DG, Dikalov SI (2010) Therapeutic targeting of mitochondrial superoxide in hypertension. *Circ Res* 107(1):106–116.

Dorn, G. W. (2015). Mitochondrial dynamism and heart disease: changing shape and shaping change. *EMBO molecular medicine*, 7(7), 865-877.

Doughan, A. K., Harrison, D. G., & Dikalov, S. I. (2008). Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circulation research*, 102(4), 488-496.

Farmand, F., Ehdaie, A., Roberts, C. K., & Sindhu, R. K. (2005). Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environmental Research*, 98(1), 33-39.

Fearheller, D. L., Brown, M. D., Park, J. Y., Brinkley, T. E., Basu, S., Hagberg, J. M., & Fenty-Stewart, N. M. (2009). Exercise training, NADPH oxidase p22phox gene polymorphisms, and hypertension. *Medicine and science in sports and exercise*, 41(7), 1421.

Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology*, 194(1), 7-15.

Finkel, T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology*, 194(1), 7-15.

Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *Journal of biological chemistry*, 177(2), 751-766.

Groemping, Y., & Rittinger, K. (2005). Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochemical Journal*, 386(3), 401-416.

Hallberg, E. M., Shu, Y. O. U. M. I. N., & Hallberg, R. L. (1993). Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins. *Molecular and cellular biology*, 13(5), 3050-3057.

Hansford, R. G. (1994). Physiological role of mitochondrial Ca²⁺ transport. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 26(5), 495-508.7

Hayes, P., Dhillon, S., O'Neill, K., Thoeni, C., Hui, K. Y., Elkadri, A., ... & Griffiths, A. M. (2015). Defects in nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate oxidase genes NOX1 and DUOX2 in very early onset inflammatory bowel disease. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*, 1(5), 489-502.

IMSS. (2018). Instituto Mexicano del Seguro Social. Revisado el 24 de Marzo, 2018 en <http://www.imss.gob.mx/prensa/archivo/201707/203>

Johnson, P. (2002). Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4), 493-505.

Khalil, R. A. (2010, May). Regulation of vascular smooth muscle function. In *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* (Vol. 2, No. 1, pp. 1-62). Morgan & Claypool Life Sciences.

Lahera, V., Cachofeiro, V., & Heras, N. d. (2010). Regulación de la presión arterial. En C. A.-L. Jesús A. Fernández-Tresguerres, *Fisiología humana*, 4e. México, D. F.: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S. A. de C. V.

Lassegue, B., Griendling, K.K. (2004) Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 17: 852-860.

Lifton, R. P., Gharavi, A. G., & Geller, D. S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell*, 104(4), 545-556.

Márquez-Ramírez, C. A., de la Paz, J. L. H., 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.

Martínez-Abundis, E., Sánchez-Rodríguez, M. A., & El Hafidi-Bentlakder, M. (2005). Participación de la mitocondria en el desarrollo de estrés oxidativo en la obesidad. *Bioquímica*, 30(3), 82-89.

Martinez, J., Vögler, O., Casas, J., Barcelo, F., Alemany, R., Prades, J., ... & Saus, C. (2005). Membrane structure modulation, protein kinase C α activation, and anticancer activity of minerval. *Molecular pharmacology*, 67(2), 531-540.

Martins, L. C., Figueiredo, V. N., Quinaglia, T., Boer-Martins, L., Yugar-Toledo, J. C., Martin, J. F. V., & Moreno Jr, H. (2011). Characteristics of resistant hypertension: ageing, body mass index, hyperaldosteronism, cardiac hypertrophy and vascular stiffness. *Journal of human hypertension*, 25(9), 532.

McBride, H. M., Neuspiel, M., & Wasiak, S. (2006). Mitochondria: more than just a powerhouse. *Current biology*, 16(14), R551-R560.

McCormack, J. G., & Denton, R. M. (1990). The role of mitochondrial Ca²⁺ transport and matrix Ca²⁺ in signal transduction in mammalian tissues. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1018(2-3), 287-291.

McLachlan, J., Beattie, E., Murphy, M. P., Koh-Tan, C. H., Olson, E., Beattie, W., & Graham, D. (2014). Combined therapeutic benefit of mitochondria-targeted antioxidant, MitoQ10, and angiotensin receptor blocker, losartan, on cardiovascular function. *Journal of hypertension*, 32(3), 555.

Meissner, G. (1986). Ryanodine activation and inhibition of the Ca²⁺ release channel of sarcoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 261(14), 6300-6306.

Méndez-Durán, A., Méndez-Bueno, J. F., Tapia-Yáñez, T., Montes, A. M., & Aguilar-Sánchez, L. (2010). Epidemiología de la insuficiencia renal crónica en México. *Diálisis y Trasplante*, 31(1), 7-11.

Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*, 5(1), 62-71.

Murdoch, C. E., Alom-Ruiz, S. P., Wang, M., Zhang, M., Walker, S., Yu, B., ... & Shah, A. M. (2011). Role of endothelial Nox2 NADPH oxidase in angiotensin II-induced hypertension and vasomotor dysfunction. *Basic research in cardiology*, 106(4), 527-538.

Nazarewicz, R. R., Dikalova, A. E., Bikineyeva, A., & Dikalov, S. I. (2013). Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(8), H1131-H1140.

Nazarewicz, R. R., Dikalova, A. E., Bikineyeva, A., & Dikalov, S. I. (2013). Nox2 as a potential target of mitochondrial superoxide and its role in endothelial oxidative stress. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 305(8), H1131-H1140.

Olmo, R. S., & Pérez, M. G. (2013). Presión arterial y progresión de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*, 5(1).

OMS. (2018). Organización Mundial de la Salud. Revisado el 14 de Abril, 2018 en <http://www.who.int/topics/hypertension/es/>

Ortiz-Avila, O., del Consuelo Figueroa-García, M., 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.

Patron, M., Raffaello, A., Granatiero, V., Tosatto, A., Merli, G., De Stefani, D., ... & Rizzuto, R. (2013). The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10750-10758.

Pedro-Botet, J., Covas, M. I., Martin, S., & Rubies-Prat, J. (2000). Decreased endogenous antioxidant enzymatic status in essential hypertension. *Journal of human hypertension*, 14(6), 343.

Pérez-Díaz, I., Hiriart, M., Olivares-Reyes, J. A., & Robles-Díaz, G. (2006). Receptores para la angiotensina II diferentes a los clásicos receptores membranales AT1 y AT2: Características y su papel en el funcionamiento celular. *Revista de educación bioquímica*, 25(2), 55-60.

Pérez-Gallardo, R. V., Albarrán-Bravo, S., Manzo-Avalos, S., & Saavedra-Molina (2009). A. Estrés oxidativo y las complicaciones asociadas la diabetes. *Ciencia Nicolaita*, 51:133.

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), e0168283.

Putnam, K., Shoemaker, R., Yiannikouris, F., & Cassis, L. A. (2012). The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *302*(6), H1219-H1230.

Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., & Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, *33*(11), 1451-1464.

Rivera-Jardón, F. F., Castro-Moreno, P., Figueroa-Guillén, E. S., Gallardo-Ortíz, I. A., Godínez-Hernández, D., & Ibarra-Barajas, M. (2009). Angiotensin II augments renal vasoconstriction via AT1 receptors in L-NAME-induced hypertensive rats. In *Proc. West Pharmacol. Soc* (Vol. 52, pp. 47-49).

Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., & Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, *13*(9), 566.

Rodrigo, R., Prat, H., Passalacqua, W., Araya, J., & Bächler, J. P. (2008). Decrease in oxidative stress through supplementation of vitamins C and E is associated with a reduction in blood pressure in patients with essential hypertension. *Clinical Science*, *114*(10), 625-634.

Romero, R., & Bonet, J. (2001). Nefropatía hipertensiva: ¿ la hipertensión arterial esencial es una causa impostante de insuficiencia renal crónica?. *Medicina clínica*, *117*(14), 536-538.

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

Sainz, J., Wangensteen, R., Gómez, I. R., Moreno, J. M., Chamorro, V., Osuna, A., ... & Vargas, F. (2005). Antioxidant enzymes and effects of tempol on the development of hypertension induced by nitric oxide inhibition. *American journal of hypertension*, *18*(6), 871-877.

Someya, A., Nishijima, K., Nunoi, H., Irie, S., & Nagaoka, I. (1997). Study on the superoxide-producing enzyme of eosinophils and neutrophils—comparison of the NADPH oxidase components. *Archives of biochemistry and biophysics*, *345*(2), 207-213.

Sousa, T., Oliveira, S., Afonso, J., Morato, M., Patinha, D., Fraga, S., ... & Albino-Teixeira, A. (2012). Role of H₂O₂ in hypertension, renin-angiotensin system

activation and renal medullary dysfunction caused by angiotensin II. *British journal of pharmacology*, 166(8), 2386-2401.

Sousa, T., Pinho, D., Morato, M., Marques-Lopes, J., Fernandes, E., Afonso, J., Oliveira, S., Carvalho, F., Albino-Teixeira, A. (2008) Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors. *Eur J Pharmacol* 588: 267-276.

te Riet, L., van Esch, J. H., Roks, A. J., van den Meiracker, A. H., & Danser, A. J. (2015). Hypertension: renin–angiotensin–aldosterone system alterations. *Circulation research*, 116(6), 960-975.

Terés, S., Barceló-Coblijn, G., Benet, M., Alvarez, R., Bressani, R., Halver, J. E., & Escriba, 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*.

Terryn, S., & Devuyst, O. (2011). Oxidative stress in the kidney: proximal tubule disorders. In *Studies on renal disorders* (pp. 179-203). Humana Press.

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

Zatz, R., & Baylis, C. (1998). Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension*, 32(6), 958-964.