UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTIN

FACULTAD DE MEDICINA

"EFECTO DE CARICA PUBESCENS (PAPAYA AREQUIPEÑA) SOBRE LA DISFUNCION ENDOTELIAL EN ANILLOS AORTICOS DE RATAS"

Tesis presentado por el Bachiller:

NESTOR JESUS CONDO GONZA

Para optar el Titulo Profesional de:

Medico Cirujano

Asesor:

DR AZAEL PAZ ALIAGA
(jefe del departamento de ciencias fisiológicas)

AREQUIPA – PERU
2013

Resumen:

La disfunción endotelial se considera en la actualidad una de las primeras manifestaciones de múltiples enfermedades, tanto metabólicas, cardiovasculares, degenerativas, colagenopatías , en donde se evidencia una disminución de los agentes vasodilatadores, anticoagulantes y antiproliferativos., estos daños se deben a procesos de oxidación que puede sufrir el endotelio, en la búsqueda de antioxidantes naturales. Se tomo en el presente trabajo a la papaya arequipeña, debido a que en su concentración presenta tanto vitamina C , E y beta carotenos .

El presente trabajo de investigación tuvo como principal objetivo :
Determinar el poder antioxidantes de la Carica Pubescens (papaya arequipeña) sobre la disfunción endotelial observada en anillos aórticos.

Para el procedimiento experimental del presente trabajo , hemos empleado anillos aórticos de ratas albinas , las cuales fueron sometidos a una concentración hipertónica de glucosa por espacio de dos y cuatro horas respectivamente .
Posteriormente , se sometió a dichos anillos a un vasoconstrictor como es el cloruro de potasio (KCL) ,para luego medir el porcentaje de vasoconstricción . Luego se sometieron los anillos a un vasorelajante como es la acetilcolina , en dosis ascendentes 10^{-7} , 10^{-6}, 10^{-5}, M , las cuales fueron medidas en porcentaje .
Se incubaron a un grupo de anillos oxidados a un antioxidante natural como es la Vitamina E llamado grupo patrón , se evaluó el porcentaje de vasodilatación . Se tomo otro grupo de anillos oxidados las cuales fueron incubados en papaya arequipeña, evaluando su poder vasodilatador , llamado grupo experimental. Seguidamente se comparo dichos grupos .

Dentro de los hallazgos encontramos:
Los anillos que fueron sometidos a un medio hipertónico de glucosa por espacio de 2 y 4 horas, pierde la capacidad vasorelajante , observado a través del porcentaje de vasodilatación 75.3%, 60.2% respectivamente.
Los anillos oxidados al incubarlos en medios antioxidantes, tanto la papaya arequipeña, como la vitamina E ; mejoran la propiedad vasodilatadora expresadas en

porcentajes: 78.9% , 87.6% respectivamente , no existiendo una diferencia significativa de ambos grupos .

El medio hipertónico de glucosa origina a su vez radicales libres, estos dañan la función endotelial, a través de la combinación de radicales superoxido con el NO disminuyendo su concentración y por ende su propiedad vasodilatadora .

La presencia de vitamina C , vitamina E y beta carotenos en la papaya arequipeña lo convierten en un antioxidante natural , mejorando la destrucción de radicales libres que pudieran lesionar el endotelio .

Summary

Endothelial dysfunction is now considered one of the first manifestations of multiple diseases, both metabolic, cardiovascular, degenerative, collagen, which evidenced a decrease of vasodilators, anticoagulants and antiproliferative. this damage is due to oxidation processes can suffer the endothelium, the natural antioxidants search volume to arequipeña papaya, because its concentration has both vitamin C and E and beta carotene.

The present research had as its main objective: To determine the antioxidant power of Carica pubescens (papaya Arequipa) on endothelial dysfunction observed in aortic rings.

For the experimental procedure of the present work, employment albino rat aortic rings, which was subjected to a hypertonic glucose concentration for two and four hours respectively.

Subsequently underwent a vasoconstrictor such rings as potassium chloride (KCl), and then measure the percentage of vasoconstriction. The rings were then subjected to a vasorelaxant as acetylcholine, in ascending doses 10-7, 10^{-6}, 10^{-5} M, which were measured in percentage.

Incubated at a group of rusty rings a natural antioxidant like vitamin E called pattern group, assessed the percentage of vasodilation. It took another group of rusty rings which were incubated in (papaya arequipeña), evaluating their power vasodilator called experimental group. These groups were then compared.

Among the findings are:

The rings were subjected to a glucose hypertonic medium for 2 to 4 hours, it loses the ability vasorelaxant, observed through vasodilation percentage of 75.3%, 60.2% respectively.

The rings oxidized upon incubation in antioxidants means both papaya Arequipa, like vitamin E, improves the vasodilator expressed in percentages: 78.9%, 87.6% respectively, with no significant difference in both groups.

The medium hypertonic glucose turn causes free radical damage these endothelial function, through the combination of NO with superoxide radicals decreasing its concentration and thus its vasodilator effect.

The presence of vitamin C, vitamin E and beta-carotene in papaya arequipeña it a natural antioxidant, improving the destruction of free radicals which could damage the endothelium .

INDICE

Pág.

RESUMEN……..……..……..

SUMMARY…….……

CAPITULO I: INTRODUCCIÓN..... 1

CAPITULO II: MARCO TEÓRICO..... 6

1. Papaya Arequipeña *(Carica Pubescens)*

1.1.Descripción botánica……..... 6

1.2.Clasificacion taxonómica…...……. 7

1.3 .Distribución geográfica..…….……..……..……..... 8

1.4.Composicion Química.…….…….……..……..... 9

1.5.Propiedades curativas…….…….……... 10

1.6. Usos y aplicaciones...…….…….……..…..... 10

2. Vasodilatación

2.1. Endotelio Vascular……. 12

2.2. Prostaciclina……... 14

2.3.Factor hiperpolarizante del endotelio……. 14

2.4. Oxido nítrico……..... 15

2.5. Acetilcolina…… 17

3. Disfunción endotelial. ……..... 18

4. Radicales Libres

4.1 Concepto…….. 19

4.2. Funciones……... 20

4.3. Clasificación……... 21

4.4..Clases de radicales libres…… 21

4.5.Estres oxidativo …….. 22

5. Antioxidantes

5.1 Concepto……..…….…….…… 24

5.2 Clases de antioxidantes

5.2.1Sistemas enzimáticos…….…..... 25
5.2.2Agentes antioxidantes no enzimáticos..... 25
5.2.3.Agentes secuestradores de metales de transición…..……. 27
5.3 Determinación de radicales libres
5.3.1Métodos directos …..……. 27
5.3.2.Métodos indirectos……..…… 27

CAPÍTULO III: MATERIAL Y MÉTODOS
1 .Tipo de Estudio……..... 30
2 .Unidad de estudio
2.1 Muestra biológica……..... 30
2.2 Características muestra en estudio
2.2.1 Criterios de inclusión…….. 30
2.2.2 Criterios de Exclusión……. 30
2.3 Distribución de las unidades experimentales…….. 30
3 .Técnicas e instrumentos
3.1. Etapa pre experimental…… 32
3.2 Etapa estandarización……..……. 32
3.3 Etapa experimental…… 32
4 .Planeamiento operacional
4.1 Metodologia……. …….....…. 33
4.1.2 Determinación de la respuesta vascular……..... 33
5 .Material
5.1 Material Biológico..... 34
5.2 Material laboratorio…..... 34
6 Campo de investigación
6.1. Ambito geográfico……..……..… 35
6.2.Unidades de estudio……..……..... 35
6.3 Estrategia de recolección de datos……..……..... 35
6.4 Diseño estadístico……..…. 35
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN……..... 37
CAPITULO V: CONCLUSIONES……..…….. 52
CAPITULO VI: RECOMENDACIONES…..... 53

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 54

ANEXOS..... 59

RESUMEN

La Diabetes Mellitus constituye una de las enfermedades metabólicas mas frecuentes en nuestra sociedad , dadas las complicaciones que esta llevase a un paciente.

La Diabetes Mellitus (DM) es un desorden metabólico de múltiples etiologías, caracterizado por hiperglucemia crónica con disturbios en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas y que resulta de defectos en la secreción y/o en la acción de la insulina .

Es una enfermedad crónica que requiere cuidado médico contínuo y automanejo por parte del paciente para prevenir complicaciones agudas y reducir las mismas a largo plazo (ADA 2009).

Es una de las patologías que genera mayor discapacidad, especialmente en los adultos y adultos mayores, ocupando gran parte de los recursos sanitarios de todos los países. Sus complicaciones crónicas, particularmente las cardiovasculares representan la mayor causa de mortalidad en estos pacientes.

Se trata de una entidad nosológica que ha sufrido constantes cambios en lo que refiere a su diagnóstico, clasificación, objetivos terapéuticos y tratamiento.

Los radicales libre juegan un rol importantes en la patogenia de la diabetes mellitus , estos daños pueden verse reflejados, tan lípidos , carbohidratos , proteínas .

El consumo de azucares de manera crónica pueden llevar a alteraciones en el endotelio vascular .

Frente a esta problemática , que hemos evidenciado, se propone el siguiente estudio observacional que busca comparar el poder antioxidante de la papaya arequipeña con antioxidantes naturales como es la vitamina C y vitamina E.

CAPITULO I

INTRODUCCION

1. PLANTEAMIENTO TEÓRICO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

En el año 1954 la doctora Rebeca Gerschman sugirió que los radicales libres eran agentes tóxicos y generadores de patologías, y estableció en este trabajo 3 postulados básicos:

1. Los radicales libres constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales de experimentación son sometidos a altas presiones de oxígeno y a radiaciones ionizantes.
2. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes produce efectos tóxicos.
3. La producción de radicales libres es un fenómeno continuo con implicaciones en el envejecimiento y la carcinogénesis.

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para la generación de energía liberan radicales libres, lo que es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos de defensa contra estas especies. Esta defensa se realiza a través de los antioxidantes y se considera como tal a cualquier sustancia que en concentraciones normales, posee una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interacciones con un radical libre (Ferreira R. El sistema de defensas antioxidantes. Monografía. Estrés oxidativo y antioxidante. Buenos Aires, Argentina. 1995).

De hecho se puede definir como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable (biomoléculas), retarda o previene la oxidación de este sustrato. El antioxidante al colisionar con el radical libre le cede un electrón, se debilita su acción y en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. No todos los

antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan a su vez reacciones con los radicales libres.

El estrés oxidativo ha sido involucrado en diversas enfermedades como el cáncer, las enfermedades degenerativas neurológicas enfermedad de Parkinson, demencia de Alzheimer, la diabetes, el reumatismo, enfermedades cardiovasculares como el infarto miocárdico y cerebral, etc. En esta lista se debe agregar el envejecimiento normal y patológico, lo que demuestra la importancia clínica que el estrés oxidativo tiene para una amplia gama de patologías de muy alta prevalencia.

1.2. ENUNCIADO DEL PROBLEMA

¿La administración de *Carica pubescens* (papaya arequipeña), posee capacidad antioxidante capaz de mejorar la disfunción endotelial presente en anillos aórticos con estrés oxidativo inducido por hiperglicemia experimental aguda?

1.3. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Por lo general los procesos peroxidativos desempeñan un papel importante en la patogénesis de varias enfermedades, como los procesos neurodegenerativos, el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y daño hepático, e incluso en procesos naturales como el envejecimiento.

Quizás el efecto tóxico más estudiado es la oxidación de los ácidos grasos insaturados en las membranas biológicas, proceso que conduce a la formación y propagación de radicales lipídicos, así como al reordenamiento de dobles enlaces en lípidos insaturados, todo lo que termina en la destrucción de los lípidos de las membranas y la formación de productos como el malondialdehído (MDA). De esta manera, los compuestos antioxidantes utilizados como aditivos alimentarios o como suplementos farmacéuticos, pueden neutralizar el efecto dañino de los radicales libres en las células del organismo antes de que causen la oxidación de las biomoléculas y, por tanto, pudieran ayudar a la prevención de muchas de estas enfermedades asociadas a las especies reactivas del oxígeno (ERO).

Estudios recientes, han demostrado la importancia de los antioxidantes sintéticos en la medicina e industria alimentaria, ya sea en la inhibición o el retardo de la oxidación de biomoléculas; sin embargo, a pesar de su eficacia y bajo costo, en algunos de estos compuestos se ha observado actividad carcinogénica y otros efectos tóxicos, lo que ha incitado a la búsqueda de nuevas fuentes de antioxidantes naturales para su reemplazo.

Partiendo de estos elementos, el aceite Sacha Inchi se presenta como un excelente candidato, porque en su constitución no solo está presente el omega 3 sino ha desarrollado fuertes sistemas antioxidantes en respuesta a las condiciones altamente oxidativas de la planta.

Los radicales libres en especial los EROs pueden atacar directamente los lípidos de las membranas o iniciar un proceso autocatalítico más dañino: la peroxidación lipídica, afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, ya que altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular y se manifiesta por la presencia de radicales libres en plasma y demás tejidos.

Es por ello, que en el presente trabajo me propuse analizar la información científica actualizada acerca de las potencialidades de la *Carica pubescens* (papaya arequipeña) como fuente natural de compuestos antioxidantes, capaz de mejorar la disfunción endotelial, observado en anillos aórticos de rata albinas .

1.4. INTERROGANTES DE INVESTIGACIÓN

- ¿Será posible que la *Carica pubescens* (papaya arequipeña) posea capacidad antioxidante?
- ¿Será posible que la *Carica pubescens* (papaya arequipeña) disminuya la disfunción endotelial observada en anillos aórticos aislados preincubados en una solución hiperglicemiante?

1.5. JUSTIFICACIÓN

Lamentablemente no existen muchos estudios científicos que permitan darle un valor agregado a este fruto como lo sería el estudio de su actividad antioxidante frente a los

radicales libres que como sabemos, la presencia de ellos constituye el primer paso de un sin número de enfermedades desde diabetes, hipercolesterolemia, cardiopatías, cáncer y enfermedades degenerativas como el Parkinson y Alzheimer.

Por todos estos antecedentes me veo en la necesidad de realizar este estudio mediante ensayos biológicos "in vitro" tendientes a proponer alternativas en la terapia antioxidante y en especial sobre el estrés oxidativo motivo del presente trabajo.

2. HIPOTESIS

La *Carica pubescens* (papaya arequipeña) presenta un efecto antioxidante, disminuyendo la disfunción endotelial , observada en anillos aórticos sometidos a concentraciones hipertónicas de glucosa .

3.-OBJETIVOS

GENERAL

Determinar el efecto antioxidante de *Carica pubescens* (papaya arequipeña) sobre la disfunción endotelial observada en anillos aórticos oxidados de rata.

ESPECÍFICOS

1. Desarrollar disfunción endotelial en anillos aórticos aislados de ratas normales mediante su incubación por 4 horas en un medio hiperglicémico (45mM de glucosa).

2. Determinar el grado de disfunción endotelial de anillos aislados aórticos hiperglicémicos, mediante la comparación de su respuesta vasodilatadora a la acetilcolina versus la respuesta patrón al mismo agente.

3. Determinar el efecto de la incubación de anillos aórticos disfuncionantes en *Carica pubescens* (papaya arequipeña) mediante la observación de su respuesta vasodilatadora a la acetilcolina.

4. Comparar el efecto antioxidante de la *Carica pubescens* (papaya arequipeña) versus el efecto antioxidante de la vitamina E.

CAPITULO II

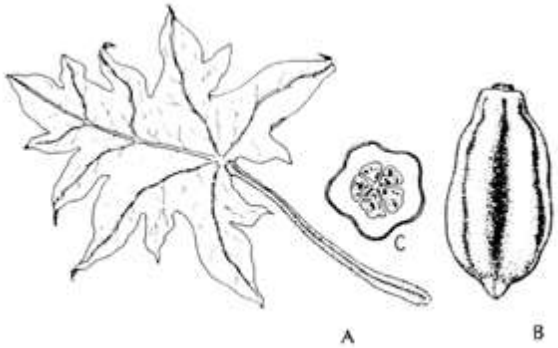
MARCO TEORICO

1.-PAPAYA AREQUIPEÑA *(CARICA PUBESCENS)*

1.1) DESCRIPCION BOTANICA

Nombres Botánicos: Carica pubescens Linne & Koch, Vasconcellea pubescens A.DC., C. candamarcensis Hook, C. cundinamarcensis J. Linden. [1,4]

Nombres Comunes: chilhuacán, chiglacón, chamburu (Ecuador), chamburu, huanarpu hembra (Perú, Bolivia); castellano: papaya de monte, papaya de la sierra, papaya arequipeña; papaya de altura (Perú, Bolivia), papayuela (Colombia); inglés: mountain papaya. [1,4]



Carica pubescens, requiere de climas templado - cálido. El fruto es una baya, de pericarpio delgado, jugoso, de color amarillo (pulpa y piel), pasando por color verde durante la madurez. El centro es hueco y se encuentra totalmente ocupado por las semillas envueltas en un tejido mucilaginoso; presenta una forma oblongo - ovoide de 5 a 10 centímetros de largo por 3 a 6 centímetros de ancho y tiende a ser ovalada, con los extremos aguzados[4].

Arbusto de 1-2 m, tallo principal poco ramificado, base ancha con cicatrices foliares conspicuas; apariencia de una pequeña palmera. Hojas pecioladas, peciolos de 17-34 cm de longitud; lámina dentalobulada, de contorno pentagonal, de 20-26 cm de longitud y 34-40 cm de ancho. Lóbulo medio con 3-5 lobulillos laterales, oblongo-acuminados. Frutos pequeños, de 10-15 cm, de color amarillo, con cinco lados. La mayoría de las plantas son dioicas. [4,5]

Los frutos maduros son comidos por aves, las que al perforar el mesocarpo provocan la caída de las semillas. Estas tienen gran capacidad de germinación, sin necesidad de

pasar por un período de dormición. Las semillas inician su germinación a los 30 días, habiéndose comprobado un 60% de germinación.[4,5]

Las evaluaciones empíricas indican que las plantas obtenidas por semillas alcanzan su edad de floración entre 10 y 12 meses y el ciclo biológico termina a los cinco años. El crecimiento es lento y la emisión de follaje es continua, pero las hojas inferiores van cayendo. Alcanzada la edad de floración, ésta es continua y simultánea con la emisión de hojas .[4,5]

1.2. CLASIFICACION TAXONOMICA:

Heilborn, citado por Barberán y Bermeo (1985), Poma y López citados en la Memoria del Primer Congreso Nacional de Fruticultura (1990), indica la siguiente clasificación:([4]

- Clase: Dicotiledóneas.
- Subclase: Archí.
- Orden: Parietales.
- Familia: Caricácea.
- Género: Carica.
- Especie: pubescens
- Nombre científico: Carica pubescens L. & Koch

Las Caricáceas son plantas, Arbustivas, de tallo carnoso y entrenudos por lo general cortos, hojas densamente agrupadas hacia sus ápices, flores verdosas, blancas, cremosas, o amarillentas. Fruto con baya generalmente pulposa, ovoide, elipsoide, esférica. Semillas numerosas .[5]

1.3. DISTRIBUCION GEOGRAFICA

En los Andes, a altitudes donde no se puede cultivar *C. papaya*, crecen algunas especies de *Carica* que pueden constituir cultivos promisorios. Entre estas especies está *C. pubescens*, cultivada en huertos familiares desde Colombia hasta Bolivia. Es probable

que esta especie haya sido extraída de los bosques perennifolios andinos y puesta en cultivo en los huertos como planta de adorno y por sus frutos, que en estado maduro se consumen crudos o cocinados. La historia de este frutal andino no es muy conocida, pero es posible que su cultivo sea relativamente reciente, aunque se cultivaba antes de la introducción de *C. papaya* . [4,5]

Este frutal crece en climas templados a subcálidos. En general, las Caricáceas de altura habitan la zona de bosque seco montano bajo. En los Andes, estas zonas se ubican entre los 2 000-3 000 m según la latitud y corresponden a las zonas agroecológicas de jalca y quechua, en el Perú, con precipitaciones anuales entre 500-1 000 mm. Las temperaturas promedio oscilan entre 12 y 18 °C (22 °C en invierno y a mediodía) y el clima es subhúmedo. La especie es sensible a las bajas temperaturas del amanecer y al intenso sol del mediodía en el invierno (mayo-septiembre). Estos extremos de temperatura afectan al follaje y a la maduración normal de los frutos .[4,5]

En el Perú, en los huertos de Urubamba (Cusco) a 2800 y Arequipa a 2700 msnm se han observado plantas mucho más robustas y ramificadas que los biotipos del norte en Cajamarca. Estas características determinan que la producción y el tamaño de los frutos sean mayores, habiéndose contado en una planta adulta hasta 200 frutos .[4]

Carica pubescens, fruta de consumo popular es un alimento de importancia, no solo por sus características sensoriales sino también por las bondades nutricionales que posee, como son los minerales y vitaminas. Es estacional se cultiva mayormente en el sur del Perú, siendo en departamento de Arequipa el principal productor, convirtiéndose en un fruto tradicional se esta región . [5]

1.4. COMPOSICION QUIMICA

Composición físico química

COMPONENTE	**VALOR REPORTADO (g/100 PULPA)**
Humedad	90.49
Proteínas	0.58

Grasa	0.25
Ceniza	0.64
Fibra	1.20
Carbohidratos	4.68
Sólidos Solubles	6.00
Sólidos Insolubles	3.51
Sólidos Totales	9.51
Vitamina C (mg/100g)	31.00
Ácidos reductores	1.78
Acidez titulable	0.37
pH	4.5
Densidad (mg/ml)	1.03
Vitamina E	167
Beta carotenos	0.72

Fuente: Concha, Guevara y Araujo. 2002.

Composición Fitoquímica

Según estudios la Papaya arequipeña (*Carica Pubescens*), dentro de su composición posee vitamina A y compuestos fenólicos que actuarían como antioxidantes.[24,25]

1.5. PROPIEDADES CURATIVAS

La papaya contiene una enzima llamada papaína, la cual ayuda a la digestión de proteínas en el cuerpo. La papaya puede usarse para el tratamiento de la diarrea, alergias, fiebre del heno e indigestión .[24,25]

Dentro de otras propiedades tenemos:

- Protege al cuerpo de la oxidación, por lo tanto previene el cáncer
- Ayuda a regular los niveles de colesterol
- Fomenta la absorción de hierro

- Ayuda a la elaboración y mantenimiento del colágeno, proteína, que es la base para la unión de los tejidos
- Ayuda a aliviar la respiración asmática
- Ayuda a la recuperación rápida por padecimientos de neumonía, mononucleosis, hepatitis y otras infecciones virales

El suministro de papaína reduce significativamente las poblaciones de patógenos facultativos como: *Escherichia coli, Staphylococus albus, Klebsiella pneumoniae y Enterobacter cloaceae*. El bencil isotiocianato es un potente antihelmíntico.[1,4,5]

1.6-USOS Y APLICACIONES

Carica pubescens es aprovechada principalmente por sus frutos, aunque otras partes de la planta tienen importancia medicinal. Los frutos, en estado maduro, se utilizan en la repostería familiar, en la elaboración de mermeladas y bebidas. La fruta verde hervida o cocida al horno puede consumirse como legumbre. En estado verde constituye un recurso para la obtención de látex. Este, por su contenido de papaína, tiene aceptación en el mercado internacional, para uso en la industria farmacológica y como ablandador de carnes. En el área de mayor cultivo (Colombia, Chile y norte de Ecuador) se utilizan los frutos en el tratamiento de la arterioesclerosis . [3,5]

Según el conocimiento popular, el látex se aplica contra la micosis cutánea y la verruga plana; también es utilizado como vermífugo, en el tratamiento de la enteritis de los niños en la época de dentición, contra la diabetes y enfermedades hepáticas. Por su efecto proteolítico actúa sobre las células de la superficie epidérmica y sus patógenos .[25]

Al ganado vacuno que se sacrificará se le inyecta la papaína media hora antes, para suavizar aun más la carne que normalmente es suave; la carne tratada con papaína nunca se debe comer medio cocida, debe ser cocinada suficientemente para inactivar la enzima; la lengua, hígado y riñones de animales inyectados se deben comer rápidamente después de cocinarlos por ser alimentos altamente perecederos. En la industria se utiliza para rasurar las pieles antes de la coloración y sirve como elemento adjunto en el proceso del caucho. Es aplicada en el hígado de los atunes antes de la extracción del

aceite que de esta forma es enriquecido en vitaminas A y D2. Se le encuentra en las pastas de dientes, cosméticos y detergentes, así como en fármacos para auxiliar la digestión.[24,25]

En la India se aplica el látex fresco en el útero como irritante para provocar abortos. La fruta inmadura es algunas veces arriesgadamente ingerida para lograrlo; las semillas también lo pueden causar y la raíz es hecha pasta con sal, diluida con agua y se da como enema para inducirlo. Las raíces se utilizan para hacer sal y un concentrado de éstas sirve para expulsar las lombrices. Las hojas secas se fuman para aliviar el asma o como sustituto del tabaco.[24,25]

En el campo de la medicina científica la papaína se ha utilizado en el tratamiento de úlceras, disolver membranas en la difteria y reduce hinchazones, fiebre y adherencias después de cirugías. De acuerdo con Cobley -1956-, la papaína es utilizada para el tratamiento por deslizamiento de discos en la columna y puede evitar la necesidad de la dolorosa y cara intervención quirúrgica de la espalda. También es utilizada para el bronceado de la piel, evitar el encogimiento de la lana y mantener clara la cerveza durante el proceso de fermentación . [24,25]

Muchos remedios populares se elaboran a partir de la papaya, tanto para humanos como para ganado. Las semillas son comidas como vermífugo y es aparentemente efectivo contra helmintos intestinales excepto la solitaria. En el Sureste de Asia se utiliza la papaya para estimular la producción de leche de las madres y la savia es aplicada en el cuerpo para remover espinas. En la carretera Transamazónica las hojas de papaya tiernas y las frutas dañadas o cocidas con semillas, se dan como alimento al ganado porcino para que engorde y se suavice su carne a la vez de bajar su contenido de grasas. Los indígenas suavizan la carne dura envolviéndola en hojas de papaya y poniéndola a cocer. Las hojas contienen glicósidos, carpósidos y el carpino alcalino. Pétard -1986-, nos indica que en Tahití, se prepara un concentrado de las flores masculinas de papaya, para tratar la bronquitis. Por otra parte Irvine -1961-, señala que los ashanty en Ghana, utilizan la papaya para tratar la gonorrea y el dolor de estómago, y las raíces hechas polvo se comen para aliviar el dolor de cabeza .[24.25]

2. VASODILATACION

2.1..-ENDOTELIO VASCULAR

El Endotelio vascular , es considerado un órgano funcionalmente complejo que regula muchos procesos, entre los mas importantes tenemos: la hemostasia , la fibrinolisis , la inflamación , la presión arterial , el metabolismo de lipoproteínas y la angiogénesis ; de esta manera juega un papel fundamental en la homeostasis del sistema vascular .[28]

Debido a su estratégica ubicación constituye un "sensor" de variaciones en las fuerzas hemodinámicas y de distintas sustancias bioquímicas producidas por las células sanguíneas y otros tejidos, respondiendo a estas con la liberación de sustancias autocrinas y paracrinas. Estas sustancias producen vasodilatación, junto con efecto antiagregante plaquetario y antiproliferativo o vasoconstricción, junto con acción procoagulante y proliferativa. [28]

El endotelio cubre la superficie interna de toda la vasculatura ocupando un área que mide alrededor de 1200 m² . Histológicamente el endotelio es una capa simple de 10-50 (micras) µm de espesor, formada por células poligonales, orientadas longitudinalmente en dirección al flujo sanguíneo, que muestra heterogeneidad estructural.[28,29]

En algunos lechos vasculares las células endoteliales (CE), están apretadamente interconectadas con las adyacentes y están rodeadas por una membrana basal continua (endotelio continuo); en otra forma de endotelio se presentan aberturas u orificios (endotelio agujereado) y en otros casos hay orificios, hendiduras y membrana basal pobremente constituida (endotelio discontinuo). Esto ha llevado a reconocer que hay distintos tipos de CE, diferentes unos de otros, en estructura, y en cierto grado en función. Es así que el endotelio puede ser continuo (con y sin orificios) o discontinuo.

El continuo sin aberturas , se encuentra en arterias, venas, capilares del cerebro, piel, corazón y pulmón. [28,29]

El endotelio con orificios o agujeros, está presente en zonas caracterizadas por filtración incrementada o con mayor transporte transendotelial, como por ejemplo: capilares de glándulas de secreción interna, mucosa gastrointestinal, plexo coroideo, glomérulos y algunos túbulos renales. En las CE se forman invaginaciones ,estas a su vez están formados por zonas ricas en colesterol y esfingolípidos llamadas caveolas, y en su estructura participa la caveolina. Además los orificios o agujeros están tapizados por proteínas (*"coated pits"*) como la clatrina o la caveolina . El plasmalema luminal de las CE posee un glicocálix , cargado negativamente, que tiende: A repeler los neutrófilos , impedir la adherencia, y ser anti-trombogénico; al poseer heparina, antitrombina III y trombomodulín.[28,29]

Las CE poseen además numerosos receptores para distintos componentes vasoactivos, vasodilatadores y vasoconstrictores: acetilcolina, catecolaminas, histamina, serotonina, bradikinina y nucleótidos de adenosina. [13]

Las CE liberan diversas sustancias, tales como el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), la endotelina-1 (ET-1), factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de adhesión.[13]

FISIOLOGIA DEL ENDOTELIO

Entre las funciones más destacables del endotelio vascular tenemos :

1.- Inducción de vasodilatación

2.- Efectos inflamatorios

3.-Inhibe la agregación plaquetaria

4.-Inhibición de la proliferación y migración de células musculares lisas

5.-Efectos anticoagulantes

6.- Efectos profibrinolíticos

Existen múltiples estímulos neurohormonales que al interactuar con receptores endoteliales llevan al aumento del calcio intracelular, y esta ayuda a la formación de prostaciclina, oxido nítrico , factor hiperpolarizante del endotelio , con acción vasodilatadora . [16,18]

2.2 PROSTACICLINA:

Fue la primera sustancia derivada del endotelio, descubierta ; derivada del acido araquidónico , compuesto que se forma a partir de fosfolípidos de membrana por acción de fosfolipasa .
Este ácido araquidónico puede seguir dos vías la lipooxigenasa para la formación de leucotrienos ; o la via ciclooxigenasa para la formación de prostaglandinas .
La PGI2 es el principal producto de la célula endotelial derivado del acido araquidónico este a su vez no solo se sintetiza en el endotelio, sino en las células musculares lisa.[16]

2.3 FACTOR HIPERPOLARIZANTE DEL ENDOTELIO:

Es un metabolito lábil de ácido araquidónico , que puede suplir las funciones del oxido nítrico cuando este se encuentre disminuido
La vasodilatación dependiente de esta sustancia, es predominantemente en los vasos de mayor resistencia y no tanto en las arterias de mayor tamaño donde predomina el NO, aunque en situaciones en que el NO esta disminuido en sus funciones, el factor hiperpolarizante del endotelio puede suplirlo.

2.4 EL OXIDO NITRICO

Es una citoquina autocrina de acción fugaz, interviene como vasodilatador de gran importancia , regulando el tono vascular, contrarestando la vasoconstricción . El NO inhibe la adhesión del endotelio de plaquetas , neutrofilos y monocitos ; actúa sinérgicamente con la prostaciclina ; inhibe el crecimiento de células musculares lisas vasculares , cuando se activa la cascada de la coagulación se produce trombina , si el endotelio esta intacto la trombina causa vasodilatación. [27]

El NO es un gas inorgánico con estructura de radical libre que actúa como mensajero biológico en soluciones fisiológicas, en condiciones líquidas aeróbicas es espontáneamente oxidado a su producto inicial nitrito , se liga al medio Heme de la enzima guanilatociclasa provocando aumento de la síntesis de GMP cíclico . [27]

Resulta de la unión de un átomo de nitrógeno con un átomo de oxígeno en presencia de NADH; la reacción comprende la transferencia de electrones del NADPH ,

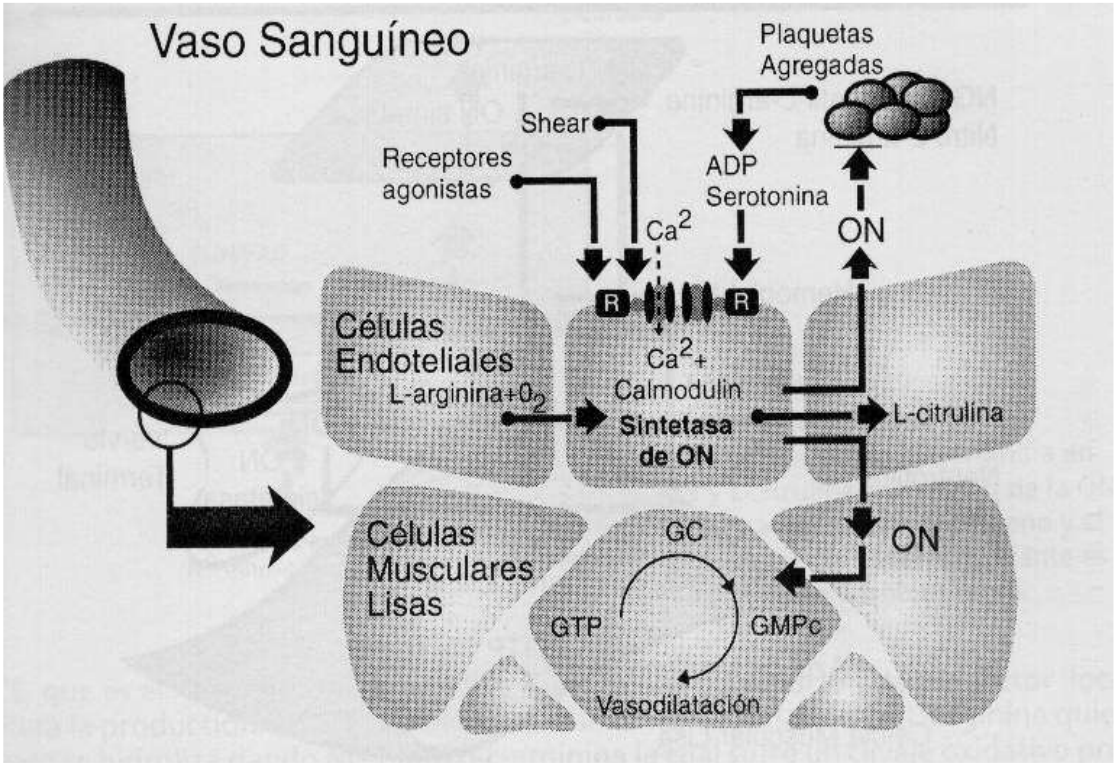
desde el dominio de reductasa terminal carboxi , al heme en el dominio oxigenasa terminal amino del NOs . Su precursor es la L-arginina, que es oxidado a L citrulina y la enzima es la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) . [16]

Se han descrito tres isoformas de esta enzima, quienes muestran como principal componente el citocromo P – 450 , las cuales son altamente homólogas en su estructura primaria , una isoforma se sintetiza en células fagocíticas iNOS(óxido nítrico inducible), las formas nNOS o forma neuronal y la endotelial eNOS localizada en invaginaciones de la célula endotelial denominadas caveolas. [16]
Esta enzima se encuentra inhibida, mientras la proteína aceptadora de calcio denominada calmodulina se hallan unida a otra proteína llamada caveolin 1.

Para que la eNOS se active es indispensable que los denominados agonistas del NO aumenten la concentración de calcio intracelular desplazando así a la caveolín-1 de la calmodulina.
En la síntesis del NO intervienen como co-factores el tetrahidrobiopterin (BH4) y el NADPH. El déficit de BH4 hace que se forme anion superóxido en detrimento de NO.
Existen inhibidores endógenos de la síntesis de NO como la dimetilarginina asimétrica (ADMA) y el geranil geranil pirofosfato. La primera antagoniza al sustrato L-arginina, y se encuentra elevada en la disfunción endotelial y en la aterosclerosis.
El segundo es un factor intermediario en la síntesis del colesterol. [16]

La eNOS es una enzima endotelial constitutiva y los genes que la codifican están en el cromosoma 6.
Es activada por el complejo calcio-calmodulina . Produce dos tipos de liberación de NO, una continua para mantener el tono basal del vaso sanguíneo que se libera cuando las concentraciones citosólicas de calcio son bajas; las segunda se libera en respuesta a los agonistas cuando aumentan el calcio citosólico el propio NO liberado regula su síntesis al producir retroalimentación negativa sobre la actividad de la eNOS .[16]

La otra enzima que interviene en la síntesis de NO es la denominada sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) codificada en el cromosoma 7, es citosólica e independiente de calcio ; su secreción se induce cuando endotoxinas (lipopolisacáridos bacterianos) y citoquinas (factor de necrosis tumoral, interleucina 1 etc) actúan sobre el endotelio. La liberación de NO por esta enzima es sostenida y es una de las responsables de la hipotensión refractaria que se produce en



el shock.[16]

2.5 <u>ACETILCOLINA :</u>

La acetilcolina (ACh) es un neurotransmisor que fue aislado por Adolf Von bayer (1967) y caracterizada farmacológicamente por Henry Hallet Dalet en 1914 y después confirmada como neurotransmisor (el primero en ser identificado) por Otto Loewi .[14]

La acetilcolina (ACh) que existe en las terminaciones colinérgicas es sintetizada a a partir de la colina y de la acetilcoenzima A . La síntesis empieza con la incorporación de la colina existente en el extracelular que procede de dos fuentes :

de la dieta , de la hidrólisis que sufre la ACh , liberada en el espacio sináptico.Posteriormente ocurre la acetilación de la colina a nivel del axoplasma y el almacenamiento el vesículas presinapticas .[14,29]

La estimulación a través de la llegada de un potencial de acción despolariza las membranas y provoca una rápida y pasajera apertura de canales de calcio y por ende la liberación por las vesículas sinápticas.

En el catabolismo de la acetilcolina ocurre atraves de dos enzimas la acetilcolinesterasa (AChE) y la acetilcolinesterasa , esta ultima presenta distribución en diferentes tejidos .

Los receptores colinérgicos se dividen en muscarinicos y nicotínicos .

Los muscarinicos a su vez se subdividen en: Receptor M-1: Se localizan a nivel de las neuronas del SNC y en las células ganglionares , el receptor M-2 : se localizan a nivel del corazón y nervios periféricos, los receptores M-3 a nivel de musculo liso y glándulas, endotelial, receptor M-4 : a nivel ocular .[14]

3 **DISFUNCION ENDOTELIAL** :

Se considera en la actualidad una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular , metabólicas y cardiovasculares; existe una relación inversa entre función endotelial y edad del individuo , el traumatismo o presión tangencial de la sangre sobre la pared vascular .[36]

El estrés oxidativo y todos los factores de de riesgo cardiovascular alteran el proceso de envejecimiento; existen factores que disminuyen la expresión del eNOS entre los cuales incluye: factor de necrosis tumoral , la hipoxia y altas concentraciones de lipoproteínas de baja densidad oxidadas y la disminución de las cantidades del cofactor BH4 .

Estudios fisiológicos han demostrado la reducción significativa de los niveles BH4 en diversos estados patológicos .

La inhibición competitiva de dimetilarginina es un aminoácido que circula en el plasma, sintetizada por células endoteliales y tejidos, esta molécula tiene la capacidad de inhibir la síntesis del oxido nítrico .

Estudios realizados por varios grupos de investigadores han indicado que la ubicación de
eNOS en la célula determina su actividad enzimática. [27]

Un sitio de particular importancia en la célula para la función de la enzima es la caveolae. La
caveolae es una estructura constituida por invaginaciones especializadas de la membrana plasmática , que está presente en varios tipos celulares, en mayor número en las
células endoteliales y en los adipocitos , entre otros. Sus componentes principales son el colesterol, los glicoesfingolípidos, y algunas proteínas estructurales como la caveolina. [36]

Actualmente se está acumulando evidencia que indica que numerosos estímulos extracelulares ejercen su acción desencadenadora de señales de transducción mediante esta estructura.
La ubicación de eNOS en el interior de la caveolae determina la inhibición de su actividad enzimática de la eNOS, debido a que en esta condición, la enzima se encuentra inactivada
por el enlace con la caveolina-1.
Esta última es una proteína integral de la membrana que se enlaza a eNOS impidiendo la interacción de ésta con la calmodulina cuando los niveles intracelulares de calcio se encuentran bajos. Los niveles elevados de LDL oxidada ocasionan una disminución del contenido de colesterol de la caveolae, resultando esto en la traslocación de la caveolina-1 junto con eNOS al interior de la célula, y por ende, en la inhibición de su actividad.
La cantidad de LDL oxidada que se producen en la hipercolesterolemia aumenta la producción de proteína caveolina -1 , que inactiva , el eNOS disminuyendo así la síntesis de oxido nítrico . [13]

4.- RADICALES LIBRES

4.1 CONCEPTO:

Son especies químicas eléctricamente cargadas , que en su estructura presenta un electrón desapareado , son altamente reactivos y poseen una vida media corta ; se producen por diferentes mecanismos entre los más importantes tenemos: la cadena mitocondrial , la cadena trasportadora de electrones , a nivel microsomal . [34]

El oxígeno actúa como el aceptor final de electrones liberados durante la oxidación de nutrientes, esta reacción es catalizada por la enzima Citocromo Oxidasa, localizada al final de la cadena respiratoria mitocondrial.[34]

Dada la estructura electrónica del oxígeno, esta molécula sólo puede aceptar electrones de a uno por vez, esto significa que la transformación de un átomo de oxígeno (0) a (-4) implica adquirir cuatro electrones extras, lo cual es termodinámicamente poco estable que ocurra en una sola etapa, obligando a este recibir en forma secuencial cada uno de los 4 electrones que requiere para alcanzar el estado reducido. La adquisición de cada electrón lo va a convertir en una forma de transición de mayor o menor reactividad, según sea la estructura electrónica que adquiera, esta secuencia da origen a los radicales libres.[33,34]

Existen circunstancias que se producen radicales libres como son :

- Dieta hipercalórica.
- Dieta insuficiente en antioxidantes.
- Procesos inflamatorios y traumatismos.
- Fenómenos de isquemia y reperfusión.
- Ejercicio extenuante . [8]

Los efectos nocivos de los radicales libres son sobre:

Lípidos: lo que se conoce como peroxidación lipídica , donde se afectan estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados que altera la permeabilidad .

Proteínas: la oxidación de aminoácidos como la fenilalanina , tirosina, histidina y metionina , ácido desoxiribonucleicos originando delecciones fragmentaciones reordenamiento cromosómicos [19]

4.2 <u>FUNCIONES</u> :

Poseen funciones fisiológicas como por ejemplo participan en la

1.-Fagocitosis,

2.-Síntesis de colágeno

3.-Favorece la síntesis de prostaglandinas

4.-Activan enzimas de la membrana celular

5.-Activan enzimas de la membrana celular, en condiciones fisiológicas normales.

El organismo neutraliza el ERO a través de varios mecanismos antioxidantes que involucran la producción de enzimas antioxidantes.[8]

4.3 CLASIFICACIÓN

Los radicales libres se pueden clasificar en :

1.-**Inorgánicos** o primarios : por transferencia sobre un átomo de oxigeno ,se caracterizan por tener una vida media corta ,estos son: el anion superoxido, el radical hidroxilo y el oxido nítrico

2.S**ecundarios** : por transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de molécula orgánica, o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, los principales moléculas son carbono, nitrógeno , oxigeno y azufre . [31]

4.**4** CLASES DE RADICALES LIBRES DE OXIGENO

Las principales sustancias oxidantes en los sistemas biológicos son los radicales libres, también denominadas ROS (Reactive oxigeno especies). Se consideran los siguientes:

-Anión superóxido (O_2-). De aquí derivan la mayor parte de estas sustancias. Tal anión proviene de la cadena respiratoria y es continuamente producido por la membrana interna de la mitocondria; además su producción aumenta a través de la enzima NADPH oxidasa (Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidasa) de los fagocitos que es estimulada por mediadores proinflamatorios; sin embargo, se encuentra presente en muchos otros tejidos.[31]

- **Peróxido de hidrógeno** (H_2O_2).-Mediante la superóxido dismutasa el superóxido es inmediatamente transformado en peróxido de hidrógeno y a partir de aquí pueden ser metabolizados en agua y oxigeno. [31]

- **Radical hidroxilo** (OH^-) .-Formado de la acción del superóxido frente a un ión metálico como es el hierro, es considerado altamente tóxico para las células provocando la peroxidación lipídica, y producir rotura o mutación del DNA.[31]

- **Ácido hipocloroso** .- El superóxido en presencia de cloro a través del sistema enzimático de la mieloperoxidasa de los leucocitos forma (anión hipoclorito). El ácido hipocloroso es el radical más tóxico y la especie mas reactiva formada por los fagocitos. Su efecto tóxico se ejerce también sobre células normales pudiendo oxidar lípidos y proteoglicanos de las membranas celulares. Intracelularmente inhibe los citocromos con lo que se impide la cadena respiratoria. Asimismo, el ácido hipocloroso puede reaccionar con radicales NH_2 con lo que forman las cloraminas, oxidante de larga vida media. Algunos tipos de cloraminas son tóxicas cuando el nivel de amoniaco aumenta en sangre. [31]

- **Peroxinitrito**. Furchgott y Zawadzki demostraron que el Factor de Relajación Derivado del Endotelio (FRDE) no era otra sustancia que el óxido nítrico y el producto de la reacción con el O_2- es un oxidante casi tan poderoso como el OH, conocido como Peroxinitrito. En resumen, en condiciones normales los organismos aerobios están expuestos a un estado estacionario basal de oxidantes, que en la mayoría de los casos, se generan en forma accidental. [31]

4.5- ESTRÉS OXIDATIVO

El término estrés oxidativo se usa a menudo para referirse a condiciones en las que las células están expuestas a niveles excesivos, bien sea de oxígeno molecular o de derivados químicos del oxígeno llamados especies reactivas del oxígeno.

El estrés oxidativo se produce cuando existe un desbalance entre la producción de especies radicales del oxígeno y las defensas naturales contra ellas. La utilización del

oxígeno a nivel mitocondrial resulta en la formación de agua y energía esencial para la vida. En los procesos biológicos habituales algunas moléculas de oxígeno no llegan a completar este proceso y pasan al medio extramitocondrial como formas moleculares del oxígeno con un electrón desapareado, llamados radicales libres como el ión superóxido y el radical hidroxilo siendo este último uno de las especies más reactivas.[30]

Una vez producidos, reaccionan con membranas celulares pudiendo llevar a la muerte celular, con el DNA (promoción de procesos cancerígenos), con enzimas intracelulares como proteasas etc. Este proceso inicia reacciones en cadena que se relacionan con las patologías antes mencionadas. Por la extrema brevedad de su vida media, los radicales hidroxilos son difíciles de detectar a pesar de su importancia como agentes de daño celular. [30]

A pesar del reconocimiento general de la participación de los radicales libres en la patología humana, son escasos los trabajos que efectivamente corroboran la hipótesis del rol del estrés oxidativo en la evolución de las enfermedades mencionadas a partir de la lectura directa de los radicales libres del oxígeno [30]

Por su capacidad aceptora de electrones, el oxígeno es utilizado en el organismo para oxidar los nutrientes y obtener la energía. Estas reacciones se llaman en conjunto Cadena Respiratoria, y tiene lugar en la mitocondria. Cuando la cadena respiratoria funciona, se sintetiza ATP y se produce la respiración celular, fluyendo los electrones desde los nutrientes hasta el oxígeno para formar agua. En este proceso pueden producirse radicales libres de oxígeno (RLO), estos fragmentos moleculares con un electrón suelto en su órbita exterior provocan una oxidación muy alta, son muy inestables y con reacción instantánea a todo lo que esté a su alrededor, conduciendo a una verdadera cascada de radicales libres, patología llamada con el nombre de “estrés oxidativo”. “Prospective Diabetes Study” (UKPDS) Group. *Lance*t; 352:837-53, 1998.

Tanto el O2 como el NO son radicales altamente reactivos e inestables, por lo tanto no es sorprendente que reaccionen muy rápido, para formar como producto principal : peroxinitrito (OONO–)

Esta reacción es aproximadamente tres veces más rápida que la dismutación de O2 por la superóxido dismutasa, esto implica que posiblemente la generación aumentada de O2 en la pared vascular inhiba las funciones fisiológicas del NO· [30]

Además el OONO– es un oxidante fuerte y es más estable que el NO o el O2, a pH neutro, el OONO– puede protonarse para formar ácido peroxinitroso que por ruptura homolítica puede producir radicales tipo hidroxilo y dióxido de nitrógeno que también son oxidantes fuertes. [30]

Aunque el OONO– puede producir vasodilatación, este efecto ocurre a concentraciones mucho mayores que las concentraciones vasorrelajantes efectivas del NO. Las reacciones de oxidación inducidas por el OONO– tales como la modificación de grupos hierro-sulfuro, dedos de zinc, proteínas con grupos tioles, y lípidos de membrana probablemente estén implicadas en numerosos procesos fisiopatológicos . [30]

Además de su exagerada producción a partir de NO y O2 , el excesivo OONO– , también puede provenir de una metabolización deficiente de este compuesto por los agentes «detoxificantes» presentes en el ambiente vascular. Hasta ahora se han descrito dos vías de metabolización del OONO–: una implicando la generación de componentes nitrosotioles y la otra incluyendo un mecanismo tiol-independiente que todavía no ha sido identificado. [30]

5 .LOS ANTIOXIDANTES

5.1 DEFINICIÓN

Son sustancias de estructura química diversa, cuya acción consistiría en inhibir la tasa de oxidación de los nocivos radicales libres. Pueden ser clasificados de acuerdo a su trabajo y a su localización en el organismo y en combinación, ayudan a evitar el daño celular causado por los radicales libres, unos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, protegiendo a los diferentes órganos y sistemas.(Dutra F, Crespo R, Coelho MA, Laneuville V. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. Braz J Pharmacogn. 2007; 17(4); 631-9.)

5.2 CLASES DE ANTIOXIDANTES

5.2.1 SISTEMAS ENZIMATICOS

El superóxido dismutasa es una enzima que necesita la presencia de Zinc y representa la primera línea de defensa acelerando la reacción de conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno. Es una reacción que metabólicamente es poco costosa ya que no requiere el consumo de ningún cofactor.
Otra enzima con capacidad antioxidante es la catalasa, que es la responsable de la destrucción del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

Así mismo, la glutatión reductasa, está también en la segunda línea de defensa del ataque oxidativo, reduciendo el peróxido y en general todos los hidroperóxidos orgánicos tipo R-OOH. Esta última requiere un donante de hidrógeno para actuar, que es el glutatión reducido.[27]

5.2.2 AGENTES ANTIOXIDANTES NO ENZIMATICOS (SCAVENGERS)

El glutatión, presente en todas las células limpia los radicales peróxido de hidrogeno, radical hidroxilo

- **VITAMINA E** : lípido isoprenoide , familia de los tocoferoles , biológicamente activa es el alfa tocoferol , es una de las primeras barreras de la peroxidación de los ácidos grasos insaturados, los tocoferoles actúan interfiriendo las reacciones de cadena con radicales libres como resultado de su capacidad de transferir el hidrogeno fenólico a un radical peróxido libre , quedando a su vez en la forma libre de fenoxi .[26]

- **VITAMINA C** : es un derivado ácido de la glucosa presenta una configuración de lactona , en la que los grupos hidroxilos , asociados al doble enlace funcionan con alto potencian reductor , inhibe la formación de radicales superoxido o de nitrosaminas , durante su digestión , además es el agente que reduce los radicales fenoilo formados durante la vitamina E.[26]

- **Beta caroteno (provitamina A) y Vitamina A**: el beta caroteno se convierte en nuestro organismo en la Vitamina A, capturando radicales libres muy débiles, es por ello que se combina con el tocoferol impidiendo así el daño a nivel de las membranas celulares.[25]

- **Citroflavonoides:** denominados los super antioxidantes, estudios han indicado que son 50 veces más poderosas que la Vitamina E, es eficaz su uso en conjunción con la Vitamina C a la que aumenta su capacidad antioxidante. La hesperidina y la rutina son dos de ellos.

- **Zinc:** mineral antioxidante que interviene en el metabolismo de la superóxido dismutasa (SOD) y de la Vitamina E, entre otras funciones.

- **Selenio (o selenium):** se le encuentra en la levadura de cerveza, vegetales (brócoli en particular), arroz integral y otros granos, ajo, cebolla, pescados en general como el salmón y lácteos. Este mineral antioxidante es importante para la acción de la enzima glutatión peroxidasa y de la vitamina E .

- **Cisteína, taurina y metionina**: que limpian selectivamente ácido hipocloroso y las cloraminas.

- **Ácido úrico glucosa y el manitol:** tienen capacidad para neutralizar algunos agentes oxidantes.

5.2.3 AGENTES SECUESTRADORES DE METALES DE TRANSICION

Por otra parte la ferritina, la transferrina y la ceruloplasmina son capaces de ejercer efecto antioxidante por secuestro de metales transición por ejemplo el hierro e impidiendo la formación de radicales hidroxilos.

5.3 DETERMINACIÓN DE LOS RADICALES LIBRES

El estrés oxidativo se produce al romperse el equilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y los mecanismos de defensa antioxidante, lo que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que provocan el deterioro y muerte celular. Este tipo de daño puede ser medido mediante métodos directos e indirectos.

5.3.1 MÉTODOS DIRECTOS:

Entre los métodos directos está la medición de la concentración de agentes oxidantes, que es muy difícil debido a su corta vida media. El radical hidroxilo tiene una vida media aproximada de 10-10 segundos. El uso de la espectrometría de la resonancia de rotación (espín) de electrones, es la única técnica analítica que mide directamente las especies oxígeno reactivas, pero debido a su costo y complejidad su aplicación en el ser humano es difícil.

Existe además, otra metodología, basada en el hecho de que los metales de transición, una vez liberados de su forma quelante (forma en que se encuentran en el plasma y dentro de las células), tienen la capacidad de catalizar reacciones de tipo oxido reducción, cuyos productos son atrapados por derivados fenólicos, que dan por resultado la formación de una solución coloreada que puede ser medida espectrofotométricamente.

5.3.2 MÉTODOS INDIRECTOS:

1) *Determinación de los productos finales de la acción oxidante sobre algunas moléculas biológicas tales como los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas.* Los métodos para medir peróxidos lipídicos son el patrón de oro, cuando se trata de probar el papel de los oxidantes en algún tipo de daño celular. Es posible medir los dienos conjugados derivados del ácido araquidónico mediante espectrofotometría UV, los hidroperóxidos lipídicos mediante cromatografía líquida de alta presión, método usado también para la medición de otro derivado llamado malonaldehído. La acción sobre las proteínas puede ser evaluada a través de la medición de la acumulación de grupos carbonilos, que pueden evidenciarse por su reacción con 2-4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH). Por otro lado, el efecto sobre los ácidos nucleicos puede ser determinado midiendo algunos metabolitos

derivados de la acción oxidante tales como thymidine glycol (TG) y 8-hidroxi-2,deoxignanosine.

2) Medición de la concentración de antioxidantes: los resultados de diferentes estudios muestran que los niveles de antioxidantes pueden disminuir o aumentar en diversas patologías, por lo que la medición de sus niveles pueden ser utilizados como marcadores de enfermedad o para el seguimiento de los tratamientos utilizados. Entre los más usados están las mediciones de antioxidantes enzimáticos como la catalasa y superóxido dismutasa, y determinación de los niveles de antioxidantes no enzimáticos tales como la ubiquinona y las vitaminas C, E, y A.

3) Medición del estado antioxidante total: este método refleja el equilibrio dinámico entre el sistema antioxidante y la producción de especies reactivas de oxígeno. Uno de los métodos utilizados para obtener un acercamiento a este parámetro, es la medición de la capacidad antioxidante del plasma, sin embargo, no existe una técnica única para su determinación, y generalmente debe utilizarse índices que son interpretados de acuerdo con el tipo de muestra y método usado para su evaluación.

El estrés oxidativo ha sido señalado como un fenómeno importante en las patogénesis de diversas enfermedades con una elevada prevalencia, tales como el cáncer, diabetes, ateroesclerosis, artritis o Parkinson.

Con una nutrición adecuada, podemos aportar al organismo vitaminas y minerales, que juegan un rol importante en la prevención de estas enfermedades, lo cual es apoyado por la evidencia epidemiológica que sugiere que el consumo de frutas y verduras, pueden reducir el riesgo de contraer dichas enfermedades, debido posiblemente a que estos alimentos son una rica fuente de antioxidantes dietarios .[20]

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

1 TIPO DE ESTUDIO: El presente estudio es de tipo experimental, comparativo.

2 UNIDAD DE ESTUDIO

2.1 MUESTRA BIOLÓGICA

La muestra biológica fue constituida por 60 anillos aislados[38] de aorta torácica extraídos de 15 ratas albinas machos de la especie *Rattus norvegicus*, (ANEXO 3)con un peso promedio entre 300 a 350g, de 3 meses de edad, aparentemente sanas, obtenidas del bioterio del CIDEC.

2.2 CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA EN ESTUDIO

2.2.1.CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Los anillos se obtuvieron de Ratas machos procedentes de la misma camada.
2. De 3 meses de edad.
3. Con un peso promedio entre 300 a 350 gramos.
4. Aparentemente sanas.

2.2.2.CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Animales que a la observación manifestaron evidencia patología crónica o aguda.
2. Animales que integraron los experimentos piloto.

2.3 DISTRIBUCIÓN DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

Los anillos aórticos aislados, se distribuyeron aleatoriamente en tres (3) grupos de acuerdo al siguiente protocolo:

GRUPO 1. Denominado **Grupo Experimental**: estuvieron formados por 36 anillos a los cuales fueron distribuidos en tres subgrupos :

1A :Formado 12 anillos las cuales fueron oxidados por espacio de dos horas utilizando concentraciones de glucosa en 5.5mM y 45mM , luego fueron insertados en la cámara de órganos aislados para obtener su respuesta vasodilatadora a la acetilcolina.

1B: Formado por 12 anillos las cuales a las mismas concentraciones de glucosa del grupo anterior (1A) ,pero por espacio de 4 horas .Se mide el porcentaje vasodilatador con acetilcolina .

Posteriormente son incubados por 20 minutos a *Carica pubensces* (papaya arequipeña), para luego ser llevadas a la cámara de órganos y obtener su respuesta vasodilatadora a acetilcolina.

1C: Formado por 12 anillos las cuales a las mismas concentraciones de glucosa del grupo (1A) , pero por espacio de 4 horas. Se incubo por 30 minutos a *Carica Pubensces* (papaya arequipeña) , evaluando posteriormente su respuesta vasodilatadora a acetilcolina

GRUPO 2. Llamado **Grupo Patrón**, fueron conformados por 12 anillos los cuales una vez inducida la disfunción endotelial mediante su incubación por 4 hrs. en un medio conteniendo 5.5m M y 45mM de glucosa ,se los sometió a la cámara de órganos aislados para obtener su respuesta vasodilatadora a la acetilcolina. Luego se los incubo con la vitamina E durante 20 min. Determinándose nuevamente, su respuesta a la administración de acetilcolina.

GRUPO 3. Llamado **Grupo Control**, igualmente constituido por 6 anillos los cuales no fueron sometidos a incubación con glucosa por tanto, permanecieron como controles fisiológicos. De tal manera que, a la magnitud de su respuesta vasodilatadora por exposición a acetilcolina, fueron consideradas como respuesta patrón.

3 TECNICAS E INSTRUMENTOS

3.1 ETAPA PRE-EXPERIMENTAL.

Se realizo un estudio piloto donde se obtuvo los anillos aislados de 4 animales con la finalidad de determinar la dosis de *Carica pubensces* que manifiesta cambios significativos.

3.2 ETAPA DE ESTANDARIZACIÓN.

Los animales se mantuvieron en jaulas separadas con unas condiciones ambientales y de alimentación estandarizadas. Temperatura ambiental 24°C; humedad relativa 30-60%. Intervalos de luz oscuridad de 12 horas.

El alimento se proporciono de manera diaria, a la misma hora durante todo el tiempo de duración del estudio y estará constituida por 30g de concentrado para mantenimiento TOMASINO®. El agua se administrará ad libitum.

3.3 ETAPA EXPERIMENTAL.

Consistió en la comprobación en primer lugar del efecto de la incubación de los anillos aórticos en un medio de glucosa de (5.5m M y 45mM de glucosa) respectivamente manifiesto por la presencia de disfunción endotelial.
Luego según el protocolo se determino la vasodilatación incubando previamente los anillos con papaya arequipeña así como con la vitamina E.

4.- **PLANTEAMIENTO OPERACIONAL**

4.1 METODOLOGÍA

4.1.1 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA VASCULAR

Uno a uno, los anillos disecados fueron insertados en la cámara de órganos aislados (ANEXO 1) valiéndose de los dos ganchos de acero inoxidable presentes en el interior de ella. Uno de ellos, fijo a manera de poste en el borde interno de la cámara y el otro, constituido por el extremo terminal del transductor de tensión isométrica. El proceso finalizo con el llenado de la cámara con 20ml de solución Krebs-Hensel(KH), oxigenada mediante burbujeo permanente de una mezcla carbógena (95% de O2 + 5% de CO2) mantenida a una temperatura de 37 ± 0.3 grados Celsius, gracias a la circulación de agua a esa temperatura por su doble pared.[38]

Una vez estabilizada la preparación para lo cual tomo como promedio 30 minutos, se procedió a agregar al baño de la cámara de órganos aislados, las dos drogas de estudio manteniendo el siguiente orden:

1. Solución despolarizante de cloruro de potasio (70mM) con la finalidad de determinar para cada anillo el patrón de contracción máxima al cual se considero arbitrariamente como del 100 por ciento, por ser la mejor respuesta constrictora desde el punto de vista fisiológico.[38,39]

2. Luego se lavará 3 veces la cámara con solución KH durante 5 min, hasta lograr el retorno de la aguja a la línea de base, posteriormente se añadió al baño nuevamente KCl esperando se presente su máximo efecto constrictor, cuando se alcance ello; se añadió a la preparación, acetilcolina en concentraciones de (10^{-7}, 10^{-6} y 10^{-5}M). para observar el efecto vasodilatador. , el procedimiento del paso 1 y 2 se realizo en el grupo control .[37,38,39,40]

Posteriormente son incubados a medios glucosados , 5.5 y 45 mM por espacio de 2 horas formando el grupo 1 A .
Tanto el grupo 1 B como 1 C se utilizo *carica pubensces* a una concentración de 1.28 mg/ Kg

Las observaciones se llevaron a cabo por un periodo de 30 minutos. Una vez finalizado el estudio, se extrajo el anillo de los soportes y se procedió a determinar su peso seco.
Para el grupo patrón de utilizo una concentración de 26 mM de vitamina E

5.-MATERIALES

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizo 15 ratas albinas machos, obtenidas del bioterio del CIDEC-FM.

5.2 MATERIAL DE LABORATORIO

A. Equipos de laboratorio

- Balanza analítica: Sartorius Verke, serie 241.
- Agitador magnético/plancha térmica marca Lab-Line

- pHmetro digital marca Meter
- Osmómetro marca Somete
- Cámara de órganos aislados para anillos de aorta, termorregulado mediante circuito de agua externo.
- Balón de oxígeno y de bióxido de carbono
- Polígrafo Marca Grass Instrument. De 10 canales
- Transductor isométrico Marca Grass Inst.

B. **Reactivos**

- Vitamina E Sirio (Pharma Co. Ltda)
- Suero fisiológico (NaCl 0.9%)
- Solución de Krebs-Hensel
- Kit para análisis de glucosa
- Cloruro de potasio
- Acetilcolina

6.-CAMPO DE INVESTIGACIÓN

El presente estudio es de tipo experimental observacional.

6.1 ÁMBITO GEOGRÁFICO.

El presente trabajo de investigación se realizo en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María y en el Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico (CIDEC) de la Universidad Nacional de San Agustín.

6.2 UNIDADES DE ESTUDIO.

Para la realización este estudio fueron utilizadas 15 ratas machos de pesos corporales similares pertenecientes a la misma camada.

6.3 ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos se recogieron y registraron en fichas, tablas y formatos adecuados para su tabulación y registro.

7 DISEÑO ESTADÍSTICO

Para la evaluación de los resultados se empleó el paquete estadístico SAS: Statistical Análisis System, Raleigh, North Carolina: SAS Institute, INC

Calculándose los siguientes estadígrafos:

- Medidas de tendencia central, media ± error estándar
- T de Student para hallar la diferencia entre dos medias independientes

Las diferencias se consideraron como:

No significativas $p>0,05$; Significativas $p<0,05$ o Altamente significativas $p<0,01$.Se les aplicó análisis de varianza y el test de especificidad de Tukey (modificado) para determinar las diferencias significativas mencionada como “significacia”, con una exigencia de $p< 0,01$.

CAPITULO IV

RESULTADOS

1.-Determinación del patrón de contracción máxima (100%) de anillos aislados de aorta torácica de ratas empleando cloruro de potasio 70mM.[40]

CUADRO N°.1

Debido a que es necesario previamente contraer los anillos para posteriormente inducir su relajación, se determinó el patrón de contracción fisiológico (con anillos sanos) añadiendo al baño de órganos, una solución 70mM de cloruro de potasio (KCl). Como se observa en la tabla y gráfico 1, el máximo efecto contráctil con el KCl se obtuvo a partir del minuto 7 en adelante considerándose arbitrariamente a esta respuesta como del 100%. El gráfico demuestra que más del 50% de la respuesta final (100%) se desarrolló durante los dos primeros minutos, para luego incrementarse a través del tiempo hasta lograr al minuto 7 su mayor contracción , se observa además que a partir del minuto 5 , donde el porcentaje de vasodilatación 96,7 % no existe una diferencia significativa , con el porcentaje de vasoconstricción en los minutos sucesivos

Tiempo

(min)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Porcentaje de vasoconstricción a efectos de KCL	39,2	55.3	82,6	85,9	96,7	99,1	100	99,9	100,0	100,0
± ES	2,2	3,1	4,4	3,8	3,9	4,1	4,9	3,7	4,8	4,2
Significancia	a/	b/	c/	d/	e/	f/e	g/e	h/e	i/e	j/e

Fuente: Elaboración propia

2.- Determinación de la máxima vasodilatación de anillos aislados de aorta torácica de ratas albinas empleando 3 dosis crecientes de acetilcolina (ACh).[37]

CUADRO N°.2

Una vez alcanzada la máxima contracción (min 7), se añadió a la cámara de órganos aislados cada 15 minutos, las 3 dosis crecientes de ACh (10^{-7}, 10^{-6} y 10^{-5}M). Los resultados que se incluyen en la tabla y gráfico 1 nos muestran que la vasodilatación observada es dependiente de la dosis de acetilcolina empleada. Así,

	Efecto 1ra dosis			Efecto 2da dosis			Efecto 3ra dosis		
Tiempo (min)	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**	**35**	**40**	**45**	**50**
Porcentaje de vasodilatación asociado a ACh	0/100	12,1	18,6	19,2	46,4	52,8	51,3	83,9	85,7
± ES	2,0	1,5	3,3	3,1	4,8	5,3	4,2	7,4	10,1
Significancia	a/	b/	c/b	d/c	e/	f/e	g/f	h/	i/

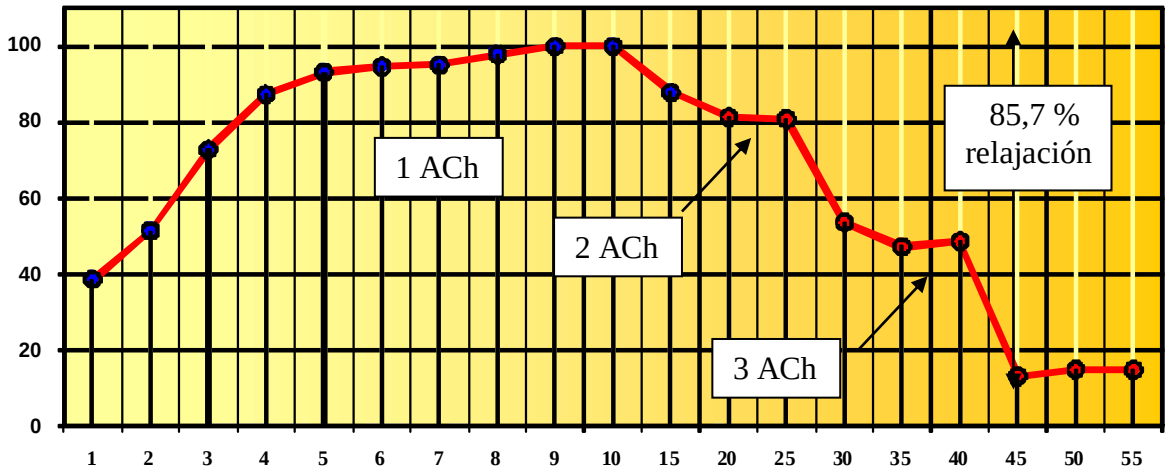
Fuente: Elaboración propia

- Los resultados se expresan en porcentaje (Media ± error estándar ES) de 6 determinaciones.
- Se consideró como del 100% a la máxima respuesta al KCl 70mM.

- Se les aplicó análisis de varianza y el test de especificidad de Tukey (modificado) para determinar las diferencias significativas con una exigencia de $p < 0,01$.
- La ACh, se añadió al minuto 10, 25 y 40 una vez alcanzado el 100% de contracción.

3.- Representación gráfica del patrón de contracción máxima con KCl y de relajación a 3 dosis crecientes de ACh sobre anillos aislados de aorta torácica de ratas albinas

GRAFICO Nº 1



Tiempo en minutos

Fuente : Elaboración propia

3. Efecto de la incubación de anillos aórticos de ratas albinas durante 2 horas en 5,5 y 45mM de glucosa[39] sobre su respuesta vasoactiva a 3 dosis crecientes de acetilcolina 10^{-7}, 10^{-6} y 10^{-5}M.

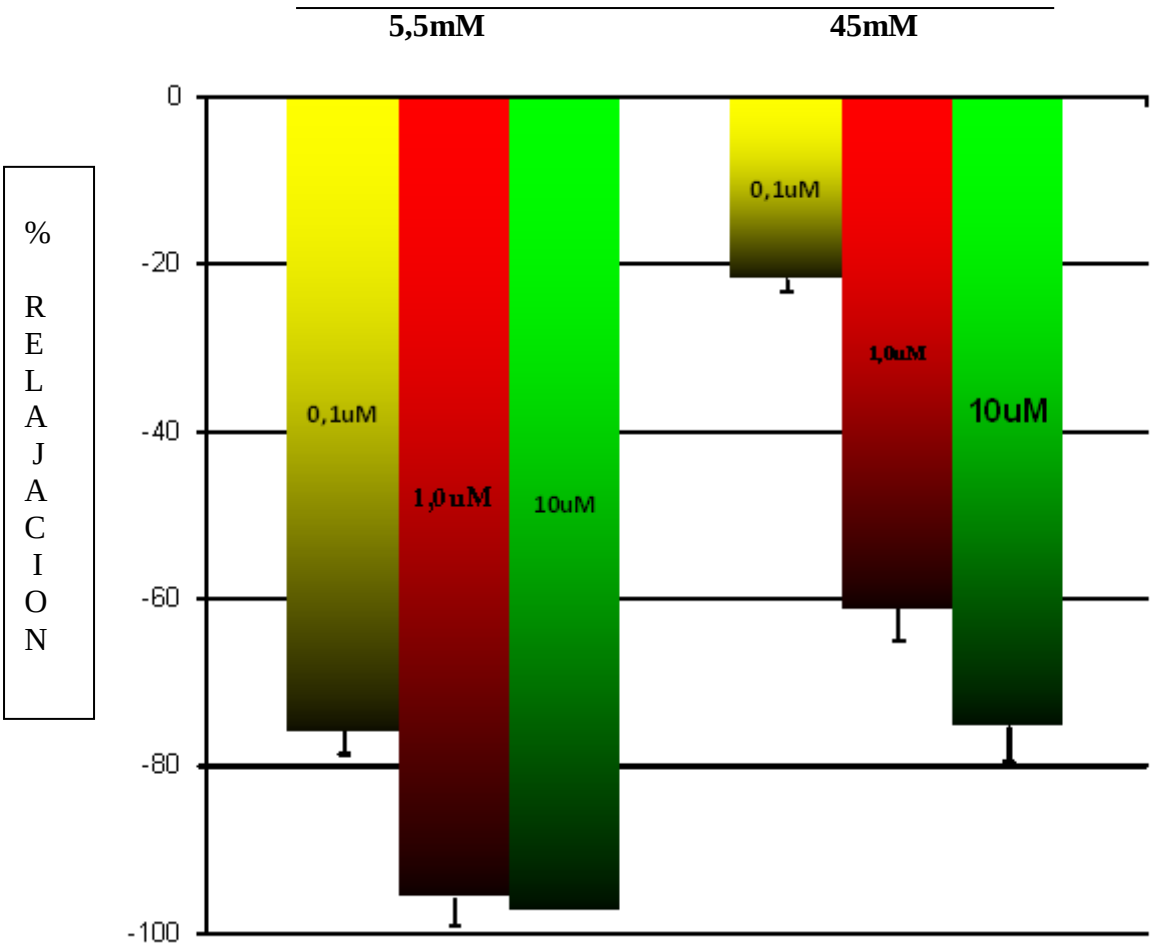
CUADRO No 3

	Concentración de glucosa		
Concentración de ACh	5,5mM	45mM	Prueba t
0,1µM X ± ES	75.9 ± 2,9	21,8 ± 3,1	P<0,05
1,0µM X ± ES	95,8 ± 5,05	61,3 ± 4,1	P<0,05
10µM X ± ES	97,3 ± 6,9	75,3 ± 6,4	P<0,01
N	6	6	

- Los promedios se expresan en porcentaje de relajación ± el error estándar (ES).
- Las concentraciones de acetilcolina (ACh) se añadieron a los anillos previamente contraídos al 100% con cloruro de potasio.
- Se compararon las medias con la prueba t de Student para datos pareados, con una exigencia del 99%
- n, tamaño de la muestra
- ns, no significativo

GRAFICO Nº 2

[Glucosa] en el medio de incubación



En el grafico 2:
Observamos a la izquierda : Que a concentración de glucosa de 5,5mM ,y utilizando una concentración de acetilcolina en 10^{-5}M ; vemos que el porcentaje de relajación llega a un 97.3%
Al lado derecho: Observamos una concentración hipertónica de glucosa ; vemos que el poder de vasodilatación disminuye hasta un 75.3 %, todo esto registrado en dos horas.
Concluyendo que entre estos dos porcentajes ,existen una diferencia altamente significativa

4. **Efecto de la incubación de anillos aórticos de ratas albinas durante 4 horas en 5,5 y 45mM de glucosa sobre su respuesta vasoactiva a 3 dosis crecientes de acetilcolina (10^{-7}, 10^{-6} y 10^{-5}M)**

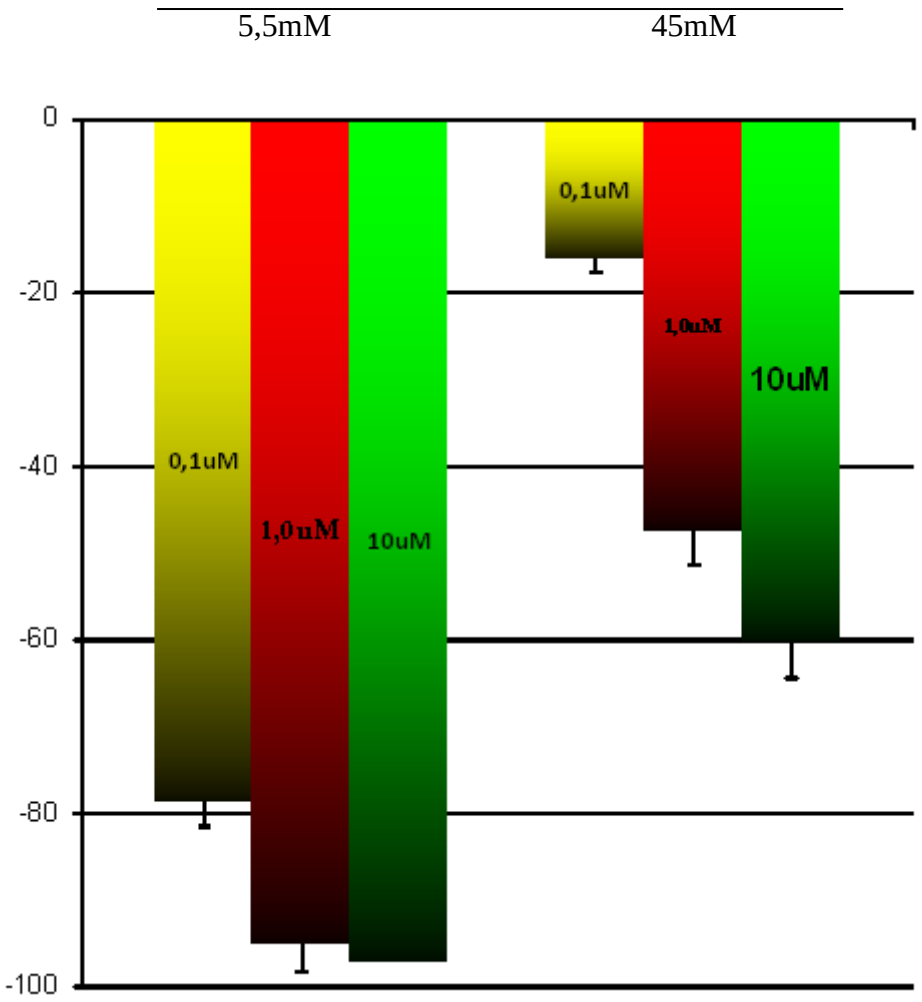
CUADRO No 4

	Concentración de glucosa		
Concentración de ACh	5,5mM	45mM	Prueba t
0,1µM X ± ES	78.8 ± 5,9	16,1 ± 2,5	P<0,05
1,0µM X ± ES	95,1 ± 5,3	47,6 ± 3,0	P<0,05
10µM X ± ES	97,3 ± 6,1	60,2 ± 5,4	P<0,01
n	6	6	

- Los promedios se expresan en porcentaje de relajación ± el error estándar (ES).
- Las concentraciones de acetilcolina (ACh) se añadieron a los anillos previamente contraídos al 100% con cloruro de potasio.
- Se compararon las medias con la prueba t de Student para datos pareados, con una exigencia del 99%
- n, tamaño de la muestra
- ns, no significativo

GRÁFICO No 3

[Glucosa] en el medio de incubación



En el grafico 3
Observamos el mismo procedimiento mencionado en el resultado 3 ,pero a un tiempo de 4 horas en medio hipertónico glucosa .
Vemos que en los anillos oxidados , el porcentaje de vasodilatación disminuye a 60,2 %, existiendo una diferencia altamente significativa , con la ultima dosis de acetilcolina administrada.

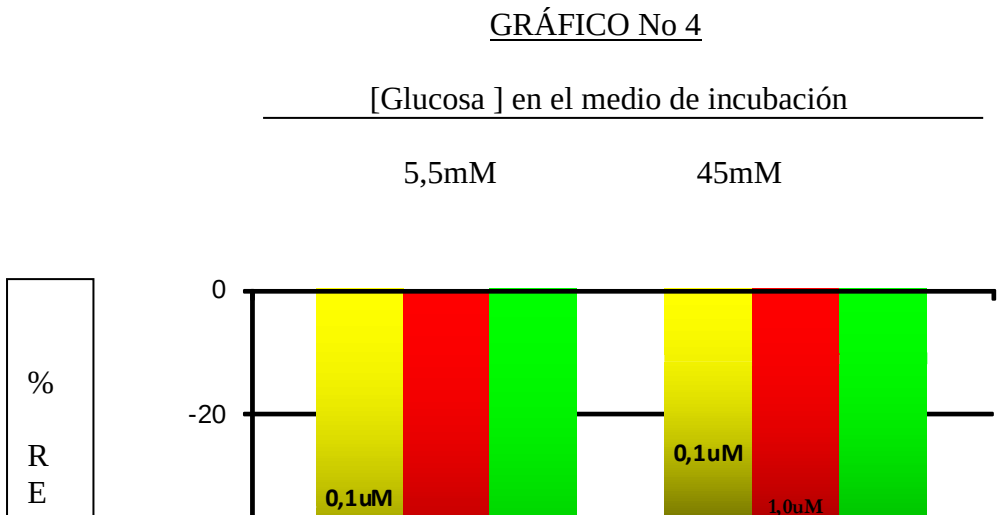
5-. Efecto de la incubación durante 20 min en *Carica pubesces* (papaya arequipeña) sobre la respuesta vasoactiva a 3 dosis crecientes de acetilcolina en anillos aórticos de ratas previamente incubadas durante 4 horas con 5,5 y 45mM de glucosa.

CUADRO No 5

	Concentración de glucosa		
Concentración de ACh	5,5mM	45mM	Prueba t
0,1µM X ± ES	66.7 ± 5,2	52,3 ± 3,6	n.s.
1,0µM X ± ES	81,4 ± 6,7	69,4 ± 5,1	n.s.
10µM X ± ES	93,8 ± 6,3	78,9 ± 5,8	n.s.
N	6	6	

- Los promedios se expresan en porcentaje de relajación ± el error estándar (ES).
- Las concentraciones de acetilcolina (ACh) se añadieron a los anillos previamente contraídos al 100% con una solución despolarizante de cloruro de potasio.
- Se compararon las medias con la prueba t de Student para datos pareados, con una exigencia del 99% .
- n, tamaño de la muestra
- ns, no significativo

GRÁFICO No 4



En el grafico 4:

Observamos que los anillos aórticos oxidados con 45mM de glucosa y que posteriormente fueron incubados en carica pubesces (papaya arequipeña) por 20 minutos , presentan un porcentaje de vasodilatación en 78.9% ; no existiendo una diferencia significativa con el grupo de anillos incubados en 5.5m M de glucosa

6. Efecto de la incubación durante 30 min en *Carica pubesces* (papaya arequipeña), sobre la respuesta vasoactiva a 3 dosis crecientes de acetilcolina; en anillos aórticos de ratas previamente incubadas durante 4 horas con 5,5 y 45mM de glucosa.

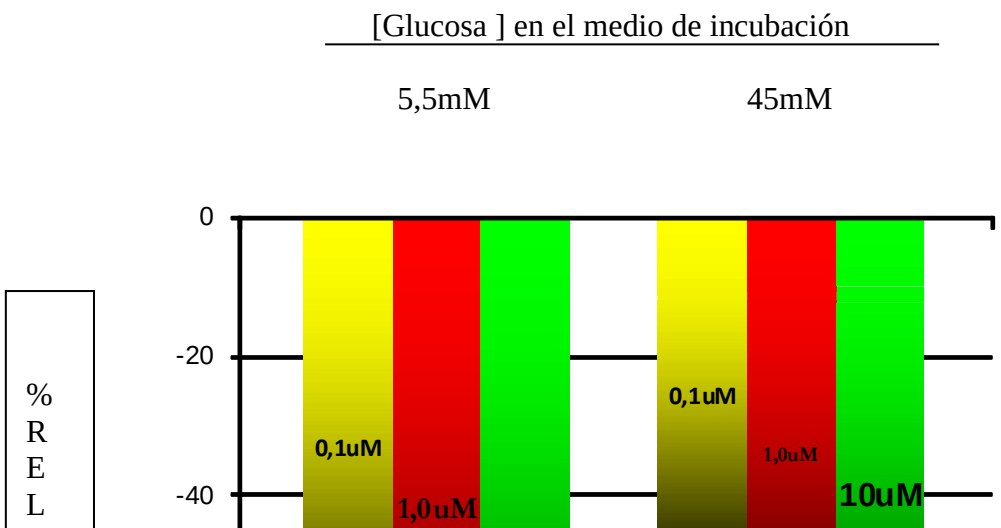
CUADRO No 6

	Concentración de glucosa	

Concentración de ACh	5,5mM	45Mm	Prueba t
0,1µM X ± ES	62.4 ± 5,5	51,7 ± 5,7	n.s.
1,0µM X ± ES	81,1 ± 4,8	68,8 ± 6,5	n.s.
10µM X ± ES	92,1 ± 6,2	80,1 ± 7,2	n.s.
n	6	6	

- Los promedios se expresan en porcentaje de relajación ± el error estándar (ES).
- Las concentraciones de acetilcolina (ACh) se añadieron a los anillos previamente contraídos al 100% con una solución despolarizante de cloruro de potasio.
- Se compararon las medias con la prueba t de Student para datos pareados, con una exigencia del 99%
- n, tamaño de la muestra
- ns, no significativo

GRÁFICO No 5



En el grafico 5
Observamos que en un medio de incubación de 30 minutos de carica pubesces ,no existe una diferencia significativa ,tanto de los anillos oxidados con 5.5 mM de glucosa como los anillos en 45mM de glucosa

7.- Efecto de la incubación durante 20 min en Vitamina E , sobre la respuesta vasoactiva a 3 dosis crecientes de acetilcolina , en anillos aórticos de ratas previamente incubadas durante 4 horas con 5,5 y 45mM de glucosa.

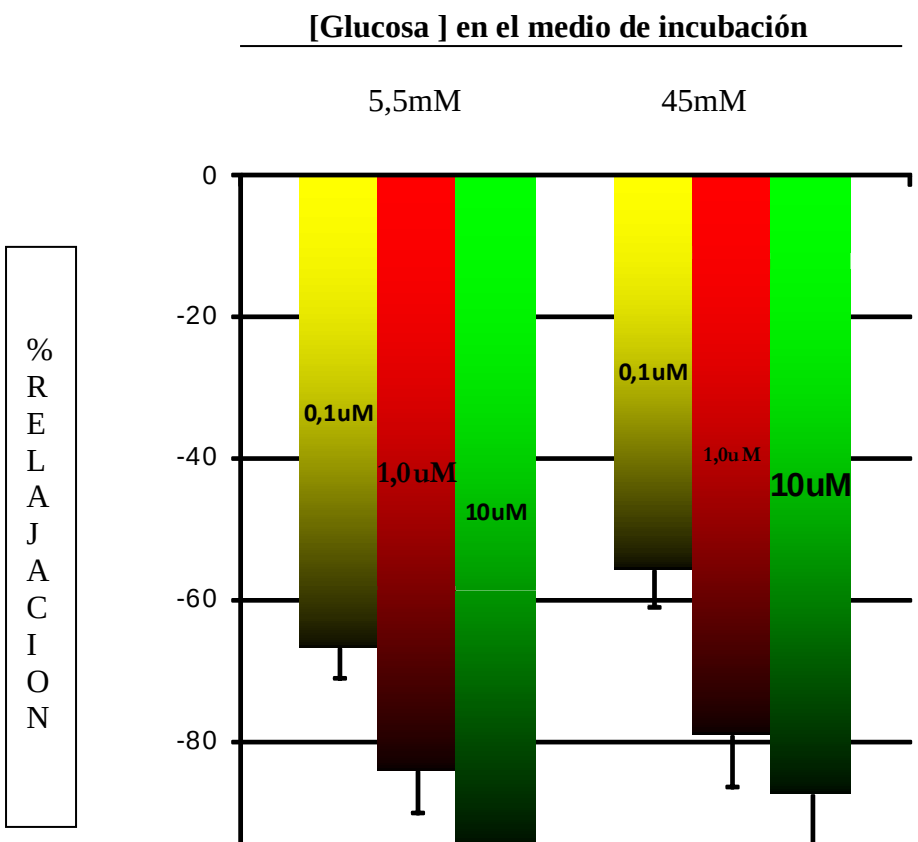
CUADRO No 7.

	Concentración de glucosa		
Concentración de ACh	5,5mM	45Mm	Prueba t
0,1µM X ± ES	66.8 ± 5,8	55,7 ± 5,7	n.s.
1,0µM X ± ES	84,2 ± 4,7	79,1 ± 6,5	n.s.

10µM X ± ES	95,3 ± 7,2	87,6 ± 7,2	n.s.
n	6	6	

- Los promedios se expresan en porcentaje de relajación ± el error estándar (ES).
- Las concentraciones de acetilcolina (ACh) se añadieron a los anillos previamente contraídos al 100% con una solución despolarizante de cloruro de potasio.
- Se compararon las medias con la prueba t de Student para datos pareados, con una exigencia del 99%
- n, tamaño de la muestra
- ns, no significativo

GRÁFICO No 6



En el grafico 6 :
Observamos que no existe una diferencia significativa en ambos grupos que fueron sometidos a vitamina E

DISCUSIÓN

La disfunción endotelial se considera actualmente como una de las primeras manifestaciones de múltiples enfermedades , con el avance de la investigación científica el endotelio dejo de ser una simple monocapa y convertirse en un verdadero órgano con múltiples funciones complejas .

Trabajos como la realizada por PALMER Y MONCADA quien descubren la existencia de un vasodilatador como el NO , trabajos de FURCHGOTT Y ZAWADZKI quien demostró experimentalmente que la acetilcolina en un vaso se une a receptores muscarínicos y tienen una acción sinérgica con el NO , nos sirvieron de base para la realización de este trabajo experimental .

Los anillos aórticos seccionados de ratas macho fueron incubados en una solución de krebs hensel para posteriormente ser sometidos a condiciones de temperatura, presiones de oxigeno, humedad y monóxido de carbono optimas , estas condiciones simulara lo

que realmente pasa en el endotelio in vivo presentando condiciones fisiológicas , donde la función vasodilatadora del endotelio se realiza de una manera normal ,

Al grupo control fueron sometidos en condiciones normales, a vasoconstricción producida por el KCL ,observándose una respuesta de mas del 50% en los primeros 2 minutos llegando a su contracción máxima a los diez minutos , posteriormente son sometidos a vasodilatación con acetilcolina en tres dosis crecientes , obteniéndose un porcentaje de relajación de 85.7 % . en esta primera parte del estudio evidencio la función normal de un endotelio sano a la respuesta vasodilatadora de la acetilcolina activando receptores muscarínicos , con un NO sin alteraciones y cumpliendo a cabalidad sus funciones .

Posteriormente se trabajo con el grupo experimental 1A ,observando que utilizando la ultima dosis de acetilcolina (10^{-7}) se evidencio que existe una diferencia altamente significativa en cuanto a su porcentaje de relajación concluyendo a dos horas de incubación en medio glucosado , los anillos sufren una disfunción endotelial manifestada en una perdida porcentual de la relajación.

Al grupo experimental 1 B : se evidencio que con la incubación en 4 horas en medio glucosado ,la disfunción endotelial se hace mas notoria, manifestada por una mayor perdida del porcentaje de relajación ,estos cambios se deben a que aumenta la expresión del eNOS generando productos como el superoxido , este a su vez puede unirse al NO activar la formación de peroxinitrito este se desdobla en OH Y NO2 . El primero con acción oxidante y así formar una reacción en cadena utilizando el NO como sustrato.

Posteriormente fueron incubados en 20 minutos de papaya arequipeña observando que el poder de vaso relajación se recupera en un 78.9% ,esto se refleja en el cuadro No5 . Estos cambios se deben que la papaya arequipeña presenta dentro de su contenido tanto a la vitamina E , beta carotenos , vitamina C que lo vuelven un producto natural con propiedades altamente oxidante, estos compuestos actúan en combinación : La vitamina E que evita la peroxidación de ácidos grasos, tiene la capacidad de transferir el hidrogeno fenólico a un radical peróxido libre quedando a la vez en forma de radical fenoxilo , actuando posteriormente la vitamina C interrumpiendo la reacción en cadena de los radicales libres , actuando sobre este radical fenoxi

Al grupo experimental 1C: Se observo que los anillos incubados en papaya arequipeña por 30 minutos no refleja una diferencia significativa en cuanto a su poder vasorelajante , con un porcentaje de vasodilatación en 80.1% , muy similar al grupo experimental 1B . Motivo por el cual se concluye que en un tiempo de 20 minutos la papaya arequipeña alcanza su máximo efecto antioxidante

Al grupo patrón formado por un antioxidante natural como es la vitamina E , se observo que el poder vasorelajador es de un 87.6 %, muy similar al observado con el grupo experimental 1B , concluyendo que la papaya arequipeña posee una actividad antioxidante muy similar a la vitamina E

.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

PRIMERA:
Se desarrollo disfunción endotelial en anillos aórticos , con la incubación en un medio de glucosa hipertónico por 4 horas , verificándolo con la perdida del poder vasodilatador a la acetilcolina .

SEGUNDA:
Se determinó el grado de disfunción endotelial a través de la comparación de la respuesta vasodilatador de los anillos sanos , con anillos oxidados , obteniendo un porcentaje de dilatación de: 83.9 y 60.2% respectivamente

TERCERA:
Se observo la respuesta vasodilatadora de los anillos incubados en papaya arequipeña a través de un porcentaje de vasodilatación en 78.9%

CUARTO:

Se comparo el poder antioxidante tanto de la papaya arequipeña como de la vitamina E ,observándose el porcentaje de vasodilatación en 78.9% y 87.6%

QUINTO:
Se determino el poder antioxidante de la papaya arequipeña , a traves de la recuperación del porcentaje de vasodilatación en anillos oxidados con glucosa al 45 mM

CAPITULO VI
RECOMENDACIONES:

Dentro de las recomendaciones podemos sugerir , la cuantificación de estos radicales libres que pudiesen dañar el endotelio , para saber con mayor precisión en que porcentaje se esta dañando dicho órgano .

Este trabajo podría orientarse en un punto de vista clínico, para el manejo y terapéutica tanto de transtornos metabólicos , vasculares , además para el manejo de una medicina preventiva . a través de una dieta rica en antioxidantes naturales , acompañados de una buena actividad física .

Difundir tanto al personal médico, como a nuestra sociedad de la importancia que tienen estos productos naturales , en nuestra salud .

CAPITULO

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

LIBROS

1. SÁNCHEZ VEGA, ISIDORO. Frutales andinos. Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú. 2010

2. DUTRA F, CRESPO R, COELHO MA, LANEUVILLE V. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. Braz J Pharmacogn. 2007;17(4);631-9.

3. RÍOS LEÓN, ROCÍO. Nivel de ansiedad en la remoción de caries dental utilizando el método químico-mecánico y el convencional en niños de 6 a 8 años de edad. Tesis (cirujano dentista). Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, facultad de odontología, E.A.P. DE ODONTOLOGÍA .2007

4. SÁNCHEZ VEGA, ISIDORO. La agricultura andina. Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.

http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap3_5.htm 2007

5. SÁNCHEZ ISIDORO Y TAPIA MARIO. Cultivos andinos. Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca, Perú.2007

6. GUTIERREZ S. J.: " ¿Qué sabe Ud. Acerca de radicales libres?", vol 37, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 2006.

7. CONCHA V, JOSE, GUEVARA P. AMÉRICO Y ARAUJO V. MIGUEL. Obtención de polvo de Papaya de monte *(Carica pubescens)* por atomización. Ingeniería UC. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. Vol.09. número 001.16p. ISSN (Versión impresa):1316-6832.2002.

8. WULF,D"Free radicals in the physiological control of cell function", Physiol Rev., núm. 82, 2002.

9. GILGUN-SHERKI Y, ROSENBAUM Z, MELAMED E, OFFEN D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. Pharmacol Rev. 2002;54:271-84.

10. HICKS GÓMEZ, J. J. Y R. S. MEDINA.: "Introducción a la bioquímica de los radicales libres". Mc Graw Hill Interamericana, México, 2001

11. GYTON ,ARTHUR CTratado de Fisiologia Medica ; Mexico Edit interamericana , 2001 10ma Edic Tomo 1

12. BERGENDI, L., L. BENES, Z. DURACKOVA Y M. FERENCIK.: "Chemistry, physiology and pathology of free radicals", Life Sciences, núm. 65, pp. 1865-1874, 1999.

13. BARRIOS G, DEL PORTILLO H, LEÓN J.: "Algunos aspectos biológicos del endotelio". Rev Col Cardiol; 6:151-157, 1998.

14. GOODMAN Y GILMAN “ Las Bases Farmacologicas de la terapeutica “ novena edicion volume 1 Edit Mc Graw –hill 1998

15. IQUIRA HUAMANI, ELMER. Inducción de callos de *Carica pubescens L.* (Papaya arequipeña), micropropagación de *Solanum tuberosum* L (papa) y *Ullucus tuberosus* L (ulluku), sobre gel de almidón. Tesis (Título Profesional de Biólogo). Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Escuela Profesional y Académica de Biología. Arequipa, Perú. 1996. 95p.

16. VANE JR, ANGGARD EE, BOTTING R. “Regulatory functions of the vascular endothelium”. N Engl Med; 323 (1): 27-36, 1990.

REVISTAS

17. MARGIALIZ PAITAN POMAREA“ efecto vasodilatador de diferentes extractos de allium sativum (ajo) sobre la musculatura lisa del tejido aórtico de animales de experimentación “ 2011 Revista UNSA Arequipa 2011

18. FERREIRA, MANUEL; CORREA, “Rol del endotelio en el efecto vasodilatador de la acetilcolina cuando el vaso aislado se somete a la acción contráctil de norepinefrina o de potasio / Role of endothelium in the vasodilator effect of the acetylcholine Puga, Claudio; Sousa, Yajaira de; Illanes, Alejandro. Gac. méd. Caracas;105(1):11-7, ene.-mar. 2006. Ilus

19. LUIS DÍAZ SOTO” Instituto Superior de Medicina Militar “Rev Cub Med Mil v.31 n.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2002, Daño oxidativo, radicales libres y antioxidante

20. PAUL M VANHOUTTE, LOUIS PERRAULT, JEAN PAUL VILAINE Institut the Recherches Internationales Servier, Curbevois. Francia, Disfunción endotelial y enfermedad vascular. 2001

21. GISELA PITA RODRÍGUEZ "Funciones de la vitamina E en la nutrición humana" 1998

22. Paz A. respuesta vasoconstrictora de la acetilcolina inducida por el estiramiento del tejido vascular aórtico de conejos" Rev UNSA Arequipa 1998

23. LEÓN, J. 1964. Plantas alimenticias andinas. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. *Boletín técnico N° 6, lima*

REFERENCIAS DEL INTERNET

24. Papaya arequipeña
http://www.rlc.fao.org/es/agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap3_5.htm#62.

25. Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2008000200004#tab04

26. Funciones de la vitamina E
http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol11_1_97/ali07197.htm

27. Daño oxidativo radicales libres antioxidantes
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-65572002000200009

28. FUNCION ENDOTELIAL: Fisiología, Disfunción, Estrés Oxidativo.
http://med.unne.edu.ar/catedras/anafisio/fisio/033.pdf.

29. Endotelio
www.fac.org.ar/edicion/inscac/cap06_2010.pdf

30. Estres oxidativo
www.ebookbrowse.com/estr-medios2-pdf-d225048755

31. Estrés oxidativo vascular , disfunción endotelial
www.revistanefrologia.com/revistas/P7.../P7-E180-S140-A1795.pdf

32. Oxidación y reducción"
http://*www.textoscientificos.com/quimica/inorganica/redox*

33. Oxidación y producción de radicales libres"
http://www.bio.puc.cl/vinsalud/boletin/22oxida.htm -

34. "Qué son los radicales libres"

http://www.lukor.com/ciencia/radicales_libres.htm

35. Experimentos sobre órganos aislados
http:/www.geocities.com/pharmacology_unal/Orgaislado.html

36. Disfunción endotelial
http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=55925203

OTRAS PUBLICACIONES

37. BARREDA CARBAJAL LUCIA DE LOS ANGELES *"Efecto antioxidante del carotenoide astaxantina obtenido del haematococcus pluviales sobre la vasodilatación de anillos aislados de aorta torácica de ratas inducidas a estrés oxidativo"* , por diabetes experimental " para optar el titulo de químico farmaceutico .asesor :DR AZAEL PAZ ALIAGA. UNSA AREQUIPA 2012

38. MARGIALIZ PAITAN POMAREA*" efecto vasodilatador de diferentes extractos de allium sativum (ajo) sobre la musculatura lisa del tejido aórtico de animales de experimentación "* 2011 para optar el titulo profesional de químico farmacéutico , asesor DR AZAEL PAZ ALIAGA. UNSA Arequipa 2011

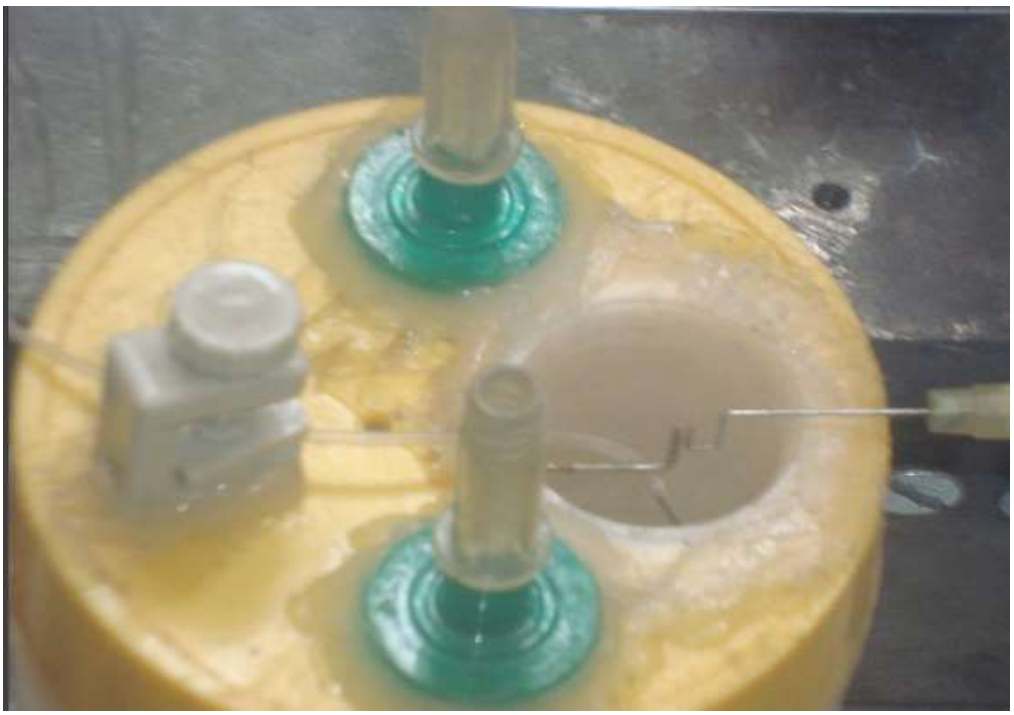
39. MARCOS ERNESTO VIZA DE OLAZABAL *"participación de radicales hidroxilo en la disfunción endotelial inducida con diabetes experimental atraves de la via no dependiente del endotelio en aorta de ratas"* tesis para optar el grado de magister en ciencias escuela de post grado de la facultad de medicina , asesor DR AZAEL PAZ ALIAGA . UNSA 2008

40. CARLOS JESÚS BUSTIOS ZAVALA "*Efecto de los radicales libres sobre la disfunción endotelial producida por la hiperglicemia aguda en tejido aórtico de ratas normales"***.** Para optar al Grado de: Maestro en Ciencias: Biomédicas .DR AZAEL PAZ ALIAGA . UNSA AREQUIPA 2008

ANEXO N^{O}1

CAMARA DE ORGANOS

Vista panorámica de la cámara de órganos



Ganchos donde se colocara el anillo

ANEXO 2

POLIGRAFO

Maquina donde se evidencia el patrón de vasoconstricción y vasorelajación a través de un papel milimetrado

ANEXO 3

RATAS ALBINAS MACHO

Se conto con 15 ratas albinas macho de 3 meses de edad especie rattus novergicus con un peso de 300 g , obtenidas del bioterio del CIDEC.

ANEXO 4

AORTA TORACICA

Una vez sacrificado las ratas se procedió a disecar la aorta torácica , para posteriormente , extraer anillos.