



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR. IGNACIO CHÁVEZ" DIVISIÓN DE  
ESTUDIOS DE POSGRADO

TESIS

Evaluación del efecto del aceite de aguacate sobre la reactividad vascular renal y la  
disfunción mitocondrial inducida por angiotensina II

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:  
Licenciado en Químico Farmacobiología  
José Lucio Hernández de la Paz

Dirección de tesis:

Doctor en Ciencias Biológicas  
Cristian Cortés Rojo

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas  
Rafael Salgado Garciglia

Morelia, Michoacán  
México  
agosto de 2015



La Maestría en Ciencias de la Salud de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Pertenece al Padrón de Posgrado de Excelencia

Del CONACyT

El estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Recibió beca de la U.M.S.N.H

Durante la realización de su tesis de Maestría en Ciencias de la Salud

El Comité Tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la  
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, aprobó la tesis que  
presentó:

Licenciado en Químico Farmacobiología José Lucio Hernández de la Paz

Doctora en Ciencias en la  
especialidad de Farmacología  
Marcia Yvette Gauthereau Torres

---

Doctora en Ciencias Quimicobiológicas  
Martha Eva Viveros Sandoval

---

Doctor en Ciencias en Farmacología  
Daniel Godínez Hernández

---

Dirección de tesis

Doctor en Ciencias Biológicas  
Christian Cortés Rojo  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas  
Rafael Salgado Garciglia  
CINVESTAV Unidad Irapuato

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas

Laboratorio de Bioquímica



## FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR IGNACIO CHÁVEZ"



### Evaluación del efecto del aceite de aguacate sobre la reactividad vascular renal y la disfunción mitocondrial inducida por angiotensina II

#### RESUMEN

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónico-degenerativa de alta prevalencia en México y que provoca una variedad de complicaciones con un alto impacto socioeconómico, una de las más importantes es el daño renal. La angiotensina II (Ang II) juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones renales en la HTA. Durante la HTA, la presión de perfusión elevada a nivel renal eleva la síntesis de Ang II. Esto da lugar a una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), las cuales activan vías involucradas en el desarrollo de fibrosis renal y alteran la función vascular al disminuir la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), un importante vasodilatador, al convertirlo en peroxinitrito (NOO•), el cual carece de efecto vasorrelajante. Además, el exceso de ERO y de NOO• causan disfunción mitocondrial, lo que conduce a aumento en la formación de ERO, exacerba la disminución de las concentraciones de NO y provoca un aumento sostenido en la presión arterial. En virtud de lo anterior, se ha propuesto que la protección de la función mitocondrial contra el daño oxidativo y la disminución de la formación de ERO en este orgánulo podría ser una estrategia terapéutica para mejorar la función vascular durante la HTA. En nuestro grupo de trabajo, se ha demostrado anteriormente que el consumo de aceite de aguacate, una fuente rica de antioxidantes lipofílicos, previene el daño a la función mitocondrial y la producción excesiva de ERO en el riñón inducidos por la diabetes. Por lo tanto es hipotético establecer que la administración del aceite de aguacate podría tener un efecto benéfico en la vasculatura renal contra los efectos dañinos de la Ang II, al mejorar la función mitocondrial y el estrés oxidativo. **Objetivo general:** Determinar si el aceite de aguacate atenúa la reactividad vascular renal a la Ang II al mejorar la función mitocondrial y disminuir el estrés oxidativo en ratas tratadas con un inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (NOS). **Material y métodos:** A ratas tratadas con L-NAME, se les suplementó durante 45 días con aceite de aguacate o losartán, un antagonista AT<sub>1</sub>. Para esto, se aislaron los riñones al final del tratamiento y se evaluó la reactividad vascular a la Ang II en un equipo tipo Langendorff. Además, se aislaron mitocondrias y se evaluó su función midiendo el potencial de membrana y la actividad de los complejos de la CTE, determinando la formación de ERO, analizando algunos marcadores de estrés oxidativo. **Resultados:** Los riñones de ratas tratadas con L-NAME mostraron una vasorrelajación disminuida después del estímulo con Ang II, lo cual fue prevenido por el tratamiento con aceite de aguacate o losartan. Por otra parte, las mitocondrias renales de ratas tratadas con L-NAME mostraron una disipación casi total del potencial de membrana, lo cual fue atribuido a una inhibición en la actividad del complejo IV de la CTE y se asoció a una mayor producción de ERO y exacerbación del estrés oxidativo. Todos estos efectos fueron prevenidos totalmente por la suplementación con aceite de aguacate o losartan. Además con la administración del aceite de aguacate, se logró reducir el estrés oxidativo reflejando un mayor cociente GSH/GSSG.

#### Palabras clave:

Enfermedad del riñón; óxido nítrico; mitocondria; estrés oxidativo; hipertensión.



## FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS "DR IGNACIO CHÁVEZ"



Evaluation of the effect of avocado oil on renal vascular reactivity and mitochondrial dysfunction induced by angiotensin II

### Abstract

The arterial hypertension (AH) is a chronic degenerative disease with high prevalence in Mexico that causes a variety of complications with a high socioeconomic impact, one of the most important is the kidney damage. The angiotensin II (Ang II) plays an important role in the development of kidney complications in the AH. During the AH, high pressure perfusion on kidney level increases the synthesis of Ang II. This leads to an overproduction of reactive oxygen species (ROS), which activate pathways involved in the development of kidney fibrosis and alter vascular function decreasing the bioavailability of nitric oxide (NO) which is an important vasodilator, to convert it into peroxynitrite (NOO•), that has not vasorelaxant effect. In addition, the excess of ROS and NOO• cause mitochondrial dysfunction, that leads to increasing the ROS formation, decrease the NO concentrations and produce a sustained increase in blood pressure. Based on the above mentioned, it has proposed that the protection of the mitochondrial function against the oxidative damage and the decreasing of the ROS formation in this organelle could be the therapeutic strategy to improve the vascular function during the AH. In our working group, it has been previously demonstrated that ingest of avocado oil, a rich source of lipophilic antioxidants, prevents the damage in the mitochondrial function and the excessive production of ROS in kidney induced by diabetes. Therefore it is possible to hypothesize that the administration of avocado oil could have beneficial effect on the renal vasculature against the harmful effects of the Ang II, improving the mitochondrial function and the oxidative stress. **General goal:** Determining if the avocado oil attenuates renal vascular reactivity to Ang II, to improving mitochondrial function and decreasing oxidative stress in treated rats with an inhibitor of nitric oxide synthase (NOS). **Materials and methods:** the treated rats with L-NAME were supplemented during 45 days with avocado oil or Losartan, an antagonist AT<sub>1</sub>. At the end of the treatment kidneys were isolated and the vascular reactivity to Ang II was evaluated in Langendorff equipment. Furthermore mitochondrial were isolated and evaluated their function by measuring the membrane potential and activity of the complex of ETC, it was determined the formation of ROs and oxidative stress markers were analyzed. **Results:** treated rats with L-NAME kidneys showed diminished vasorelaxation after stimulation with Ang II, wich was prevented with avocado oil or Losartan treatment. On the other hand, renal mitochondria of L-NAME treated rats showed almost complete dissipation of the membrane potential, which was attributed to the inhibition of the complex IV activity of ETC and it was associated to increased production of ROS and exacerbation of oxidative stress. All this effects were totally prevented by supplementation of avocado oil or Losartan. Besides avocado oil achieved reducing the oxidative stress, reflecting higher ratio GSH/GSSG.

Key words:

Kidney disease; nitric oxide; mitochondria; oxidative stress; hypertension.

## Abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
Ang II	Angiotensina II
ATP	Adenosina trifosfato
A.O.	Aceite de aguacate (avocado oil)
CTE	Cadena de transporte de electrones
ERO	Especies reactivas de oxígeno
HAS	Hipertensión arterial sistémica
HTA	Hipertensión arterial
IRC	Insuficiencia renal crónica
PA	Presión arterial
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
SOD	Superóxido dismutasa
SRA	Sistema renina angiotensina

## DEDICATORIA

A Dios, que me permitió llegar a este momento de mi vida...

1 En este mundo todo tiene su hora; hay un momento para todo cuando ocurre: un momento para nacer y un momento para morir. 2 Un momento para plantar, y un momento para arrancar lo plantado. 4 Un momento para llorar y un momento para reír. Un momento para estar de luto y un momento para estar de fiesta. 6 Un momento para intentar, y un momento para desistir. Un momento para guardar y un momento para tirar. 8 Un momento para el amor y un momento para el odio...

Eclesiastés 3

A mis papás: Esther y Lucio, que a pesar de las circunstancias siempre han estado conmigo brindándome apoyo incondicional. Siempre poniendo el ejemplo de ser mejor persona cada día.

A mis hermanos: Brenda, Jesús y Ángel, por ser mi apoyo en las buenas y en las malas.

## AGRADECIMIENTOS

Al D.C. Christian Cortés Rojo, por su asesoría, correcciones y consejos no solo en la realización de este trabajo también en la vida. Un gran ejemplo de persona, que durante estos años de ciencia y convivencia se ha vuelto en un gran amigo, hasta considerarlo parte de mi familia.

Al D.C. Alfredo Saavedra Molina y a la Q.F.B. Mónica Clemente Guerrero, del laboratorio de Bioquímica del Instituto de Investigación Químico Biológico por su apoyo, compañía y por dejarme ser parte de su equipo de trabajo.

A mis sinodales D.C. Martha Eva Viveros Sandoval, D.C. Marcia Yvette Gauthereau Torres y D.C. Daniel Godínez Hernández, por sus valiosas aportaciones, correcciones y sugerencias hechas a este trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Omar, Isabel, Claudia, Andrés, Faride, Cristian, María, Mario y Xochitl, que gracias a ellos mi estancia en el laboratorio fue muy ameno.

A la familia Quevedo, que me han aceptado como un integrante más de la familia y que gracias a ellos a pesar de vivir lejos de mi familia sigo sintiéndome como en casa. A la M.C.Q. Quevedo que me ha apoyado con sus conocimientos en la Química y brindado ese apoyo y compañía cuando estaba por perder el camino en la investigación.

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en particular a la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr Ignacio Chávez”, por mi formación académica

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1.1 La hipertensión arterial sistémica</b> .....	1
<b>1.1.2 Clasificación hipertensión arterial</b> .....	2
<b>1.1.3 Perspectivas actuales de la hipertensión arterial</b> .....	3
<b>1.1.4 El sistema renina angiotensina en el control de la presión arterial</b> .....	4
<b>1.1.5 Nefropatía hipertensiva</b> .....	6
<b>1.2 Alteraciones mitocondriales durante la hipertensión arterial</b> .....	7
<b>1.3 Tratamientos antioxidantes durante la hipertensión arterial</b> .....	11
<b>1.4 Composición y características del aceite de aguacate</b> .....	14
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b> .....	18
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	20
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	20
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	20
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
<b>5.1 Reactivos y aceite de aguacate</b> .....	21
<b>5.2 Animales</b> .....	21
<b>5.3 Diseño experimental</b> .....	22
<b>5.4 Aislamiento y perfusión del riñón</b> .....	22
<b>5.5 Evaluación de la función contráctil en riñones aislados</b> .....	23
<b>5.6 Aislamiento de mitocondrias</b> .....	24
<b>5.7 Determinación de la actividad de Los complejos de la cadena de transporte de electrones</b> .....	25
<b>5.7.1 NADH deshidrogenasa (Complejo I)</b> .....	26
<b>5.7.2 Succinato:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II)</b> .....	26
<b>5.7.3 Ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa (Complejo III)</b> .....	27
<b>5.7.4 Citocromo c oxidasa (Complejo IV)</b> .....	28
<b>5.8 Medición del potencial de membrana mitocondrial</b> .....	28
<b>5.9 Evaluación del estrés oxidativo mitocondrial</b> .....	29
<b>5.9.1 Producción de especies reactivas de oxígeno</b> .....	30

5.9.2	Determinación de glutatión (GSH/GSSG) .....	30
5.10	Análisis estadístico .....	32
6.	RESULTADOS.....	32
6.1	Supervivencia de los diferentes grupos experimentales al término de los tratamientos 32	
6.2	Efecto del aceite del A.O. sobre la reactividad vascular renal a la Ang II en ratas tratadas con L-NAME.....	33
6.3	Efecto del aceite de aguacate sobre las concentraciones séricas de NO.....	38
6.4	Efecto del aceite de aguacate en la funcionalidad mitocondrial renal de ratas tratadas con L-NAME .....	39
6.4.1	Influencia del aceite de aguacate sobre los efectos del L-NAME en el potencial de membrana mitocondrial.....	39
6.4.2	Efecto del aceite de aguacate frente a la actividad de los complejos de la CTE .....	42
6.5	Influencia del aceite de aguacate sobre los efectos del L-NAME en el estrés oxidativo de mitocondrias de riñón de rata .....	44
6.5.1	Efecto del aceite de aguacate sobre la generación mitocondrial de ERO .....	44
6.5.2	Efecto del aceite de aguacate sobre la concentración de glutatión GSH/GSSG .....	46
7.	DISCUSIÓN.....	47
8.-	CONCLUSIÓN .....	54
9.-	PERSPECTIVAS .....	54
10.-	BIBLIOGRAFÍA .....	55
11.-	ANEXOS.....	59
13.-	ÍNDICE DE FIGURAS .....	61

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 La hipertensión arterial sistémica

La hipertensión arterial sistémica (HAS) es un padecimiento multifactorial caracterizado por aumento sostenido de la presión arterial (PA) sistólica, diastólica o ambas a un valor igual o mayor de 140/90 mmHg (1). La PA sistólica corresponde al valor máximo de la tensión arterial cuando el corazón se contrae, esto se refiere al efecto de presión que ejerce la sangre expulsada del corazón sobre la pared de los vasos. Por otra parte la PA diastólica corresponde al valor mínimo de la tensión arterial cuando el corazón se encuentra entre los latidos cardiacos, se refiere al efecto de distensibilidad de la pared de las arterias, es decir la resistencia vascular periférica. La hipertension arterial (HTA) tiene como característica principal una disminución en la síntesis de óxido nítrico (NO) (2). Durante este padecimiento se presenta un deterioro de la vasodilatación en diferentes lechos vasculares, incluyendo las paredes de los vasos de calibre pequeño (3).

La HTA rara vez produce síntomas durante las primeras etapas, de ahí su denominación de «enfermedad silenciosa» y en muchos casos no se diagnostica. Por otra parte, en los casos que se diagnostican, algunos pacientes no tienen acceso al tratamiento y es posible que no puedan controlar con éxito su padecimiento. El tratamiento de las complicaciones de la hipertensión abarca intervenciones costosas como la cirugía de

revascularización miocárdica, la endarterectomía carotídea o la diálisis, que agotan los presupuestos gubernamentales e individuales.

### 1.1.2 Clasificación hipertensión arterial

La HTA se puede clasificar según el nivel de presión sanguínea o dependiendo de la etiología, según la presión sanguínea (4) (Cuadro 1) y la etiología.

Cuadro 1.

Clasificación PA	PA sistólica (mmHg)	PA diastólica (mmHg)
Normal	<120	<80
Prehipertensión	120-139	80-89
Hipertensión estado 1	140-159	90-99
Hipertensión estado 2	≥160	≥100

HTA PRIMARIA O ESENCIAL.- El 95 % de las personas hipertensas no presentan una etiología definida; esto define a la HTA esencial, también denominada primaria o idiopática (5). Se presenta en la mayoría de los casos, no existe una causa orgánica identificable. Entre sus mecanismos participan la herencia, alteraciones en el sistema nervioso simpático, en el volumen sanguíneo, en el gasto cardiaco, en las resistencias arteriolares periféricas, en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, entre otras.

HTA SECUNDARIA.- En este tipo se conoce la entidad nosológica responsable del incremento de la PA, que puede ser renal (glomerulopatías, tubulopatías y enfermedades intersticiales), vascular (coartación de la aorta, hipoplasia de la aorta, trombosis de la vena renal, arteritis), endocrina (enfermedades de la tiroides o de la paratiroides, aldosteronismo primario, síndrome de Cushing, feocromocitoma), del sistema nervioso central (tumores, encefalitis, apnea del sueño), físicas (quemaduras), inducidas por medicamentos (glucocorticoides, antiinflamatorios no esteroideos, inhibidores de la ciclooxigenasa 2, anfetaminas, simpaticomiméticos, anticonceptivos orales, ciclosporina, eritropoyetina, complementos dietéticos), inducidas por tóxicos [cocaína, orozuz (Regaliz), plomo] e inducidas por el embarazo (pre-eclampsia y eclampsia) (1).

### **1.1.3 Perspectivas actuales de la hipertensión arterial**

La HTA representa un problema grave de salud pública al ser considerada como el primer factor de riesgo para sufrir enfermedades cardiovasculares, su importancia radica en las consecuencias sobre la esperanza y calidad de vida de quien la padece. La prevalencia de HTA en México es de 31.5%, y es más alta en adultos con obesidad (42.3%) que en adultos con índice de masa corporal (IMC) normal (18.5%) y en adultos con diabetes (65.6%) que sin esta enfermedad (27.6%). Además, después de los 50 años, uno de cada dos mexicanos presenta HTA y esta cifra podría ser aún mayor debido a que 2 de cada 3

hipertensos desconoce que está enfermo. La PA distólica predice de una manera más acertada los fenómenos cardiovasculares adversos en personas hipertensas de más de 50 años de edad debido a una disminución de la distensibilidad de los vasos sanguíneos relacionada con el envejecimiento y la aterosclerosis (6).

Interacciones entre variaciones genéticas y factores ambientales tales como el estrés, la dieta y la actividad física favorecen el desarrollo de la HTA. Estas interacciones originan cambios importantes en: sistema nervioso autónomo, el sistema renina angiotensina (SRA), factores endoteliales, hormonas vasopresoras y vasodepresoras, volumen líquido corporal (5).

#### **1.1.4 El sistema renina angiotensina en el control de la presión arterial**

El SRA es uno de los sistemas más importantes en la regulación de la PA, su principal mediador es la angiotensina II (Ang II), la cual está implicada de manera directa en el control de la HTA y una alteración en la síntesis de la Ang II, implica un aumento o disminución de la PA.

El SRA es una cascada proteolítica de gran importancia en la regulación de la presión arterial, factores como el decremento del volumen sanguíneo o la disminución de las resistencias periféricas totales, activan la liberación de renina por los riñones. La renina es

sintetizada y almacenada en su forma inactiva (prorenina) en las células yuxtglomerulares de los riñones. Cuando la PA desciende, se produce una serie de escisiones en las moléculas de prorenina para producir renina, la cual actúa proteolíticamente sobre una proteína sintetizada principalmente en el hígado, el angiotensinógeno, liberando así un decapeptido, la angiotensina I, que posee propiedades discretas de vasoconstricción. Unos segundos o minutos después de la formación de angiotensina I se producen unos cortes del péptido por medio de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) convirtiéndola en angiotensina II (Ang II). La ECA se produce principalmente en los pulmones, pero también se sintetiza de manera local en los vasos y riñones. La Ang II es un octapéptido con una capacidad vasoconstrictora muy potente, pero solo persiste en la circulación de 1 a 2 minutos porque es inactivada rápidamente por muchas enzimas tisulares y sanguíneas (angiotensinasas) (2).

Los efectos de la Ang II están mediados por dos subtipos principales de receptores: los receptores AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. Ambos receptores pertenecen a la familia de receptores con 7 dominios transmembranales, el receptor AT<sub>1</sub> se caracteriza por acoplarse a proteínas G $\alpha_{q/11}$ , esto le permite activar fosfolipasas como el inositol 1,2,5,-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol, la cual activa a la proteína cinasa C (PKC) que fosforila proteínas que participan en la contracción de músculo liso, siendo así el receptor AT<sub>1</sub> el encargado de mediar la mayoría de las acciones conocidas de la Ang II como lo es la vasoconstricción (7). Los receptor AT<sub>2</sub> se acoplan a proteínas G inhibitoras, lo cual activa fosfatasa tanto de tirosina como la proteína tirosina fosfatasa SHP-1 y serina-treonina como la PP2A. Este

acoplamiento provoca desfosforilación de proteínas activadas por el acoplamiento del receptor  $AT_1$  con  $G_{\alpha q}$ , siendo así un mecanismo por el cual el receptor  $AT_2$  antagoniza las acciones del receptor  $AT_1$  (8).

### 1.1.5 Nefropatía hipertensiva

Una complicación que se asocia con la HTA es la nefropatía hipertensiva, siendo esta enfermedad la segunda causa de enfermedad renal crónica (ERC), superada únicamente por la diabetes mellitus (DM) (9), de manera tal que la enfermedad renal terminal es debida a la HTA en cerca del 40 % de los pacientes (10). El término de nefropatía hipertensiva fue utilizado por primera vez por Volhard y Fahr en el siglo XX (9), es un concepto utilizado en la asociación en pacientes con HTA e insuficiencia renal crónica (IRC). La HTA se considera actualmente como una de las tres principales causas de IRC en pacientes que se encuentran en diálisis (10).

Una parte importante de la patogénesis de la HTA es el incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la vasculatura, lo que promueve la vasoconstricción, la remodelación vascular e incremento en la resistencia vascular periférica (11). En la vasculatura, una fuente importante de ERO es la enzima NADPH oxidasa (Nox), cuya función es producir el radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ) a partir de oxígeno utilizando como donador de electrones NADPH. En condiciones patológicas, el aumento

en los niveles de ERO conduce a disfunción endotelial, lo cual se ha relacionado con una disminución en la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) (el cual es considerado el más potente agente relajante en la vasculatura), ya que su reacción con el radical  $O_2^{\cdot-}$  da lugar a la formación del radical libre peroxinitrito (NOO $\cdot$ ), el cual carece de acción vasorrelajante (12). Por otro lado, en relación con la nefropatía hipertensiva, se ha planteado la hipótesis de que un estado de hipoxia tisular en el riñón hipertenso induce la fibrogénesis y la insuficiencia renal progresiva en la HTA (13). A su vez, la hipoxia renal en la HTA ha sido relacionada con un incremento en la producción renal de Ang II, lo cual a su vez, como se explicó anteriormente, genera cambios hemodinámicos asociados a activación de los receptores  $AT_1$  y generación excesiva de ERO asociada a la activación de la Nox en el endotelio. Por lo tanto, la utilización del oxígeno por la Nox da lugar a un estado de hipoxia, lo que activa al factor inducible por hipoxia alfa (HIF- $\alpha$ ), el cual inhibe de manera transcripcional la actividad colagenasa en el riñón y con ello incrementa la acumulación de colágeno en la matriz extracelular, lo cual es característico del daño fibrótico durante la HTA en el riñón (14).

## 1.2 Alteraciones mitocondriales durante la hipertensión arterial

Las mitocondrias son una de las principales fuentes de ERO, de tal modo que un aumento en la formación de dichas especies debido a defectos en la función mitocondrial

en el endotelio puede favorecer el desarrollo de la HTA (15).

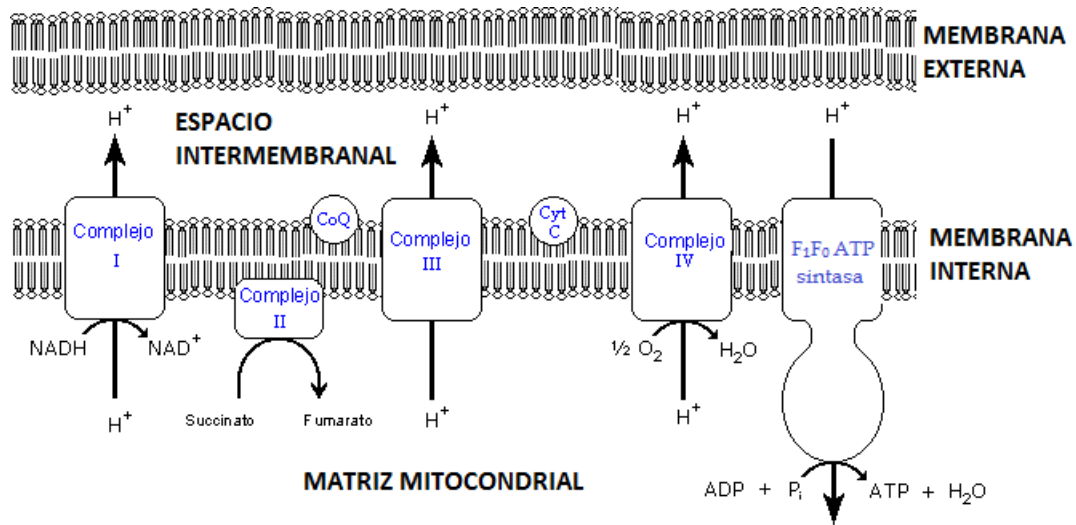
Las mitocondrias tienen una amplia variedad de funciones en la célula, tales como la regulación de la apoptosis, modulación de la señalización celular por ERO, inducción de termogénesis, modulación de la homeostasis del calcio intracelular y tienen como función principal, la generación de energía en forma de trifosfato de adenosina (ATP) (16). Las mitocondrias están formadas por dos membranas, una externa y una interna, la cuales delimitan dos tres compartimientos (Figura 1): el espacio intermembranal, formado por el espacio entre las membranas interna y externa y la matriz mitocondrial, que es el espacio delimitado por la membrana interna. Asimismo, la membrana interna está organizada como una serie de pliegues a los cuales se les denomina crestas mitocondriales (16).

En las mitocondrias, el proceso de síntesis de ATP acoplado a la oxidación de sustratos y el transporte de electrones hacia un aceptor final de electrones (proceso conocido también como fosforilación oxidativa), ocurre gracias a la actividad de la cadena de transporte de electrones (CTE), la cual es un conjunto de 4 complejos proteicos situados en la membrana mitocondrial interna. La CTE usa dos acarreadores de electrones no unidos a los complejos de la CTE, el citocromo c y la ubiquinona, los cuales transportan electrones entre los complejos respiratorios (17).

Durante la fosforilación oxidativa, el complejo I y II reciben electrones de sustratos provenientes del metabolismo como el NADH y FADH<sub>2</sub> y los transfieren a un transportador electrónico lipídico, la coenzima Q, la cual transfiere a su vez los electrones al complejo III.

Este a su vez, reduce al otro acarreador móvil de electrones, el citocromo *c*. Por último, el complejo IV acopla la transferencia de electrones del citocromo *c* al O<sub>2</sub> para formar agua (17). Las reacciones que median el transporte de electrones son exergónicas y su energía se conserva mediante la traslocación de protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembranal. Esto genera un gradiente electroquímico a través de la membrana interna debido a la diferencia de cargas eléctricas y de pH entre la matriz y el espacio intermembranal, donde el espacio intermembranal queda más electropositivo y con un pH más ácido que la matriz. Al voltaje producido a través de la membrana interna mitocondrial debido a la diferencia de cargas eléctricas a través de la membrana interna se le denomina potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) (18).

La energía del  $\Delta\Psi$  se utiliza para la síntesis de ATP por la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa, la cual se encuentra unida a la membrana interna mitocondrial. Para ello, los protones reingresan a la matriz mitocondrial a través de un canal específico de esta enzima y la energía liberada es convertida en energía química para la síntesis de ATP a partir de ADP y P<sub>i</sub> (17).



**Figura 1. – Complejos de la cadena de transporte de electrones y la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa.** Complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo II (Succinato deshidrogenasa), Complejo III (Citocromo *c* oxidorreductasa), Complejo IV (Citocromo *c* oxidasa) y Complejo V (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP sintasa). Tomado y modificado de [www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/cte/traselectfofox21fid.html](http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/cte/traselectfofox21fid.html) (18)

En condiciones fisiológicas se generan ERO en la mitocondria debido a la fuga de un pequeño porcentaje de electrones en los sitios redox del complejo I y el complejo III (19) (20) (21). Durante procesos patológicos, los complejos de la CTE pueden sufrir daño oxidativo debido al ataque de las ERO proveniente de fuentes extramitocondriales tales como la Nox u otras enzimas como la xantina oxidasa o el sistema citocromo P450 en el hígado, así como aquellas ERO producidas por un aumento en la concentración libre de metales de transición tales como el hierro o el cobre. Lo anterior da lugar a una interrupción del flujo de electrones a través de los complejos de la CTE, lo que aumenta la fuga de electrones y por lo tanto, la generación de ERO (21).

Respecto a lo anterior, en la HTA se han observado alteraciones en la función

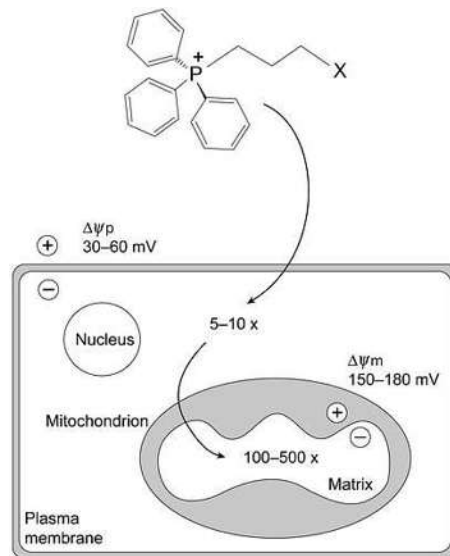
mitocondrial de diversos tejidos, lo cual incluye disminución en la respiración mitocondrial, disipación del  $\Delta\Psi$  y generación excesiva de ERO. En circunstancias normales, las ERO mitocondriales son neutralizadas por las isoformas 1 y 2 de la enzima superóxido dismutasa las cuales están situadas entre las membranas mitocondriales y en la matriz mitocondrial, respectivamente (16). Por lo tanto, el daño mitocondrial en la hipertensión puede deberse a un desequilibrio entre la generación de ERO y las defensas antioxidantes.

### 1.3 Tratamientos antioxidantes durante la hipertensión arterial

El descubrimiento de la participación del daño oxidativo en la fisiopatología de la HTA ha dado como resultado diversas investigaciones acerca de los posible efectos benéficos de los antioxidantes en esta enfermedad. Algunos de estos estudios han demostrado la ineficacia del uso de antioxidantes como la vitamina C y la vitamina E en el tratamiento de la HTA y otras enfermedades que presentan aumento en la formación de ERO (22). Esto ha dado pie a que se sugiera que *in vivo*, el estrés oxidativo no juega un papel importante en el desarrollo de la HTA y sus complicaciones. Otra posible explicación es que las dosis utilizadas son excesivas, de tal modo que bajo estas condiciones, estas sustancias podrían actuar como prooxidantes, lo que favorecería el estrés oxidativo y el daño vascular. Otra posibilidad es que el exceso de antioxidantes podría provocar una disminución en las concentraciones de ERO necesarias para la modulación de vías de

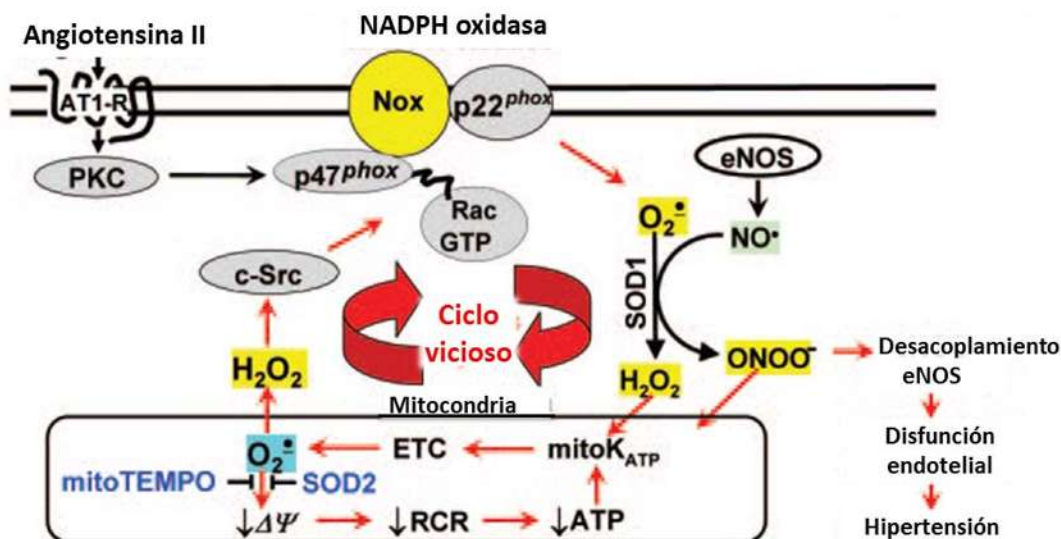
señalización relacionadas con la fagocitosis y la vasodilatación (23) (24).

Otra hipótesis que podría explicar la ineficacia de los antioxidantes en la HTA es que no lleguen a concentraciones adecuadas a los sitios de generación de ERO involucrados en el desarrollo de la HTA, de entre los cuales, la mitocondria es uno de ellos como se señaló anteriormente. Esta idea se ha considerado altamente factible en función de la relativamente alta impermeabilidad de la membrana interna mitocondrial, lo cual limitaría la acumulación de sustancias exógenas en la matriz mitocondrial. Para demostrar esta hipótesis, se han diseñado y probado antioxidantes que selectivamente se acumulan en la mitocondria gracias a su estructura química y al  $\Delta\Psi$  negativo generado en el lado de la matriz. Dichos antioxidantes consisten en la unión covalente de antioxidantes tales como la ubiquinona, el tempol, entre otros, a un catión trifenilfosfonio (Figura 2). La carga positiva de estos cationes les permite a las moléculas unidas a este ser fácilmente permeables a las bicapas lipídicas y acumularse en mayor proporción en la matriz mitocondrial, debido a que el  $\Delta\Psi$  mitocondrial tiene un valor más negativo (-150 a -180 mV, dentro de la mitocondria) que el potencial de membrana plasmático (30 a 60 mV) (Figura 2). Esto también permite la acumulación de estos antioxidantes del fluido extracelular hacia la célula, logrando concentrarse dentro de la mitocondria (25).



**Figura 2. Estructura de un antioxidante mitocondria-dirigido.** X = antioxidante, unido covalentemente a un catión trifenilfosfonio mediante una cadena alquílica. Tomado y modificado de Smith *et al.*, 2003.

La actividad de NADPH oxidasa estimula la producción de  $O_2^{\cdot-}$  reaccionando con NO convirtiéndolo en  $NOO\cdot$  y con la actividad de la superóxido dismutasa (SOD 1) produciendo  $H_2O_2$  produciendo un estrés en la mitocondria, y con ello generando más  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial, generando un ciclo vicioso de generación de ERO. El antioxidante mitocondrial-dirigido logra reducir la generación de  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial imitando la actividad de la SOD 2. Un antioxidante mitocondrial-dirigido (mitoTEMPO) utilizado en ratas con HTA inducida mediante la infusión de Ang II, mostró efectos benéficos significativos al disminuir la actividad de la NADPH oxidasa, logrando reducir la producción del anión  $O_2^{\cdot-}$  mitocondrial y restauró el nivel de NO biodisponible, también el mitoTEMPO logró disminuir estadísticamente la presión arterial (Figura 3) (20).



**Figura 3. Mecanismo de acción del mitoTEMPO.** Durante la HTA la generación de Ang II y la actividad de NADPH oxidasa generan ERO produciendo un estrés en la mitocondria, ésta a su vez genera más ERO formando un ciclo vicioso de generación de ERO, el mitoTEMPO logra inhibir esta generación de ERO al internalizarse en la matriz mitocondrial actuando de una forma similar a la SOD2. Tomado y modificado de Dikalova *et al.*, 2010.

#### 1.4 Composición y características del aceite de aguacate

El aguacate (*Persea americana* Mill.) pertenece a la familia Lauraceae, cuyos frutos son la fuente de un aceite (A.O.) que posee un alto contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, conteniendo en mayor porcentaje al ácido oleico (Cuadro 2) (26), al cual se le han atribuido efectos benéficos sobre la HTA. Por ejemplo, en poblaciones europeas en cuya dieta, se incluye regularmente la ingesta de aceite de oliva extra virgen, se ha observado una incidencia significativamente baja de enfermedades cardiovasculares comparados con la población de otras ciudades Europeas; parte de estos efectos

benéficos se han atribuido a la composición de los ácidos grasos del aceite de oliva, el que de manera similar al aceite de aguacate, contiene hasta un 70% de ácido oleico. En concordancia con lo anterior, en estudios con ratas espontáneamente hipertensas, un modelo de estudio de la HTA primaria, se ha observado que la administración de aceite de oliva extra virgen reduce a partir del cuarto día de administración una reducción significativa de la presión arterial; además, se identificó al ácido oleico como el componente responsable de dicho efecto (27).

**Cuadro 2.-** Contenido de ácidos grasos del A.O. (Tomada y modificada de Alvizouri *et al.*, 2009)

Ácido graso	Aceite de aguacate
Mirístico C14:0	0.25 %
Palmítico C16:0	17.68 %
Palmitoleico C16:1	7.23 %
Esteárico C18:0	1.11 %
Oleico C18:1	61.62 %
Linoleico C18:2	12.09 %

El aguacate recibe un tratamiento previo de maceración en frío, y para la extracción del A.O., trituraciones, decantación, centrifugación y filtrado de la pulpa, que ayudan a mantener en el aceite cantidades significativas de los fitoquímicos bioactivos

presentes en la fruta. El A.O. tiene sabor neutro, es fuente de vitaminas A, B, D y E, tiene un alto contenido en proteínas y contiene betasitosterol, al que se le han atribuido beneficios en reducir el colesterol de baja densidad (LDL) y mejorar la salud de la próstata (28) (29).

Además, el A.O. contiene una amplia variedad de antioxidantes, como la anteroxantina,  $\alpha$  y  $\beta$  carotenos, la violaxantina, la neoxantina, la zeaxantina, la  $\beta$ -criptoxantina,  $\alpha$  y  $\gamma$  tocoferoles, clorofilas a y b y luteína (30).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el fruto de aguacate puede ser utilizado en la dieta para prevención de cáncer (31), al exhibir ciertos extractos del aguacate efectos antiproliferativos en líneas celulares de cáncer oral, debido a su alto contenido de fitoquímicos, esto fue atribuido a una combinación de acetogeninas alifáticas específicas (32). Asimismo, un extracto lipídico del aguacate probado en células de cáncer de próstata mostró tener efecto antiproliferativo, atribuido a la luteína por ser el principal componente del extracto. Sin embargo, la luteína pura no mostró efectos inhibitorios sobre el crecimiento de células cancerígenas, atribuyéndose entonces a la combinación de las sustancias bioactivas contenidas en el extracto lipofílico del aguacate (33).

El A.O. contiene una alta cantidad de esteroides (3.3-4.5 mg/g), mayor que el presente en el aceite de oliva (34). A los esteroides o fitoesteroides se les ha atribuido efectos contra cáncer, anti-inflamatorios, actividad antioxidante, protector del aceite a

temperaturas altas, antimicrobiano, hepatoprotector, entre otros (35).

En ratas wistar con diabetes tipo I inducida con estreptozotocina, se observó una inhibición en la actividad del complejo III en mitocondrias de riñón, mientras que la administración oral de A.O. en ratas diabéticas, mostró un incremento en la actividad del complejo III. En dichas mitocondrias se midió de igual forma la actividad del complejo III frente a un inductor de estrés oxidativo ( $Fe^{2+}$ ), logrando que la dieta con A.O. generó una protección en concentraciones de hasta 50  $\mu M$  de  $Fe^{2+}$ , únicamente siendo inhibida en concentración de 100  $\mu M$  de  $Fe^{2+}$ . En mitocondrias de riñón de ratas diabéticas sin la administración de A.O., se presentó una inhibición en estado basal, mientras que en las mitocondrias de riñón de ratas diabéticas tratadas con A.O., se observó una menor generación de ERO en comparación con las ratas sin la dieta de A.O. Este efecto protector que proporcionó la dieta con A.O. se le atribuyó a una protección en la disminución de la concentración de citocromo c (36).

## 2. JUSTIFICACIÓN

La HTA es una enfermedad crónico degenerativa que está asociada a disfunción mitocondrial y aumento en el estrés oxidativo. Entre sus complicaciones más importantes se encuentra la nefropatía hipertensiva, para la cual no existe un tratamiento específico. Por lo tanto, es importante la búsqueda de alternativas que contribuyan a prevenir y/o retrasar la aparición de esta complicación en combinación con la terapia antihipertensiva convencional. En virtud del papel del estrés oxidativo mitocondrial en el desarrollo de la disfunción vascular en la HTA a través de la activación excesiva de los receptores a Ang II y el efecto benéfico del A.O., en la prevención del daño oxidativo mitocondrial renal en ratas diabéticas, es factible proponer que el A.O. podría disminuir la formación de ERO en mitocondrias de riñón de ratas tratadas con L-NAME al proteger la funcionalidad de la CTE, lo cual podría mejorar la función vascular renal en respuesta a Ang II.

### **3. HIPÓTESIS**

El aceite de aguacate disminuye la reactividad vascular renal a la Ang II al atenuar la disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo en ratas tratadas con L-NAME.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar el efecto del aceite de aguacate sobre la reactividad vascular renal a la Ang II en asociación a una disminución del estrés oxidativo mitocondrial.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el efecto del aceite de aguacate sobre la reactividad vascular renal a la Ang II en ratas tratadas con L-NAME.
2. Determinar si los efectos del aceite de aguacate en ratas tratadas con L-NAME están mediados por alteraciones en la concentración del óxido nítrico NO.
3. Analizar el efecto del aceite de aguacate en la funcionalidad mitocondrial renal de ratas tratadas con L-NAME.
4. Evaluar el efecto del aceite de aguacate sobre el estrés oxidativo en mitocondrias de riñones de ratas tratadas con L-NAME.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Reactivos y aceite de aguacate

Los reactivos utilizados fueron de grado reactivo, adquiridos de Sigma Chemical (St. Louis, MO. E.U.A.). Se utilizó una presentación comercial de aceite de aguacate (Avoplus, DIRICOM S.A., Morelia, Mich).

### 5.2 Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-350 g de peso, las cuales fueron mantenidas en un bioterio bajo condiciones de temperatura controlada y ciclos de luz/obscuridad de 12 horas. Fueron alimentadas con una dieta especial para roedor y agua *ad libitum*. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, Secretaria de Agricultura, México).

La hipertensión fue inducida con N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME). Este compuesto es un inhibidor competitivo de las diferentes isoformas de la óxido nítrico sintasa, por lo que produce una disminución en los niveles de óxido nítrico (37; 38). De esta manera, la administración crónica de L-NAME produce hipertensión (39).

### 5.3 Diseño experimental

Las ratas fueron divididas al azar en cinco grupos. Grupo 1: control (CTRL), Grupo 2: CTRL + A.O., Grupo 3: L-NAME, Grupo 4: L-NAME + A.O., Grupo 5: L-NAME + Losartán (Los), un antihipertensivo antagonista de los receptores AT<sub>1a</sub> Ang II. Los grupos 2 y 4 recibieron un dosis de A.O. de 1.06 ml por 250 g de peso de rata (36). El grupo 5 fue tratado con losartán en una dosis de 40 mg por kilogramo de rata (40). La administración se realizó vía oral diariamente durante un periodo de 45 días. El L-NAME se administró en el agua para beber a una concentración de 75 mg/kg de rata en las primeras 2 semanas, posteriormente se continuó el tratamiento con una dosis de 50 mg/kg de rata y se monitoreo el peso de las ratas para ajustar la dosis de cada tratamiento (41).

### 5.4 Aislamiento y perfusión del riñón

Para realizar la extracción del riñón, se anestesió a la rata utilizando pentobarbital sódico a una dosis de 50 mg/kg. Una vez inducida la anestesia profunda, se realizó una incisión abdominal en forma vertical. Se expusieron los órganos y se localizó la arteria mesentérica que irriga al riñón. Posteriormente, se canuló el riñón derecho, se extrajo y se colocó en la cámara para órgano aislado y perfundido con solución de Krebs.

Una vez que se colocó el riñón en la cámara, se perfundió con solución de Krebs a

pH 7.4, burbujeada con una mezcla de gas carbógeno al 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>, a una temperatura de 37 °C (ver anexo 1). El flujo se ajustó a 10 ml/min para obtener una presión basal y se mantuvo así por 15 min para establecer un periodo de estabilización. Después de este periodo, la presión de perfusión registrada se tomó como la presión de perfusión basal y se realizaron curvas dosis respuesta para evaluar las respuestas contráctiles de la vasculatura renal

### **5.5 Evaluación de la función contráctil en riñones aislados**

Posterior al periodo de estabilización anteriormente descrito, se evaluaron las repuestas contráctiles a Ang II determinando el incremento en la presión de perfusión en respuesta a esta hormona mediante un transductor de presión Grass adaptado a un sistema Biopac de adquisición de datos. El aumento en la presión de perfusión se interpretó como un índice de cambio en la resistencia en la arteria renal y por tanto, como un efecto vasoconstrictor inducido por la Ang II. Para las curva concentración-respuesta a esta hormona, se utilizaron dosis crecientes de Ang II ( $1 \times 10^{-7}$  M,  $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M y  $1 \times 10^{-3}$  M). Después de la adición de Ang II y su respuesta máxima se dejó que la presión de perfusión volviera a su nivel basal hasta mantenerse estable, para posteriormente continuar con las adiciones de cada una de las concentraciones.

Por otro lado, para determinar la capacidad de la vasculatura renal de relajarse

después de la contracción con Ang II, se evaluaron las respuestas al carbacol (cloruro de carbamilcolina) un agonista de los receptores muscarínicos. Después del periodo de estabilización, se indujo la contracción con Ang II mediante su administración en infusión constante (concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M) con ayuda de una bomba de infusión (Kd scientific, USA), a un volumen constante de 10ml/h. Una vez alcanzada una presión de perfusión constante se adicionó concentraciones crecientes de carbacol ( $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-5}$  M,  $1 \times 10^{-4}$  M,  $1 \times 10^{-3}$  M y  $1 \times 10^{-2}$  M), en cada una de las adiciones se dejó que la curva regrese a su presión de perfusión basal para continuar con la siguiente concentración de carbacol.

## 5.6 Aislamiento de mitocondrias

Las mitocondrias de riñón se aislaron mediante centrifugación diferencial con el método descrito por Saavedra-Molina y Devlin (42). Para obtener las mitocondrias, el riñón derecho fue triturado y lavados con medio 1 (1 mM EGTA, 220 mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH 7.4). Los fragmentos fueron homogenizados manualmente en un tubo Potter con vástago de teflón con medio 1 en hielo. Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 2000 rpm. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugo nuevamente a 7500 rpm. Después de esta centrifugación, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió cuidadosamente con un pincel y se lavó con medio 2 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH 7.4) a 9000 rpm.

Finalmente, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500  $\mu$ 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.

### **5.7 Determinación de la actividad de Los complejos de la cadena de transporte de electrones**

Las actividades de los complejos de la CTE fueron determinadas utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 18 UV/vis a temperatura ambiente usando inhibidores y sustratos específicos para cada complejo. Para facilitar el acceso de los sustratos e inhibidores a los complejos de la CTE, las mitocondrias fueron solubilizadas con Tritón X-100 al 10% en un buffer hipotónico (ver anexo 2) de la siguiente manera: 500  $\mu$ l de mitocondrias aisladas fueron resuspendidas en buffer hipotónico, se le agregó tritón al 10 % y se agitó en vórtex, se centrifugó a 12400 rpm/15 min/4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en buffer de fosfatos 50 mM (43). Posteriormente se determinó la actividad de cada uno de los complejos de la CTE.

### 5.7.1 NADH deshidrogenasa (Complejo I)

Se resuspendieron 0.1 mg/ml de mitocondrias sin permeabilizar en 1ml de buffer 50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.6) y se incubaron durante 5 min, con 1  $\mu\text{g}$  de antimicina A y 1mM de KCN para inhibir las actividades de los complejos III y IV respectivamente, y 5 mM de ferricianuro de potasio, 5  $\mu\text{M}$  de NADH y 0.5  $\mu\text{M}$  de EDTA. Al término de esta incubación se inició el registro de la absorbancia a una  $\lambda$  de 340 nm. Transcurrido 1 min se agregó 2 mM de NADH como sustrato y se continuó con el registro de los cambios en la absorbancia durante 1 min adicional. La velocidad de oxidación del NADH se calculó a partir de la pendiente del trazo espectrofotométrico utilizando su coeficiente de extinción molar de  $6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (44).

### 5.7.2 Succinato:ubiquinona oxidoreductasa (Complejo II)

Se resuspendieron 0.3 mg/ml de mitocondrias permeabilizadas con Tritón X-100 en un volumen de 1ml de buffer 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.6) y se incubó durante 5 minutos con 10  $\mu\text{g}$  de rotenona, 1  $\mu\text{g}$  de antimicina A y 1mM de KCN para inhibir las actividades de los complejos I, III y IV, respectivamente. Al término de esta incubación se agregó como aceptor artificial de electrones 1 mM de 2-6 diclofenilindofenol (DCIP) y se determinó la absorbancia basal de la suspensión durante 1 min a una  $\lambda$  de 600 nm. Posteriormente,

para estimular la actividad del complejo II se agregó 10mM de succinato como donador de electrones y se determinaron los cambios en la absorbancia durante 5 min adicionales para evaluar la reducción del DCIP mediada por el complejo II. La velocidad de reducción del DCIP se calculó a partir de las pendientes de los trazos espectrofotométricos usando el coeficiente de extinción molar de  $19.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el DCIP (44).

### 5.7.3 Ubiquinol:citocromo *c* oxidoreductasa (Complejo III)

0.1 mg/ml de proteína mitocondrial se resuspendió en 1ml de buffer 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.6) y se incubó durante 5 min con 10  $\mu\text{g}$  de rotenona y 1 mM de KCN para inhibir la actividad de los complejos I y IV respectivamente. Posteriormente se agregó 1.5 mg de citocromo *c* oxidado como aceptor de electrones y se registró la absorbancia basal durante 1 min. La reducción del citocromo *c* se estimuló mediante la adición de 10 mM de succinato de sodio y después de 2 min, se inhibió esta reacción con 5  $\mu\text{g}$  de antimicina A para discriminar la reducción inespecífica del citocromo *c*. Los cambios de absorbancia del citocromo *c* se determinaron a 550 nm. La velocidad de reducción de citocromo *c* se calculó a partir de las pendientes de los trazos espectrofotométricos usando el coeficiente de extinción molar de  $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el citocromo *c*. La reducción del citocromo *c* sensible a antimicina A se calculó sustrayendo la actividad en presencia antimicina A más succinato a la actividad estimulada únicamente con succinato (44).

#### 5.7.4 Citocromo c oxidasa (Complejo IV)

La actividad del complejo IV se determinó evaluando la oxidación del citocromo c reducido sensible a KCN, un inhibidor competitivo de este complejo. Se incubó por 5 min. 0.1 mg/ml de mitocondrias con 10  $\mu$ g de rotenona y 1  $\mu$ g de antimicina A para inhibir el flujo de electrones de los complejos I al III en un volumen de 1ml de buffer de fosfato (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.6). Al término de la incubación, se agregó 1.5 mg de citocromo c previamente reducido con unos granos de ditionita de sodio y los cambios en la absorbancia debido a la actividad citocromo c oxidasa se monitoreo durante 10-15 segundos a una longitud de onda de 550nm. Posteriormente, la reacción se detuvo mediante la adición de 1mM de KCN. La velocidad de oxidación del citocromo c reducido se calculó a partir de las pendientes de los trazos espectrofotométricos usando el coeficiente de extinción molar de 21  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  para el citocromo c. La actividad citocromo c oxidasa se calculó sustrayendo la actividad en presencia de KCN a la actividad estimulada con citocromo c reducido en ausencia de KCN (44).

#### 5.8 Medición del potencial de membrana mitocondrial

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) se utilizó el método modificado de Komary y colaboradores (45), utilizando un espectrofluorómetro Shimadzu

RF-5301pc.

Se resuspendió 0.5 mg/ml de mitocondrias en medio para oximetrías (ver anexo 3)) y se agregó 2  $\mu$ M de safranina ( $\lambda_{\text{ex}} = 495 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 586 \text{ nm}$ ) en una celda de cuarzo con agitación constante. La determinación se inició midiendo la fluorescencia basal, 30 segundos después se agregó el sustrato respiratorio (glutamato/malato, succinato + rotenona o glutamato/malato + succinato) y se registraron los cambios de la fluorescencia por 1 min. Posteriormente, se adicionó 15  $\mu$ M del desacoplante CCCP (carbonilcianuro p-triclorofenilhidrazona) y se continuó el registro por 3 min. Los resultados se expresaron como el cambio en la fluorescencia durante la fase de polarización (inducida por la adición de los sustratos respiratorios) restando la fluorescencia basal a la fluorescencia obtenida después de la adición de succinato, mientras que en la fase de despolarización (después de la adición del desacoplante), el cambio en la fluorescencia se determinó restando la fluorescencia obtenida después de la adición del desacoplante a la fluorescencia previa a esta adición.

## 5.9 Evaluación del estrés oxidativo mitocondrial

El estrés oxidativo se evaluó espectrofotométricamente en suspensiones de mitocondrias aisladas de riñón midiendo la formación mitocondrial de ERO y el cociente glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSG).

### 5.9.1 Producción de especies reactivas de oxígeno

Esta determinación se realizó evaluando la oxidación de la sonda fluorescente 2´7´-dicloro-dihidro-fluoresceína (DCDHF) por las ERO. En una celda de cuarzo, se añadió 0.5 mg/ml de mitocondrias y 500 mM de diacetato de DCDHF en un volumen final de 2 ml de medio 2 (220 mM manitol, 70 mM sacarosa y 2 mM MOPS, a pH 7.4) Esta mezcla se incubó con agitación constante por 20 min, en baño de hielo. Posteriormente, la fluorescencia basal se registró durante 1 min a una  $\lambda_{ex} = 491$  nm y una  $\lambda_{em} = 518$  nm en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-5301pc. Después, se agregó el sustrato respiratorio (10 mM de glutamato/malato o 10  $\mu$ g de Rotenona + 10mM de succinato) y se evaluaron los cambios en la fluorescencia durante 10 min adicionales. Para evaluar la contribución de los diferentes segmentos de la CTE a la producción de ERO, se agregó 5  $\mu$ g de antimicina A y se continuó la lectura por 2 min.; posteriormente, se adicionó 1mM KCN, y se registró de nuevo el incremento de fluorescencia durante 2 minutos adicionales. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias de fluorescencia (36).

### 5.9.2 Determinación de glutatión (GSH/GSSG)

Para determinar el cociente GSH/GSSG se utilizó una concentración de proteína mitocondrial de 0.3 mg/ml, se agregó ácido sulfosalicílico dihidratado  $\geq 99\%$  para retirar la

proteína de las muestras , las cuales se sometieron posteriormente a una serie de congelaciones/descongelaciones a  $-80^{\circ}\text{C}$  mezclando las soluciones con un agitador vórtex después de cada descongelación. A continuación, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm a  $25^{\circ}\text{C}$ : 5 min después, se tomaron 90  $\mu\text{l}$  del sobrenadante y se colocó 3 Mm de 5,5'ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) y se agregó 400  $\mu\text{l}$  de buffer de ensayo (80.2 ml de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 M, 19.8 ml de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 M, EDTA 0.1 M y aforar a 1 Lt.), posteriormente se incubó por 5 min y se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de NADPH 2 Mm y 23  $\mu\text{l}$  de la enzima glutatión reductasa (0.115 u/ml), para finalmente obtener la lectura de absorbencia a 412 nm en espectrofotómetro durante 5 min y se determinó el glutatión total con la pendiente obtenida. Por otra parte, a sobrenadantes de las mismas muestras obtenidas por separado, se les agregó 2.7  $\mu\text{l}$  de 4-vinilpiridina [3%] y se dejó incubar por 1 h. Posterior a la incubación se agregaron 400  $\mu\text{l}$  de buffer de ensayo ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1M y EDTA 0.1M) y 250  $\mu\text{l}$  de DTNB 3 mM y se incubaron por 5 min. Una vez terminada la incubación, se agregaron 2mM de NADPH y 23  $\mu\text{l}$  de glutatión reductasa (0.115u/ml) para reducir el GSSG. La fracción de GSH se calculó restando la concentración de GSSG a la concentración de GSH total. Para los cálculos de concentración de GSH se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de GSH (46).

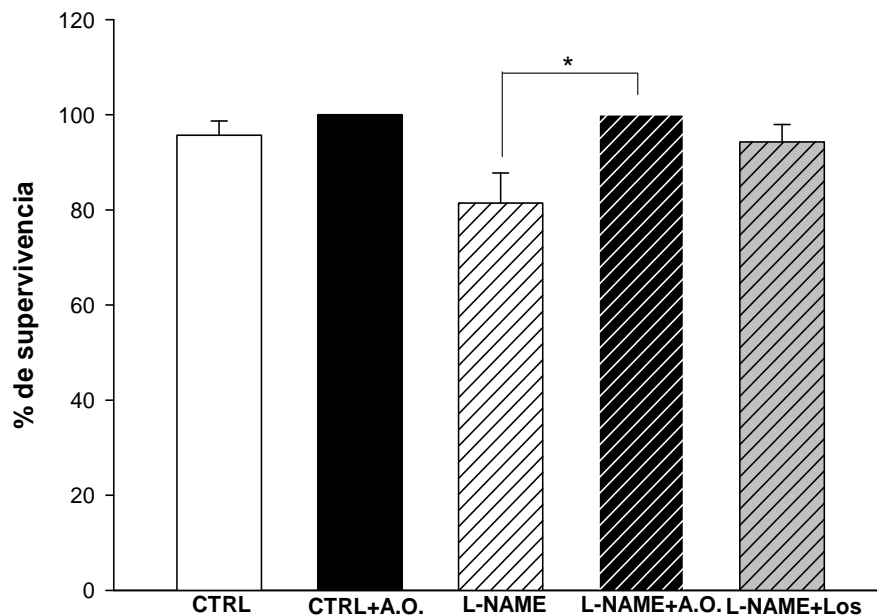
## 5.10 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media  $\pm$  el error estándar de al menos 3 experimentos independientes. La significancia estadística de las diferencias entre las medias ( $P < 0.05$ ) se determinaron mediante la prueba *t* de Student con el programa Sigma Plot versión 11.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Supervivencia de los diferentes grupos experimentales al término de los tratamientos

En la Figura 4 se muestra el porcentaje de ratas que sobrevivieron al término de los tratamientos por 45 días, donde se observa un descenso en la supervivencia del 20% en las ratas del grupo L-NAME, mientras que el tratamiento con A.O. previno la mortalidad obteniendo un 100% de supervivencia tanto en el grupo L-NAME como en el grupo control. En contraste, el tratamiento con losartán previno en un 95% la mortalidad. Estos resultados sugieren que el estado físico de las ratas tratadas con L-NAME no es óptimo, lo que da lugar a una mayor mortalidad y que la administración del A.O. podría prevenir dicho efecto al menos durante el tiempo experimental probado.

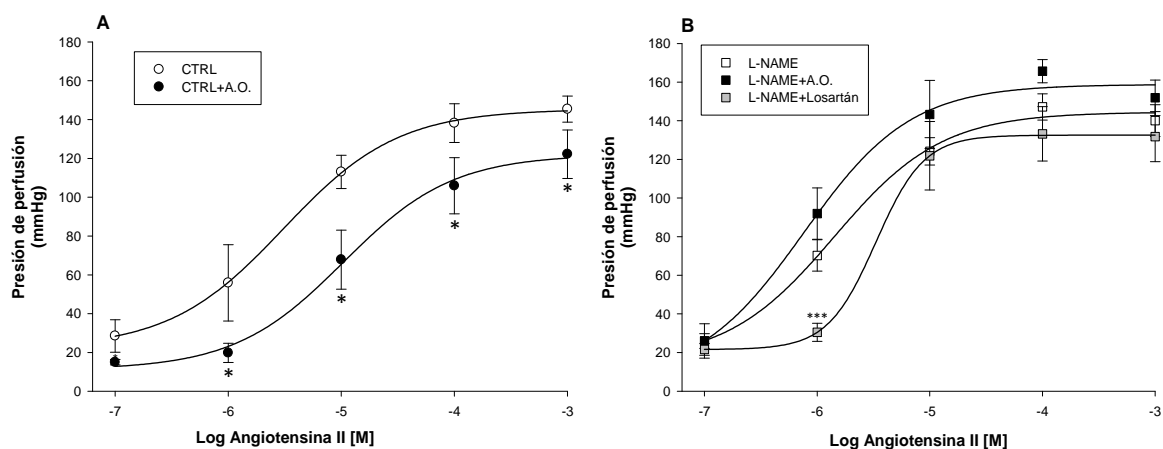


**Figura 4.- Efecto del A.O. en la supervivencia de las ratas al término de los tratamientos por 45 días.** Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de  $n \geq 36$  \*  $p < 0.05$  vs L-NAME, t de Student.

### 6.2 Efecto del aceite del A.O. sobre la reactividad vascular renal a la Ang II en ratas tratadas con L-NAME

Se realizaron curvas dosis-respuesta con concentraciones crecientes de Ang II para determinar si la administración del A.O. modifica las respuestas contráctiles a Ang II en el riñón aislado de rata (Figura 5). En primer término, se puede observar que el tratamiento con A.O. disminuyó la respuesta contráctil a la Ang II en las ratas del grupo CTRL (panel A). Por ejemplo; a una concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M de Ang II, se observó en los riñones de las

ratas CTRL una presión de perfusión de 115 mm de Hg y de 60 mm de Hg en el grupo CTRL+AO, lo que significa una disminución de casi el doble ( $\approx 60$  mm de Hg) en la respuesta a Ang II. Por otra parte los riñones de las ratas del grupo L-NAME (panel B), presentaron hipersensibilidad a la Ang II al tener una mayor presión de perfusión (70 mm de Hg en L-NAME vs 50 mm de Hg en CTRL) a la concentración más baja de Ang II ( $1 \times 10^{-6}$  M), lo cual es característico en modelos de estudio de HTA donde se realizan infusiones con Ang II (47). La administración de A.O. no modificó los efectos de la Ang II en el grupo L-NAME, mientras que en las ratas tratadas con el antihipertensivo losartán se observó un efecto desensibilizador al disminuir la presión de perfusión 45 mm de Hg en respuesta a la Ang II aunque únicamente a la concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M, una vez superada esta concentración las curvas mostraron el mismo comportamiento.

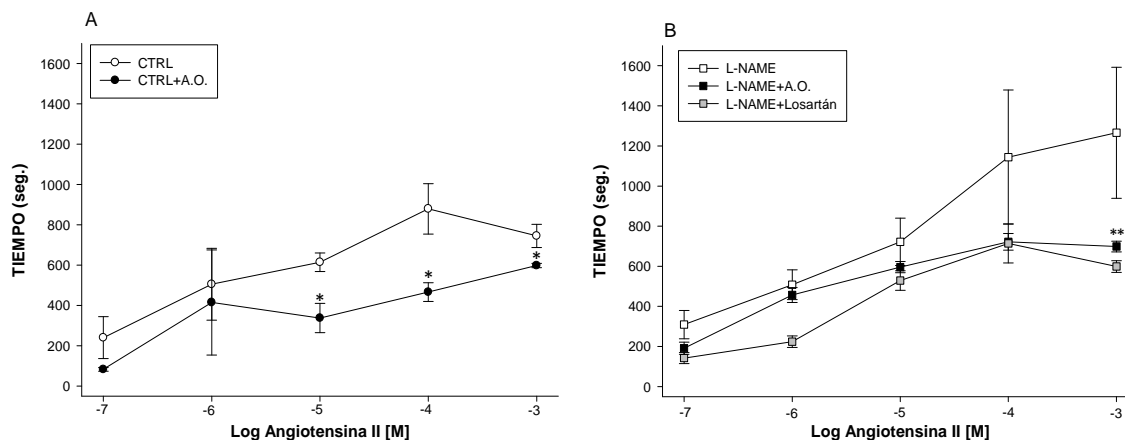


**Figura 5.- Efecto del aceite de aguacate sobre la reactividad vascular frente a concentraciones crecientes de Ang II.** Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de  $n > 4$ . \*  $p < 0.05$  vs CTRL, t Student. \*\*\*  $p < 0.001$  vs L-NAME, t Student.

Cuando se realizaron las curvas dosis-respuesta a Ang II se observó que el tiempo que tardó en regresar la presión de perfusión a sus valores basales, fue mayor en los riñones del grupo L-NAME que en los riñones del grupo CTRL (ejemplo: concentración de Ang II de  $1 \times 10^{-4}$  M, en grupo L-NAME 1390 seg vs grupo CTRL 850 seg), lo que sugiere que la capacidad de la vasculatura renal para relajarse después de la contracción por Ang II también disminuyó. Con el objetivo de determinar la probabilidad de que el A.O. tiene efectos benéficos en la relajación de la vasculatura renal en ratas tratadas con L-NAME, se decidió cuantificar el tiempo promedio que tardó la vasculatura renal en regresar a su valor de presión de perfusión basal después del estímulo con concentraciones crecientes de Ang II. En la figura 6 se muestra que los riñones de ratas CTRL + A.O. (panel A), tardan la mitad del tiempo ( $\sim 300$  seg) en regresar a su presión de perfusión basal a partir de la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M de Ang II, en comparación con los riñones de las ratas CTRL, cuyo tiempo para regresar a su presión de perfusión basal fue de 600 seg. Esto se puede interpretar como que en las ratas CTRL, el A.O. también tiene un efecto positivo al aumentar la capacidad de los vasos sanguíneos renales de relajarse.

Por otra parte, en los riñones de las ratas tratadas con L-NAME (Figura 6, panel B), los tratamientos tanto de A.O. como losartán redujeron también el tiempo que tardaron los riñones en regresar a su presión de perfusión basal a la mitad, siendo de 600 seg en los grupos A.O. y losartán, mientras que en los riñones de las ratas tratadas con L-NAME fue de 1200 seg a la dosis de  $1 \times 10^{-4}$  M. Estos resultados muestran de una manera indirecta los

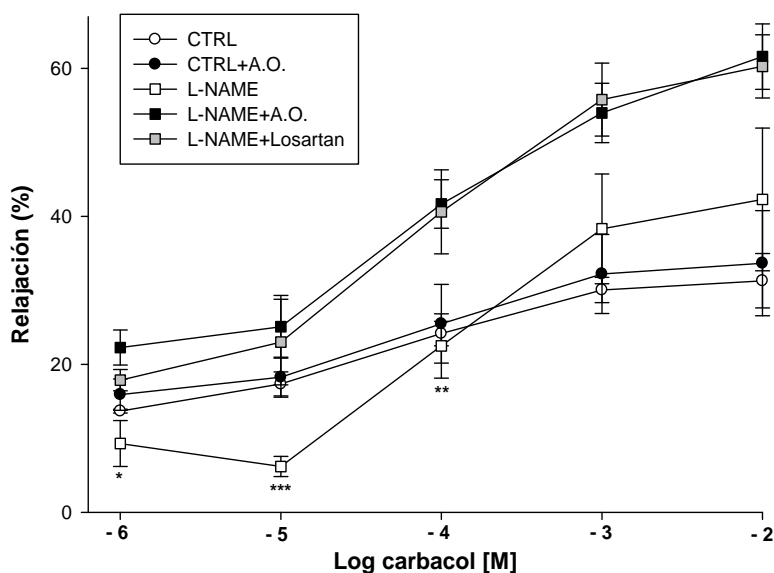
efectos benéficos del A.O. sobre la vasorrelajación renal de las ratas tratadas con L-NAME.



**Figura 6.- Efecto del aceite de aguacate en el tiempo de recuperación de la presión de perfusión basal, con concentraciones crecientes de Ang II** Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de  $n > 4$ . \*  $p < 0.05$  vs CTRL, t Student. \*\*\*  $p < 0.001$  vs L-NAME, t Student.

Para corroborar que el A.O. tuvo un efecto benéfico en la capacidad de la vasculatura renal para relajarse, se realizaron curvas dosis-respuesta a carbacol, un agonista de los receptores muscarínicos en riñones cuya vasculatura se relajó previamente con AngII. En la figura 7 se muestran las curvas con una infusión constante de Ang II de  $1 \times 10^{-6}$  M, y concentraciones crecientes de carbacol, de  $1 \times 10^{-6}$  M hasta  $1 \times 10^{-2}$  M. Entre los riñones de las ratas CTRL y CTRL + A.O. se observó un comportamiento similar en el porcentaje de relajación, mientras que los riñones de las ratas tratadas con L-NAME mostraron una menor capacidad de relajación. Por ejemplo en la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M de carbacol se obtiene una relajación de tan solo el 5%; una vez que se superó esta concentración de carbacol, se observó una relajación similar a los riñones de los grupos de

las ratas CTRL. De manera notable, la vasorrelajación en los riñones de las ratas tratadas con L-NAME + A.O. y L-NAME + losartán fue mayor que en las ratas del grupo L-NAME. Por ejemplo, a la concentración de  $1 \times 10^{-5}$  M de carbacol, el porcentaje de relajación en los riñones de las ratas del grupo L-NAME fue de solo 5%, mientras que los tratamientos con losartán y A.O. incrementaron la vasorrelajación hasta un 22% en ratas tratadas con L-NAME.



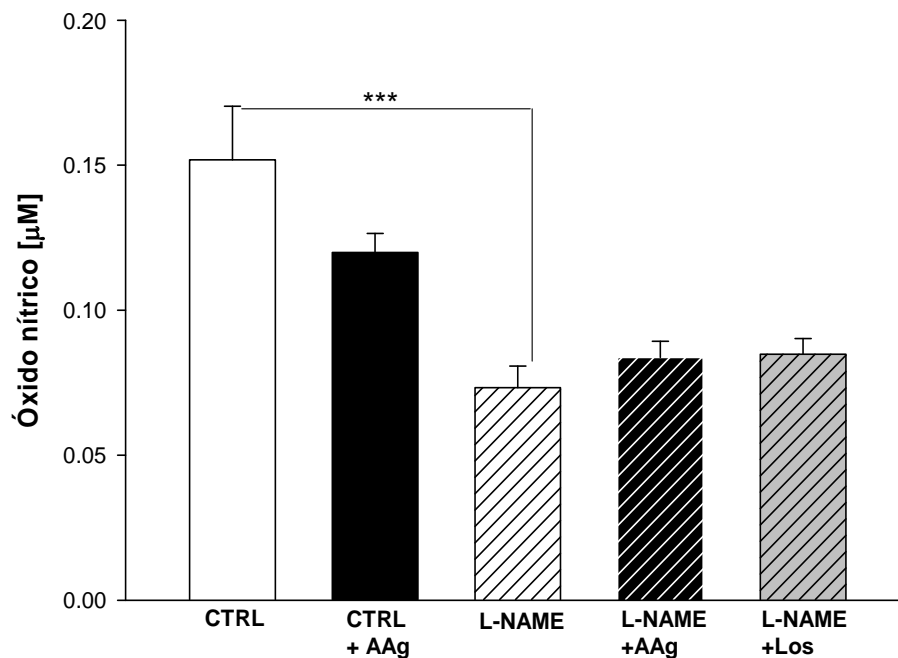
**Figura 7.- Efecto del aceite de aguacate en la capacidad de vasorrelajación renal con carbacol.** Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de  $n > 4$ . \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs L-NAME, t Student.

Los resultados de los grupos L-NAME tratados con A.O. y el losartán en el incremento en la capacidad de relajación de los vasos, indican que se podría deber a un efecto benéfico de estos tratamientos sobre la síntesis de NO, ya que la activación

colinérgica en los vasos sanguíneos produce vasorrelajación de una manera dependiente de la síntesis de NO (48).

### **6.3 Efecto del aceite de aguacate sobre las concentraciones séricas de NO**

Se midieron las concentraciones de NO en suero de las ratas al cabo de los tratamientos por 45 días por el método ya descrito en materiales y métodos, obteniendo un descenso del 50 % de NO en todos los grupos tratados con L-NAME (Figura 8), lo cual ya era de esperarse, ya que la sal L-NAME es un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, disminuyendo con esto la síntesis de NO (38). Por otra parte los tratamientos tanto de A.O. y losartán en los grupos L-NAME no fueron capaces de prevenir el descenso en la concentraciones de NO séricos (0.08  $\mu$ M de NO).



**Figura 8.- Efecto del aceite de aguacate en las concentraciones de óxido nítrico.** Se determinó la concentración de NO en suero de ratas al término de los tratamientos. Los resultados se representan como la media  $\pm$  el error estándar de  $n > 4$ . \*\*\*  $p < 0.001$  vs CTRL, t Student.

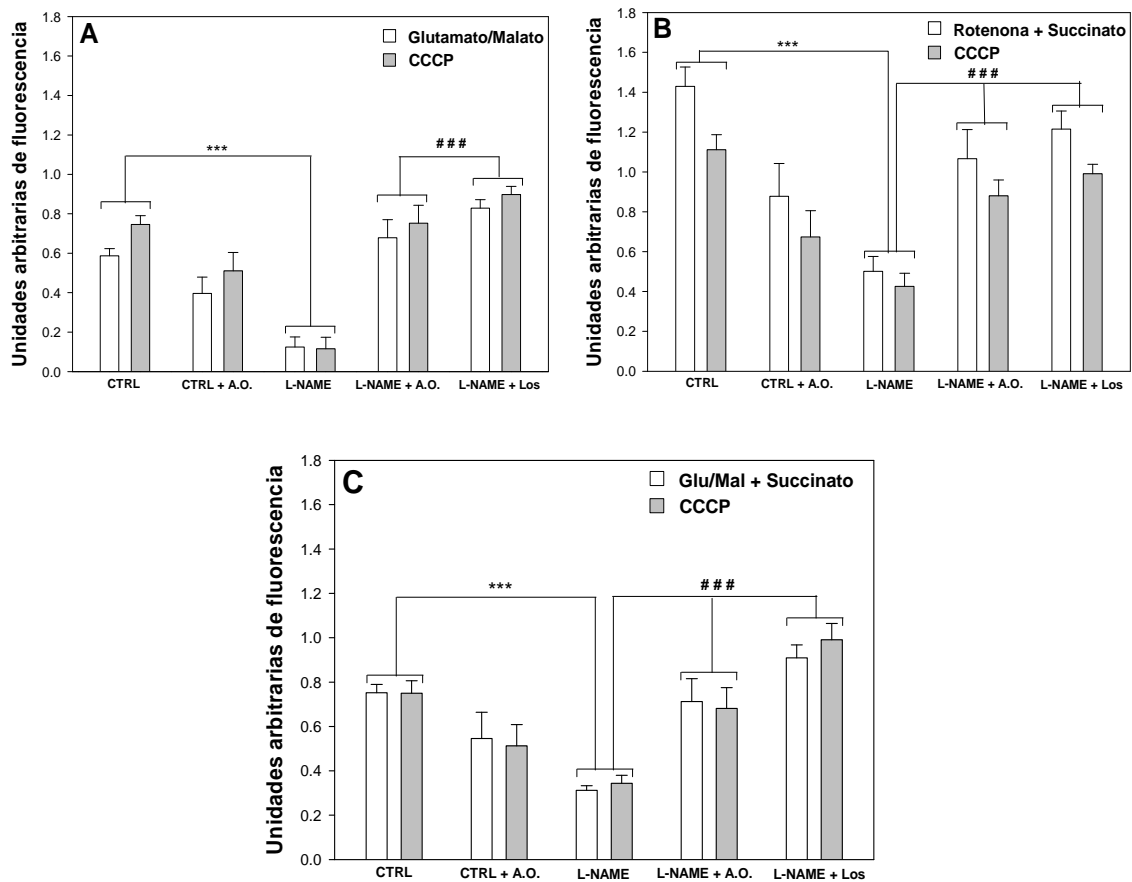
#### 6.4 Efecto del aceite de aguacate en la funcionalidad mitocondrial renal de ratas tratadas con L-NAME

##### 6.4.1 Influencia del aceite de aguacate sobre los efectos del L-NAME en el potencial de membrana mitocondrial

En virtud de que la disfunción mitocondrial se encuentra relacionada con alteraciones en la función vascular debido al aumento en el estrés oxidativo (15), se

determinó el efecto del A.O. sobre el  $\Delta\psi$  mitocondrial (el cual es un reflejo de la funcionalidad mitocondrial) de las ratas tratadas con L-NAME y se compararon sus efectos con el losartán.

En la figura 9, se utilizan sustratos distintos para la mitocondria alimentándola a partir del complejo I con glutamato/malato (Figura 9, panel A), a partir del complejo II utilizando un inhibidor del complejo I (rotenona) y sustrato para el complejo II (succinato) (Figura 9, panel B) y utilizando sustratos para los complejos I y II (glutamato/malato y succinato) para establecer lo que sucede de manera fisiológica (Figura 9, panel C). Se observa que el grupo CTRL tuvo 0.4 unidades arbitrarias de fluorescencia de  $\Delta\psi$  mayor que el grupo CTRL + A.O., siendo esto no significativo estadísticamente, independientemente del sustrato mitocondrial usado, no obstante que si se observó una tendencia a que disminuyera el  $\Delta\psi$  en las ratas CTRL + A.O. En contraste, las mitocondrias de riñones de ratas tratadas con L-NAME presentaron una reducción del potencial de membrana de más del 50% en comparación con las mitocondrias del grupo CTRL. De manera notable, el tratamiento con A.O o losartán previno totalmente el abatimiento del  $\Delta\psi$  observado con el L-NAME utilizando cualquier sustrato respiratorio. Por lo tanto, estos datos sugieren que el aumento en la contractilidad renal a la Ang II en ratas con L-NAME podría estar asociado a la pérdida de la funcionalidad mitocondrial y que las respuestas vasculares a dicha hormona fueron mejoradas en dichas ratas por el A.O. y el losartán debido a un mejoramiento de la función mitocondrial.

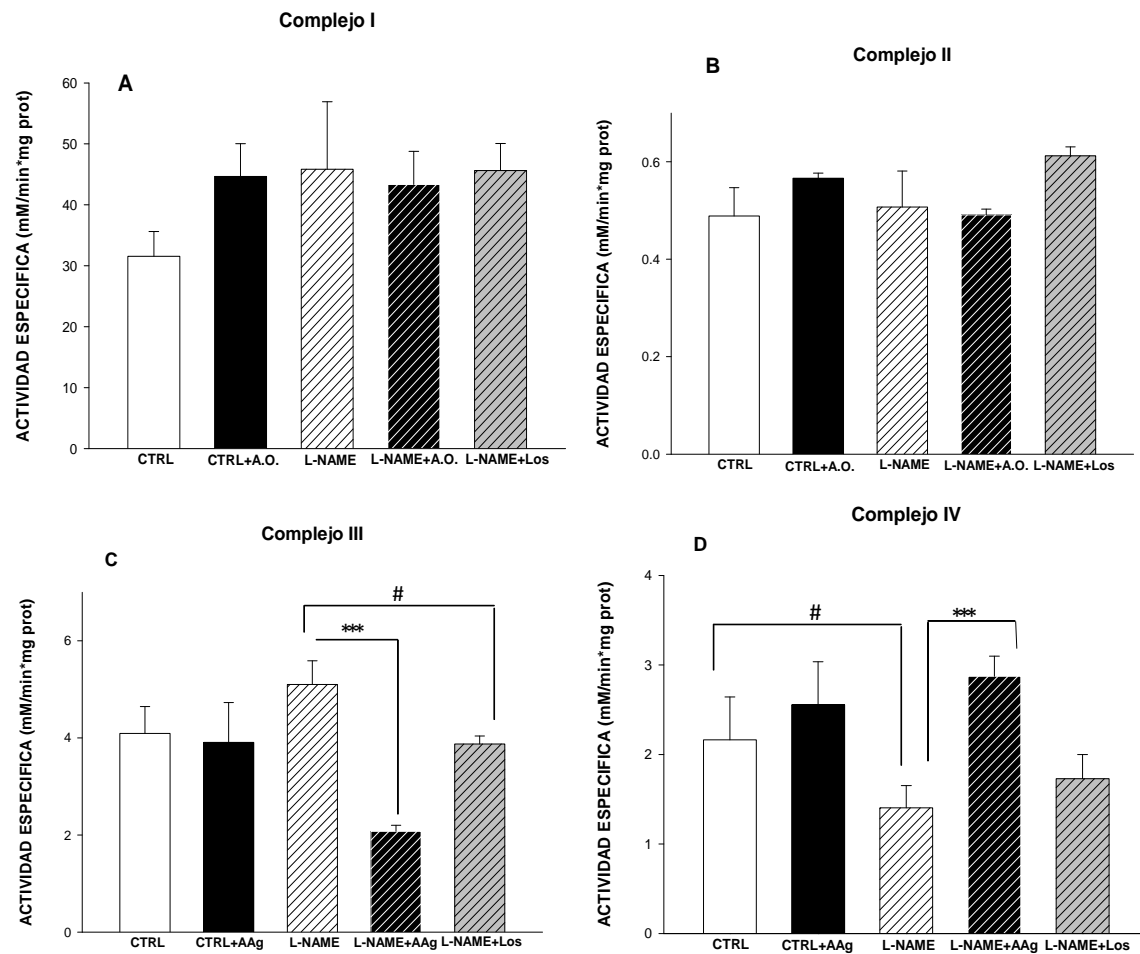


**Figura 9.- Efecto del aceite de aguacate en el potencial de membrana mitocondrial.** En las barras se representa la magnitud de la fase de polarización del  $\Delta\psi$  en respuesta a la energización con un sustrato respiratorio. En las barras gris se representa la fase de despolarización del  $\Delta\psi$  al agregar el protonóforo CCCP. Los datos se muestran como la media  $\pm$  el error estándar de  $n > 3$ . \*\*\* y ###  $p < 0.001$  vs L-NAME, *t Student*.

#### **6.4.2 Efecto del aceite de aguacate frente a la actividad de los complejos de la CTE**

Los resultados del potencial de membrana mitocondrial indican que la disfunción mitocondrial que produce el L-NAME es debido al daño en alguno de los componentes de la CTE. Para identificar cual segmento de la CTE fue inhibido por el L-NAME y si este defecto es prevenido por el aceite de aguacate y el losartán, se determinó la actividad de cada uno de los complejos de la CTE.

Primero describe resultados con valores En la figura 10 se observa que no existen diferencias entre los diferentes grupos experimentales respecto a las actividades de los complejos I y II (Figura 10 panel A y B respectivamente). En el caso del complejo III (Figura 10, panel C), esta actividad aumentó en un 25 % con el tratamiento con L-NAME; en contraste, el tratamiento con A.O. inhibió en un 60 % esta actividad. El L-NAME inhibió la actividad del complejo IV en casi un 50 % respecto al grupo CTRL y este efecto fue prevenido totalmente con el A.O. pero no el losartán (Figura 10, panel D). En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con L-NAME altera el flujo de electrones en la CTE a nivel del complejo IV. No obstante que el A.O. inhibió el flujo de electrones a nivel del complejo III en ratas con L-NAME, es probable que la prevención de la inhibición del complejo IV por este tratamiento impida que la inhibición del complejo III abata el  $\Delta\psi$ , por lo cual se puede sugerir que el complejo IV controla el flujo a través de la CTE bajo las condiciones experimentales usadas.



**Figura 10.-** Efecto del aceite de aguacate en la actividad de los complejos de la CTE. Los datos se representan como la media  $\pm$  el error estándar de  $n > 3$ . #  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs L-NAME, *t Student*.

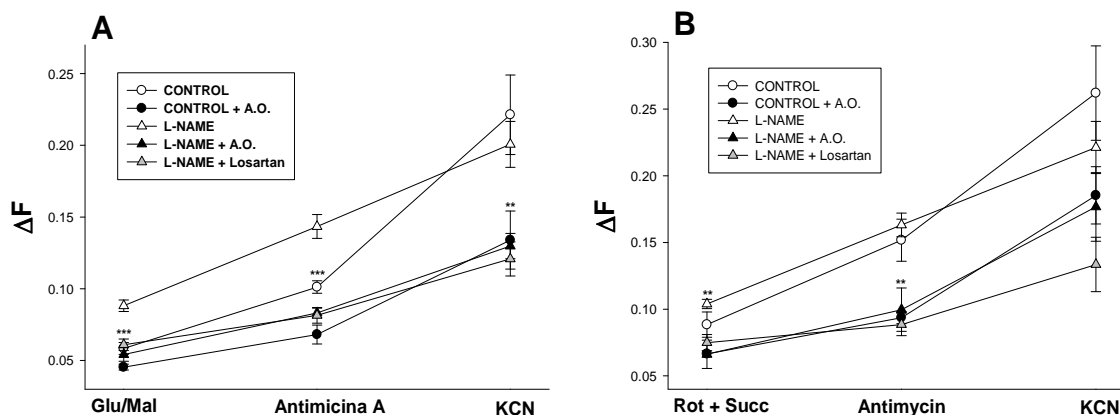
## **6.5 Influencia del aceite de aguacate sobre los efectos del L-NAME en el estrés oxidativo de mitocondrias de riñón de rata**

### **6.5.1 Efecto del aceite de aguacate sobre la generación mitocondrial de ERO**

Se determinó la producción de ERO en mitocondrias aisladas de riñón con el objetivo de determinar si los efectos benéficos del aceite de aguacate en la vasorrelajación renal mejorada en ratas tratadas con L-NAME y el mejoramiento en la función mitocondrial están relacionados con una disminución en la formación de ERO en la CTE.

En la figura 11 se muestran los resultados de este experimento. En las ratas del grupo CTRL, se observa que la producción de ERO usando glutamato-malato (Figura 11, panel A), un sustrato del complejo I, aumenta el 30% cuando el complejo III se inhibió con antimicina A, mientras que este parámetro aumentó hasta 4 veces cuando se inhibió el complejo IV con KCN. Esto corrobora la idea de que el complejo IV controla el flujo a través de la CTE y por lo tanto, la formación de ERO debido a la fuga de electrones en un sitio previo a este complejo. Por otro lado, se observó que el grupo L-NAME produjo la mayor cantidad de ERO en presencia de glutamato-malato y con la adición de antimicina A. El grupo CTRL presentó niveles similares de ERO al grupo L-NAME cuando se adicionó KCN, mientras que la producción de ERO en ambos grupos fue similar cuando se utilizó succinato como sustrato respiratorio. Respecto a los tratamientos con el A.O. y losartán

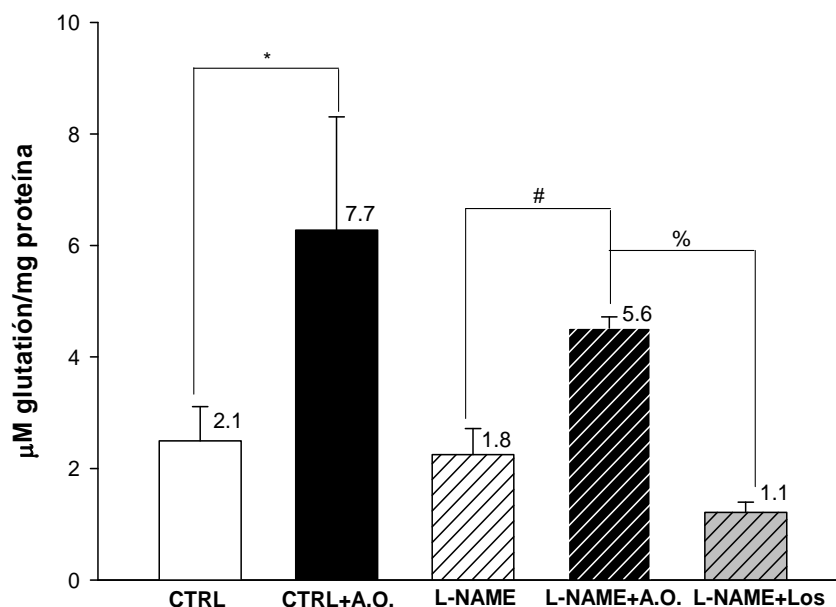
en ratas tratadas con L-NAME, se observó una disminución de más de la mitad en la formación de ERO respecto a las mitocondrias de las ratas del grupo L-NAME, principalmente usando glutamato-malato como sustrato respiratorio (panel B). En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición del complejo IV por el tratamiento con el L-NAME causa un bloqueo tal en el transporte de electrones que da lugar a una fuga de electrones principalmente en el complejo I de la CTE y formación excesiva de ERO y que los efectos de disminución de la formación de ERO producidos por el A.O. podrían estar relacionados con la prevención en la inhibición del complejo IV, lo cual mejoraría el flujo de electrones a través de toda la CTE, una menor fuga de electrones en el complejo I y menor producción de ERO.



**Figura 11.- Efecto del aceite de aguacate en la producción de ERO en mitocondrias de riñón de ratas tratadas con L-NAME.** Panel A con glutamato/malato, panel B con rotenona y succinato. Cada valor representa la media  $\pm$  el error estándar de  $n > 3$ . \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs L-NAME, *t Student*.

### 6.5.2 Efecto del aceite de aguacate sobre la concentración de glutatión GSH/GSSG

Se determinó el cociente GSH/GSSG (Figura 12) en riñones de ratas como un parámetro que refleja el estado redox mitocondrial en general. De manera inesperada, el tratamiento con L-NAME no alteró el cociente GSH/GSSG. Sin embargo, A.O. indujo un aumento del más del doble (6.1  $\mu\text{M}$  en CTRL y 4.7  $\mu\text{M}$  en L-NAME + A.O.) en dicho cociente tanto en las ratas control como en aquellas tratadas con L-NAME. Por lo tanto, es probable que este aumento en la proporción de GSH prevenga el daño sobre la CTE y el flujo de electrones de las ratas L-NAME al aumentar la capacidad de remoción de ERO a nivel mitocondrial.



**Figura 12.- Efecto del aceite de aguacate en el cociente GSH/GSSG en mitocondrias de riñón de ratas tratadas por 45 días con L-NAME.** Los datos se representan como la media  $\pm$  el error estándar de  $n > 3$ . \*, #, %  $p < 0.05$ , vs CTRL vs L-NAME vs L-NAME+A.O., t Student.

## 7. DISCUSIÓN

Se ha descrito que la HTA aumenta la generación de ERO, responsable del desarrollo de las complicaciones propias de esta enfermedad y también se ha observado que el estrés oxidativo se presenta debido a diversas alteraciones a nivel mitocondrial como el aumento en la producción de  $O_2^-$  (16) (20). Se ha reportado que un mayor contenido de ácidos grasos monoinsaturados y saturados a nivel mitocondrial aumenta la resistencia al daño provocado por el estrés oxidativo (44). Por lo tanto el ácido oleico contenido en el A.O., podría ejercer efectos benéficos en enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (27), en adición a ejercer efectos benéficos contra el estrés oxidativo debido a su amplio contenido de antioxidantes. Por ello, y con base en los resultados obtenidos en este estudio, se podría proponer la incorporación del A.O. en la dieta ya que podría ayudar a disminuir el estrés oxidativo en la HTA evitando la generación de ERO y retrasando el desarrollo de algunas complicaciones de esta enfermedad relacionadas.

Existen diversos medicamentos antihipertensivos, uno de los principales fármacos usados es el losartán. Este antihipertensivo es un antagonista selectivo de los receptores  $AT_1$  (49). Se sabe que durante la hipertensión hay un incremento en la síntesis de Ang II (50), y ésta al interactuar con los receptores  $AT_1$  se produce un incremento en la vasoconstricción, retención de agua y remodelación vascular. Por lo que este tipo de tratamiento es ampliamente utilizado.

Fue notable que las ratas tratadas con L-NAME presentaran una menor sobrevivencia al término del tratamiento (Figura 4) y que el A.O. previniera este fenómeno a un nivel similar a un anti-hipertensivo como el losartán. Por lo tanto, esto último sugiere que la mayor tasa de muerte en las ratas tratadas con L-NAME podría haber estado relacionada con las alteraciones vasculares propias de la HTA, como lo refleja la reactividad exacerbada de la vasculatura renal a la Ang II. También, la prevención en la disminución de la sobrevivencia en las ratas L-NAME podría estar relacionada con una prevención de parte de las alteraciones vasculares inducidas por la HTA como lo reflejó el mejoramiento de la relajación inducida por carbacol en ratas tratadas con L-NAME y A.O.

Se he demostrado que el aumento sostenido de la presión arterial característico de la HTA puede ser debido en parte a una disminución en las concentraciones de NO debido a un aumento en la actividad del sistema RAA y activación excesiva de los receptores AT<sub>1</sub>, lo cual lleva a un aumento en la producción de ERO a nivel mitocondrial debido a disfunción mitocondrial (20). En concordancia con lo anterior, se observó que las respuestas vasculares a la Ang II tanto en la relajación como en la contracción estuvieron severamente alteradas en las ratas tratadas con L-NAME, las cuales han sido ampliamente aceptadas como un modelo de estudio de la HTA (39). Además, se observó que los riñones de estas ratas presentaron mayor formación mitocondrial de ERO, lo cual fue atribuible a daño en la funcionalidad de la CTE, lo cual concuerda también con lo propuesto en el trabajo anteriormente citado.

Los grupos tratados con L-NAME (Figura 5, panel B) mostraron mayor sensibilidad a la Ang II, y el tratamiento con losartán logró mantener ocupados los receptores AT<sub>1</sub> hasta una concentración de  $1 \times 10^{-6}$  M de Ang II. Cuando fue superada dicha concentración, la Ang II logró desplazar de sus receptores al fármaco antihipertensivo, con ello mostrando un incremento en la presión de perfusión. Aunque los tratamientos con A.O. y losartán no mostraron diferencias significativas en la contracción inducida por Ang II respecto a las ratas con L-NAME, si se presentó una disminución del tiempo en que los vasos regresen a su estado basal (Figura 6, panel B), esto puede indicar de una manera indirecta una mayor eficiencia en la relajación de los vasos. Este efecto benéfico se confirmó con las curvas dosis-respuesta a carbacol, donde se observó que la administración de A.O. y losartán mejoró el porcentaje de relajación de la vasculatura renal (Figura 7). El carbacol es un agonista colinérgico del tipo éster que actúa uniéndose y activando receptores muscarínicos encargados de la relajación que se encuentran situados en el endotelio de los vasos; la ocupación de dichos receptores por un agonista activa la vía del IP<sub>3</sub> de las células endoteliales y con ello activa la sintasa endotelial de NO (6). Por lo tanto, esto permitiría pensar que el aceite de aguacate aumentó los niveles de NO, lo que promovería una mejor vasorrelajación. A este respecto, se observó que el modelo de HTA utilizado en este estudio, que consiste en la inhibición de la óxido nítrico sintasa mediante el análogo de la L-arginina L-NAME, logró disminuir la producción del vasodilatador NO, lo cual concuerda con la reactividad excesiva de los vasos sanguíneos a la Ang II y el menor porcentaje de relajación en ratas tratadas con dicho inhibidor. Sin embargo, los

tratamientos con A.O. y losartán no restablecieron los niveles séricos de NO (Figura 8). Por lo tanto, es posible postular que el A.O. y el losartán solo restablecen los niveles de NO a nivel de la vasculatura renal, lo cual no se refleja en los niveles de NO sistémicos. La otra posibilidad es que el aceite de aguacate aumente la vasorrelajación estimulando la acción de algún otro efector en la ruta de señalización de los receptores muscarínicos que da lugar a la vasorrelajación.

Se ha reportado en estudios previos que la HTA provoca disfunción mitocondrial, lo que aumenta el estrés oxidativo (15). Los resultados del potencial de membrana (Figura 9) y la generación de ERO (Figura 11) obtenidos en el estudio concuerdan con dichos antecedentes, al verse reducido el potencial de membrana a más de la mitad por el tratamiento con L-NAME y mostrando una generación de ERO de casi el doble. Se sabe que existen proteínas desacoplantes en la membrana mitocondrial, las cuales juegan un papel importante en la atenuación de la producción excesiva de superóxido mitocondrial, además aumentan la conductancia de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Tratamientos en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con losartán se ha obtenido que el efecto protector que confiere este fármaco sobre la función mitocondrial puede basarse en un mecanismo que implica a las proteínas desacoplantes, logrando disminuir la generación de ERO y mejorando el  $\Delta\psi$  (51). Los resultados obtenidos con el losartán (Figuras 9 y 11) concuerdan con los antecedentes mencionados anteriormente, y con ello se puede relacionar que tal vez el efecto protector del tratamiento con A.O. puede estar relacionado con un mecanismo que implica a proteínas desacoplantes, al

tener un comportamiento muy similar al losartán en el  $\Delta\psi$  y generación de ERO.

Durante la hipertensión se ha demostrado en varios estudios que existe un incremento en la producción de ERO, se asocia con una elevada producción de anión  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , y además una disminución en la capacidad antioxidante en el sistema (52). Al utilizar sustrato para el complejo I (Figura 11 panel A) se observa una mayor producción de ERO en las ratas de los grupos L-NAME en ausencia de inhibidores y presencia del inhibidor del complejo III (Antimicina A) y únicamente la generación de ERO fue similar de los grupos L-NAME a los grupos CTRL cuando se utilizó sustrato para el complejo II e incluso en presencia de inhibidores, esto quiere decir que el L-NAME induce producción excesiva de ERO a nivel del complejo I debido a la inhibición del complejo IV (Figura 10 panel D). Se tienen antecedentes donde se demuestra que el A.O. tiene un efecto protector en mitocondrias de riñón expuestas a un agente estresante ( $Fe^{2+}$ ) (36), por esto se puede decir que el mecanismo de prevención en la producción de ERO por el A.O. tal vez se deba en el contenido de antioxidantes y ácido oleico (26). La disfunción mitocondrial que produjo el L-NAME posiblemente se debe a un incremento en el estrés oxidativo y los resultados obtenidos en la actividad del complejo III (Figura 10, panel C) muestran un incremento de su actividad acompañado de un descenso de la actividad del complejo IV (Figura 10, panel D), al tener el complejo IV una menor capacidad de transporta electrones hasta su aceptor final ( $O_2$ ), produce una disfunción mitocondrial, que va aunado a la mayor producción de ERO a través del incremento en la actividad del

complejo III (19).

En ratas SHR se muestran una reducción significativa del cociente de GSH/GSSG (53), curiosamente los resultados obtenidos del grupo L-NAME (Figura 12) no mostraron una reducción en comparación con el grupo CTRL, por otra parte el tratamiento con A.O. logró reducir el estrés oxidativo al mantener el glutatión en forma relativamente más reducida, resultado benéfico que el losartán no fue capaz de lograr en el modelo de ratas usados en este estudio.

En el panel A de la figura 13 se muestra como la administración de L-NAME al reducir la actividad de la óxido nítrico sintasa produce disminución en la concentración de NO (Figura 8) (37), incrementando la PA, durante este incremento de PA se ve estimulada la vía de síntesis de Ang II, el cual tiene capacidad vasoconstrictora (2), al administrar L-NAME se produce una mayor reactividad de los vasos y una menor capacidad de regresar a su estado basal (Figuras 8 y 9, paneles B). Esta mayor reactividad de los vasos produce un daño en la mitocondria al reducir el potencial de membrana (Figura 9), provocando una disfunción mitocondrial reduciendo la actividad del complejo IV (Figura 10, panel D), éste daño mitocondrial es reflejo de un incremento en el estrés oxidativo y reducción del cociente GSH/GSSG (Figura 12) al incrementar la generación de ERO (Figura 11), todo esto provocando una mayor reactividad de los vasos frente a la Ang II. Por otra parte en el panel B de la figura 13 se propone como la dieta con A.O. en ratas tratadas con L-NAME proporciona una protección en la mitocondria. La administración de A.O. logra

incrementar la vasorrelajación en los riñones de ratas tratadas con L-NAME (Figura 7), además evita la disfunción mitocondrial al restablecer el potencial de membrana mitocondrial a niveles de las mitocondrias control (Figura 9). Este efecto se relaciona con el incremento en la actividad del complejo IV (Figura 10 panel D), ya que éste es el responsable de acarrear el electrón a su aceptor final ( $O_2$ ), logrando con esto una menor generación de ERO (Figura 11), reflejando un menor estrés oxidativo al presentar un mayor cociente GSH/GSSG (Figura 12). A pesar de que el A.O. no tuvo un efecto a nivel sistémico en concentraciones de NO (Figura 8) queda por investigar si las tiene a nivel local (en el órgano).

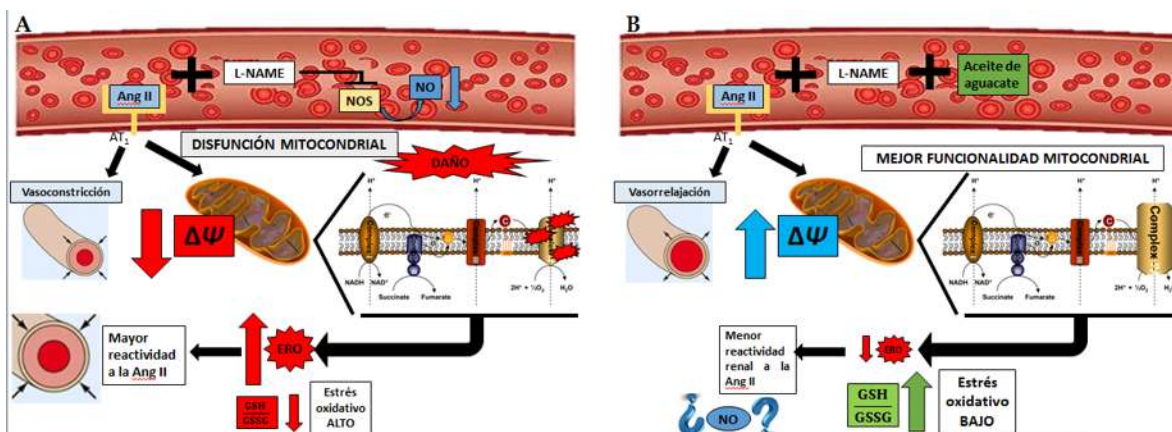


Figura 13.- Modelo hipotético de la protección que proporciona la dieta con aceite de aguacate en riñones de ratas tratadas con L-NAME.

## 8.- CONCLUSIÓN

El aceite de aguacate mejora la reactividad renal en ratas tratadas con L-NAME y vasoconstricción inducida por la adición de Ang II, al favorecer la funcionalidad mitocondrial reduciendo el estrés oxidativo.

## 9.- PERSPECTIVAS

- a) Determinar las concentraciones de NO en el riñón de las ratas tratadas con aceite de aguacate
- b) Determinar SOD1 y SOD2
- c) Elucidar el mecanismo mediante el cual el A.O. protege del daño por el estrés oxidativo durante la HTA y mejora la vasorrelajación renal.
- d) Analizar el efecto del aceite de aguacate sobre el número de mitocondrias en riñones de ratas con hipertensión arterial.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

1. **Norma-Oficial-Mexicana.** -030-SSA2-2009. *Para la prevención, tratamiento y control de la hipertensión arterial.* México : s.n., 2009.
2. **Guyton, Arthur C. y Hall, Johon E.** *Tratado de Fisiología médica.* España : ELSEVIER, 2011.
3. *Endothelial Dysfunction.* **Endemann, Dierk H. y Schiffrin, Ernesto L.** 2004, Journal of the American Society of Nephrology, págs. 15: 1983–1992.
4. *The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure.* **Chobanian, Aram V., y otros, y otros.** Diciembre de 2003, JAMA, págs. 2560-2572.
5. *Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial.* **Maicas Bellido, C., y otros, y otros.** 2003, Monocardio, págs. 141-160.
6. **Goodman, Louis S. y Gilman, Alfred .** *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* México : McGraw-Hill, 2006.
7. *Angiotensin II, cell proliferation and angiogenesis regulator: biologic and therapeutic implications in cancer.* **Escobar, E., y otros, y otros.** 2004, Curr Vasc Pharmacol, págs. 2(4): 385-399.
8. *Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalin and function.* **Kaschina, E. y Ungent, T.** 2003, Blood Press, págs. 12: 70-88.
9. *Achievements and controversies in their research in renal disease and hypertension.* **Heidland, A., y otros, y otros.** 2001, J Human Hypertens, págs. 15: 5-16.
10. *Hypertensive nephropathy. Is essential hypertension an important cause for chronic renal failure?* **Romero, R. y Bonet, J.** 2001, Medi Clin, págs. 117: 536-538.
11. *Oxidative stress and hypertension.* **Harrison, D. G., y otros, y otros.** 2007, Journal of American Society of Hypertension, págs. 30-44.
12. *Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance?* **Touyz, R. M.** 2004, Hypertension, págs. 44: 248-252.
13. *Renal Oxidative stress, oxygenation, and hypertension.* **Palm, F. y Nordquist, L.** 2011, the American Physiological Society, págs. 301: R1229-R1241.
14. *Molecular Mechanism of Angiotensin II-Mediated Mitochondrial Dysfunction: Linking Mitochondrial Oxidative Damage and Vascular Endothelial Dysfunction.* **Doughan, A. K., Harrison, D. G. y Dikalov, S. I.** 2007, Circ Res, págs. 102: 488-496.
15. *The Putative Role of Mitochondrial Dysfunction in Hypertension.* **Puddu, P., y otros, y otros.** 2007, Clinical and Experimental Hypertension, págs. 29: 427-434.
16. *Mitochondrial injury and dysfunction in hypertension-induced cardiac damage.* **Eirin, A.,**

**Lerman, A. y Lerman, L. O.** 2014, *European Heart Journal*, pág. 35:.

17. **Mathews, C. K. y Holde, K. E.** *Bioquímica*. Oregon : Mc Graw Hill, 2000.

18. *Bioquímica*. [En línea] [Citado el: 28 de Julio de 2015.] <http://www.bioquimicaqui11601.ucv.cl/unidades/cte/traselectfofox21fid.html>.

19. *Sites of reactive oxygen species generation by mitochondria oxidizing different substrates*. **Quinlan, C. L., y otros, y otros.** 2013, *Redox Biology*, págs. 304-312.

20. *Therapeutic Targeting of Mitochondrial Superoxide in Hypertension*. **Dikalova, A. E., y otros, y otros.** 2010, *Circ Res*, págs. 107: 106-116.

21. *Importance of Oxidative Damage on the Electron Transport Chain for the Rational Use of Mitochondria-Targeted Antioxidants*. **Cortés-Rojo, C. y Rodríguez-Orozco, A. R.** 2011, *Medicinal Chemistry*, págs. 1-8.

22. *Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial*. **Sesso, H. D., y otros, y otros.** 2008, *JAMA*, págs. 300: 2123-2133.

23. *Oxygen radicals, a failure or a success of evolution?* **Barja, G.** 1993, *Free Radic Res Commun*, págs. 18(2): 63-70.

24. *Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism*. **Laurindo, F. R., y otros, y otros.** 1994, *Circ Res*, págs. 74(4): 700-709.

25. *Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo*. **Smith, R. A. J., y otros, y otros.** 2003, *Proc Natl Acad Sci USA*, págs. 100(9): 5407-5412.

26. *Efectos médicos del aguacate*. **Alvizouri, M. y Rodríguez, A.** 2009, *Med Int Mex*, págs. 25(5): 379-385.

27. *Oleic acid content is responsible for the reduction in blood pressure induced by olive oil*. **Terés, S., y otros, y otros.** 2008, *PNAS*, págs. 13811-13816.

28. **Stephen, B. y Faloon, W.** *Life Extension Magazine*. [En línea] 2005. [Citado el: 2 de Julio de 2015.] [http://www.lef.org/magazine/2005/6/report\\_prostate/Page-01](http://www.lef.org/magazine/2005/6/report_prostate/Page-01).

29. **Steven, D.** *Universidad de Maryland Medical Center*. [En línea] 2015. [Citado el: 3 de Julio de 2015.] <http://umm.edu/health/medical/altmed/condition/hypercholesterolemia>.

30. *Pigments in avocado tissue and oil*. **Ashton, O. B., y otros, y otros.** 2006, *J Agric Food Chem*, págs. 27;54(26)10151-10158.

31. *Chemopreventive characteristics of avocado fruit*. **Ding, H., y otros, y otros.** 2007, *Seminars in cancer biology*, págs. 17(5): 386-397.

32. *Aliphatic acetogenin constituents of avocado fruits inhibit human oral cancer cell proliferation by targeting the EGFR/RAS/RAF/MEK/ERK1/2 pathway*. **D'Ambrosio, S. M., y otros, y otros.** 2011,

Biochem Biophys Res Commun, págs. 10;409(3): 465-469.

33. *Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances.* **Lu, Q. Y., y otros, y otros.** 2005, J Nutr Biochem, págs. 16(1): 23-30.

34. *Avocado oil.* **Woolf, A., y otros, y otros.** 2008, Gourmet and health-promoting specialty oils, págs. 73-125.

35. *Stability of avocado oil during heating: comparative study to olive oil.* **Berasategi, I., y otros, y otros.** 2012, Food Chemistry, págs. 132: 439-446.

36. *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.* **Ortiz-Avila, O., y otros, y otros.** 2013, J. Bioenerg Biomembr, págs. DOI 10.1007/s10863-013-9502-3.

37. *L-NAME Hypertension Alters Endothelial and Smooth Muscle Function in Rat Aorta.* **Küing, C. F., y otros, y otros.** 1955, Hypertension, pág. 26:744.

38. *Selective Inhibition of Constitutive Nitric Oxide Synthase by L-p-Nitroarginine.* **Furfin, E. S., y otros, y otros.** 1993, Biochemistry, págs. 32:8512-8517.

39. *Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage.* **Baylis, C., Mitruka, B. y Deng, A.** 1992, J. Clin Invest., págs. 90(1): 278-281.

40. *Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine.* **de Cavanagh, E. M., y otros, y otros.** 2006, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, págs. 290(6):R1616-25.

41. *Chronic Nitric Oxide Inhibition Model Six Years On.* **Zatz, R. y Baylis, C.** 1998, Hypertension, págs. 32(6): 958-964.

42. *Effect of extra and intramitochondrial calcium on citrulline synthesis.* **Saavedra-Molina, A. y Devlin, T. M.** 1977, Amino Acids, págs. 12, 293-298.

43. *Loss of mitochondrial hsp60 function: nonequivalent effects on matrix-targeted and intermembrane-targeted proteins.* **Hallberg, E. M., Shu, Y. y Hallberg, R. L.** 1993, Mol Cell Biol, págs. 13(5):3050-3057.

44. *Elucidation of the effects of lipoperoxidation on the mitochondrial electron transport chain using yeast mitochondria with manipulated fatty acid content.* **Cortés-Rojo, C., y otros, y otros.** 2009, J. Bioenerg Biomembr., págs. 41(1):15-28.

45. *Membrane potential-related effect of calcium on reactive oxygen species generation in isolated brain mitochondria.* **Komary, Z., Tretter, L. y Adam-Vizi, V.** 2010, Biochimica et Biophysica Acta, págs. 922-928.

46. *Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples.* **Åkerboom, T. P. y Siess, H.** 1981, Meth Enzymol, págs. 77: 373-382.

47. *The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease*. **Kobori, H., y otros, y otros**. 2007, Pharmacol, págs. 59:251-287.
48. **Chabner, B. y Knollman, B.** *Goodman y Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. España : Mc Graw Hill, 2012.
49. *Angiotensin II Pressor Response in the L-NAME-Induced Hypertension Pithed Rat: Role of the AT1 Receptor*. **Figuroa-Guillén, E. S., y otros, y otros**. 2009, Proc. West. Pharmacol. Soc., págs. 52:54-56.
50. *The renin-angiotensin system in different stages of spontaneously hypertension in the rat (SHR)*. **Ruiz, P., y otros, y otros**. 1990, Clin. Exp. Hypertension, págs. 12:63-81.
51. *Renal mitochondrial dysfunction in spontaneously hypertensive rats is attenuated by losartan but not by amlodipine*. **de Cavanagh, E. M., y otros, y otros**. 2006, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, págs. 290(6):R1616-R1625.
52. **Vibha, R. y Umesh Chand, S. Y.** *Free Radicals in Human Health and disease*. s.l. : Springer, 2015.
53. *Effect of gamma-tocotrienol on blood pressure, lipid peroxidation and total antioxidant status in spontaneously hypertensive rats (SHR)*. **Newas, M. A. y Nawal, N. N.** 1999, Clin Exp Hypertens, págs. 21: 1297-1313.
54. *Blood pressure and end-stage renal disease in men*. **Klag, M. J., y otros, y otros**. 1996, The New England Journal of Medicine, págs. 334: 13-18.
55. *La hipertensión arterial como causa de enfermedad renal crónica mediante estudios de protocolos de necropsia*. **Vázquez Vigoa, A., y otros, y otros**. 2009, Clin Invest Arterioscl, págs. 21(1): 17-22.
56. **Martines, M., Rodicio, J. L. y Herrera, J.** *Tratado de nefrología*. España : NORMA, S. L., 1993.
57. **OMS.** Organización Mundial de la Salud. *Información general sobre la hipertensión en el mundo*. [En línea] 2013. [Citado el: 03 de Febrero de 2015.] [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).
58. **ENSANUT.** *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. 2012.
59. **Aceite Ahuacatlán.** Un producto de Diricom, S. A. de C. V. [En línea] 2015. [Citado el: 2 de Julio de 2015.] <http://www.ahuacatlan.com.mx/beneficios.html>.

## 11.- ANEXOS

### Anexo 1

Compuestos para preparación de solución de Krebs-Henseleit.

COMPUESTO	PESO (g/L)
NaCl	6.09
Glucosa	1.05
NaHCO <sub>3</sub>	2.1
KCl	0.35
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.29
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.37
Ca·EDTA·Na	0.01

### Anexo 2

Compuestos para preparación de medio hipotónico para 500 ml. Ajustar pH a 7.5 con HCl

COMPUESTO	PESO (gr)
KCl	3.728
MgCl <sub>2</sub>	0.5083
TRIS base	0.6054

### Anexo 3

Compuestos para preparar medio para oximetrías de mitocondrias de riñón. Para 100 ml, ajustar pH a 7.4

COMPUESTO	CANTIDAD (gr)
Hepes	0.238
KCl	0.745
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.0408
$\text{MgCl}_2$	0.0609

### 13.- ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Nombre de figura	Página
<b>Figura 1</b>	Complejos de la cadena de transporte de electrones y la $F_1F_0$ ATP sintasa.	10
<b>Figura 2</b>	Estructura de un antioxidante mitocondria-dirigido.	13
<b>Figura 3</b>	Mecanismo de acción del mitoTEMPO.	14
<b>Figura 4</b>	Efecto del aceite de aguacate en la supervivencia al término de los tratamientos por 45 días.	33
<b>Figura 5</b>	Efecto del aceite de aguacate sobre la reactividad vascular frente a concentraciones crecientes de Ang II.	34
<b>Figura 6</b>	Efecto del aceite de aguacate en el tiempo de recuperación de la presión de perfusión basal, con concentraciones crecientes de Ang II.	36
<b>Figura 7</b>	Efecto del aceite de aguacate en la capacidad de vasorrelajación renal con carbacol.	37
<b>Figura 8</b>	Efecto del aceite de aguacate en las concentraciones de óxido nítrico.	39
<b>Figura 9</b>	Efecto del aceite de aguacate en el potencial de membrana mitocondrial.	41
<b>Figura 10</b>	Efecto del aceite de aguacate en la actividad de los complejos de la CTE.	43
<b>Figura 11</b>	Efecto del aceite de aguacate en la producción de ERO en mitocondrias de riñón de ratas tratadas con L-NAME.	45
<b>Figura 12</b>	Efecto del aceite de aguacate en el cociente GSH/GSSG en mitocondrias de riñón de ratas tratadas por 45 días con L-NAME.	46
<b>Figura 13</b>	Modelo hipotético de la protección que proporciona la dieta con aceite de aguacate en riñones de ratas tratadas con L-NAME.	53