

11281
8
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

ESTUDIO FARMACOLOGICO Y QUIMICO DE LOS
METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA SEMILLA DE
Casimiroa edulis RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD
CARDIOVASCULAR EN ROEDORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(F A R M A C O L O G I A)

P R E S E N T A :

GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS (FARMACOLOGIA)



MEXICO, D. F.

1999

274248

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis

**ESTUDIO FARMACOLÓGICO Y QUÍMICO DE LOS METABOLITOS
SECUNDARIOS DE LA SEMILLA DE *Casimiroa edulis* RESPONSABLES
DE LA ACTIVIDAD CARDIOVASCULAR EN ROEDORES**

**Se realizó en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM; en el
Instituto de Química, UNAM y en el Departamento de Química de la Universidad de
Toronto, Ontario, Canadá.**

Bajo la dirección de:

Dr. Horacio Vidrio López
Farmacología

Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib
Química

y la asesoría de los Drs:

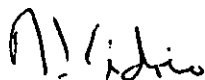
Dr. Enrique Hong Chong, Miembro del Comité Tutorial.
Dr. William F. Reynolds, Chemistry Department, University of Toronto, Canadá.

Financiada por la UNAM con becas de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico
DGAPA-IN214094 y la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Facultad de
Medicina **PADEP-012314**.

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dr. Juan José Mandoki Weitzner
Secretario: Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Primer vocal: Dr. Horacio Vidrio López
Segundo vocal: Dr. Enrique Hong Chong
Tercer vocal: Dr. Francisco Javier Espinoza García
Suplente: Dr. Raúl Guillermo Enriquez Habib
Suplente: Dr. Luis Felipe Montaña Estrada

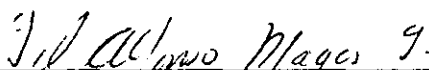
Asesores de la Tesis



Dr. Horacio Vidrio López
Farmacología



Dr. Raúl Guillermo Enriquez Habib
Química



Sustentante
Gil Alfonso Magos Guerrero

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sincero agradecimiento al Dr. Horacio Vidrio López y al Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib, por sus enseñanzas y guía a lo largo de varios años. Por la confianza y la libertad que me dispensaron, sin las cuales, no era posible aventurarse en este proyecto. Gracias también por su apoyo que facilitó alcanzar los objetivos.

Agradezco de igual modo al Dr. Enrique Hong Chong que como miembro del comité tutorial, dedicó su tiempo revisando el escrito y los ejercicios académicos que se presentaron periódicamente. Gracias por sus atinados y enriquecedores comentarios.

Hago un expreso reconocimiento a los miembros del jurado, por sus valiosas observaciones que permitieron la conformación final de esta tesis doctoral.

Al Dr. William F. Reynolds por su interés para elucidar con su vasto conocimiento y extraordinaria experiencia, las estructuras moleculares de una mezcla compleja.

A los Drs. Marte Lorenzana Jiménez y Luis Javier Nieves Silva por compartir el esfuerzo de adentrarse en el inmenso campo de las plantas medicinales. Gracias maestros por su minuciosa revisión al escrito y sobre todo por su amistad.

Al Q.I. Fernando Jáuregui Zavala por los estudios de espectrometría de masas realizados en su laboratorio. Al Dr. Dino Gnecco Medina por sus valiosos comentarios. Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por sus comentarios que facilitaron mi entendimiento de conceptos botánicos y químicos.

Se agradece al Dr. Luis Felipe Montaña Estrada por sus atinadas observaciones sobre la interpretación de la dosis treinta y el manejo estadístico de los resultados.

A la Dra. Hilda Araceli Zavaleta Mancera por haberme facilitado la adquisición del material biológico. Al Sr. José García Pérez por su amable y desinteresada ayuda en la comprobación de la especie taxonómica.

Agradezco al personal del Instituto de Química de la UNAM: Q.F.B. Rocío Patiño Maya, I.Q. Luis Velazco Ibarra, Q. Atilano Gutiérrez, M. en C. Rubén Gabiño Ramírez, M. en C. Isabel Chávez Uribe, y al M. en C. Javier Pérez Flores por haber obtenido varios de los espectros. Asimismo, al M. en C. Rubén Alfredo Toscano por haber realizado el estudio de difracción por Rayos X de una de las sustancias.

A las autoridades del Departamento de Química de la Universidad de Toronto, Ontario, Canadá por todo el apoyo brindado.

A mi Universidad, UNAM, por su siempre generoso magisterio. A las autoridades de la Facultad de Medicina, del Departamento de Farmacología y del Instituto de Química por permitir llevar a cabo este trabajo.

A DGAPA y a PADEP, dependencias de la UNAM que financiaron estos estudios a través de becas. Al personal de bibliotecas por su paciente atención. Al personal del bioterio de la Facultad

de Medicina por su constante y puntual apoyo. Al personal administrativo del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM, particularmente al Sr. Pedro Trujillo Segovia, a la Sra. Concepción Hernández Palacios y a la Sra. Estela Estrada Gutiérrez por su asistencia

GRACIAS A DIOS Y A MI FAMILIA POR HABERME ENSEÑADO A VALORAR LA VIDA

ÍNDICE

	Página
I. LISTA DE FIGURAS	i
II. LISTA DE TABLAS	iii
III. LISTA DE ESPECTROS	v
IV. LISTA DE ABREVIATURAS	vi
V. RESUMEN	ix
VI. SUMMARY	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES DE LA <i>Casimiroa edulis</i>	
2.1 Botánicos	5
2.2 Etnobotánicos	6
2.3. Farmacológicos	7
2.4. Químicos	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
4. HIPÓTESIS DE TRABAJO	16
5. OBJETIVOS	17
6. MATERIAL Y MÉTODO	
6.1. Recolección y comprobación taxonómica del fruto de la <i>Casimiroa edulis</i>	18
6.2. Estudio químico de la semilla:	
6.2.1 Preparación de extractos por procedimientos de maceración, reflujo y extracción rápida, con diferentes disolventes orgánicos	18
6.2.2. Fraccionamiento y análisis cromatográfico del extracto metanólico	19
6.2.3. Identificación de las estructuras químicas de las sustancias activas, por Infrarrojo, Masas, Resonancia Magnética Nuclear de Protones y Difracción de Rayos x	20
6.2.4. Reactivos empleados para la extracción y análisis cromatográfico de las fracciones activas	21
6.3. Estudio farmacológico:	

6.3.1.	Preparación de ratas y cobayos anestesiados para el registro directo de la presión arterial media y de la frecuencia cardíaca	21
6.3.2.	Fármacos empleados para caracterizar la actividad cardiovascular de las sustancias aisladas	22
6.3.3.	Análisis estadístico	22

7. RESULTADOS

7.1. Químicos:

7.1.1.	Rendimiento de nueve extractos obtenidos de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> con diferentes disolventes orgánicos, por procesos de maceración, reflujo y extracción rápida	24
7.1.2.	Sustancias identificadas en las fracciones activas aisladas del extracto metanólico	24
7.1.2.1.	Análogos de la Histamina: N-monometilhistamina (MMH) y N,N-dimetilhistamina (DMH)	28
7.1.2.2.	Análogo de Sinefrina: Acetónido de Sinefrina (AS)	35
7.1.2.3.	N-metilprolina (MP), prolina (P) y ácido gama amino butírico (GABA)	39
7.1.2.4.	Casimiroedina (CAS)	41

7.2. Farmacológicos:

7.2.1.	Efectos cardiovasculares de los nueve extractos	43
7.2.2.	Efectos cardiovasculares del extracto alcohólico completo comparados con la histamina (H)	44
7.2.3.	Influencia del pretratamiento con difenhidramina o cimetidina, sobre los efectos cardiovasculares del extracto alcohólico y de la histamina	45
7.2.4.	Efectos cardiovasculares de histamina, N-monometilhistamina y N,N-dimetilhistamina	48
7.2.5.	Influencia del pretratamiento con loratadina o cimetidina, sobre los efectos cardiovasculares de histamina, N-monometilhistamina y N,N-dimetilhistamina	50
7.2.6.	Influencia del pretratamiento con fenilefrina y el éster metílico de N- ω -nitro-L-arginina (L-NAME), sobre los efectos cardiovasculares de histamina, N-monometilhistamina y N,N-dimetilhistamina	53
7.2.7.	Efectos cardiovasculares comparativos entre la sinefrina (S) y el acetónido de sinefrina (AS).....	57
7.2.8.	Influencia del pretratamiento con atropina, prazosina o propranolol sobre los efectos cardiovasculares de la sinefrina y del acetónido de sinefrina	58

7.2.9.	Efectos de la mezcla natural de metilprolina, prolina y ácido gama amino butírico sobre la presión arterial media y la frecuencia cardiaca	60
7.2.10.	Efectos de Casimiroedina sobre la presión arterial media y la frecuencia cardiaca	62
8.	DISCUSIÓN	63
8.1.	Influencia de la dimetilhistamina y la monometilhistamina en la hipotensión arterial producida por el extracto metanólico	71
8.2.	Hipotensión arterial transitoria producida por histamina, dimetilhistamina y monometilhistamina. Participación del óxido nítrico	74
8.3.	Taquicardia producida por dimetilhistamina y monometilhistamina. Participación del óxido nítrico	79
8.4.	Influencia del acetónido de sinefrina, en los efectos de hipertensión y taquicardia producidos por el extracto metanólico	80
8.5.	Influencia del acetónido de sinefrina en la hipotensión producida por el extracto metanólico	83
8.6.	Influencia de metilprolina, prolina y ácido gama amino butírico en la hipotensión sostenida producida por el extracto metanólico	84
8.7.	Hipotensión sostenida producida en el cobayo anestesiado por la casimiroedina	85
	Perspectivas en la investigación de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i>	87
9.	CONCLUSIONES	88
10.	REFERENCIAS	90

II. LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I	Rendimiento en % de los compuestos obtenidos a partir de 100 kg de semilla de <i>C. edulis</i> . Tomado de Kincl y col., 1956	13
Tabla II	Rendimiento en % de los extractos obtenidos a partir de 100 g de semilla de <i>Casimiroa edulis</i> con disolventes orgánicos, mediante tres procedimientos de extracción	24
Tabla III	Asignaciones finales obtenidas de los espectros de hidrógeno y carbono trece para el ácido gama amino butírico	39
Tabla IV	Asignaciones finales obtenidas de los espectros de RMN de hidrógeno y carbono trece para L-Prolina	40
Tabla V	Asignaciones finales obtenidas de los espectros de RMN de hidrógeno y carbono trece para N-Metil-Prolina	40
Tabla VI	Asignaciones finales obtenidas de los espectros de RMN de hidrógeno y carbono trece para cada uno de los isómeros de Casimiroedina	43
Tabla VII	Efectos máximos producidos en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas, por extractos obtenidos con disolventes orgánicos de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> mediante tres procedimientos de extracción	44
Tabla VIII	Valores iniciales de la presión arterial media y de la frecuencia cardíaca, obtenidos de diferentes grupos experimentales de ratas anestesiadas, antes de administrar las sustancias imidazólicas	48
Tabla IX	Valores iniciales de la presión arterial media y de la frecuencia cardíaca, obtenidos en diferentes grupos experimentales de ratas anestesiadas, antes de ministrar los tratamientos	50
Tabla X	Dosis que disminuyen 30 mm Hg la presión arterial media, obtenidas en ratas tratadas con sustancias imidazólicas, previa administración de solución salina o de sustancias antihistamínicas	52
Tabla XI	Dosis que incrementan 30 lat/min la frecuencia cardíaca, obtenidas en ratas tratadas con sustancias imidazólicas, previa ministración de solución salina y de sustancias antihistamínicas	53
Tabla XII	Valores iniciales de la presión arterial media y de la frecuencia cardíaca de diferentes grupos de ratas anestesiadas, obtenidos antes y durante la infusión i.v. de fenilefrina	55
Tabla XIII	Dosis de tres sustancias imidazólicas, que disminuyen la presión arterial media en 30 mm Hg, calculadas antes y después de la ministración del éster metílico N- ω -nitro-L-arginina, en ratas tratadas con infusión i.v. de fenilefrina	57
Tabla XIV	Valores iniciales de presión arterial media y frecuencia cardíaca de ratas pretratadas con antagonistas de receptores adrenérgicos y del receptor muscarínico	59

Tabla XV	Efectos sobre la presión arterial media de la rata y del cobayo, producidos por cada uno de los agrupamientos activos separados del extracto metanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> . Las sustancias anotadas, se aislaron al recromatografiar cada residuo en columna y en capa fina preparativa	67
Tabla XVI	Actividad cardiovascular referida para cada una de las siete sustancias aisladas de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i>	70

I. LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Compuestos identificados en la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> , antes de la presente investigación 14
Figura 2	Estructuras de los recientes compuestos identificados en la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> y estudiados en el presente trabajo 26
Figura 3	Separación cromatográfica en placa fina, de siete compuestos aislados recientemente del extracto metanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> 27
Figura 4	Representación estructural enumerada de los dos isómeros de Casimiroedina aislados del extracto metanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> 42
Figura 5	Efectos producidos por el extracto alcohólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> , comparados con los efectos de la histamina, sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas 45
Figura 6	Influencia del pretratamiento con difenhidramina o cimetidina, sobre los efectos producidos por el extracto etanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> y por la histamina, en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas (Dunnett: *p < 0.05) 47
Figura 7	Comparación de los efectos producidos por la histamina, N-monometilhistamina y N,N-dimetilhistamina, sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas 49
Figura 8	Influencia del pretratamiento con loratadina o cimetidina, sobre los efectos producidos por histamina, monometilhistamina y dimetilhistamina, en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas (Dunnett: *p < 0.05) 51
Figura 9	Influencia de la infusión de fenilefrina y del pretratamiento con el éster metílico de N- ω -nitro-L-arginina, sobre los efectos producidos por histamina en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas (t pareada: *p < 0.05) 54
Figura 10	Influencia de la infusión de fenilefrina y del pretratamiento con el éster metílico de N- ω -nitro-L-arginina, sobre los efectos producidos por histamina, N-monometilhistamina y N,N-dimetilhistamina, en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas (t pareada: *p < 0.05) 56
Figura 11	Comparación de los efectos producidos por el acetónido de sinefrina y la sinefrina, sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas pretratadas con atropina 58
Figura 12	Influencia del pretratamiento con atropina, propranolol o prazosina, sobre los efectos producidos por la sinefrina y el acetónido de sinefrina, en la presión arterial media y en la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas (Dunnett: *p < 0.05) 60

Figura 13	Efecto de la mezcla natural de metilprolina, prolina y del ácido gama amino butírico, sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca de ratas anestesiadas. (t no pareada: *p < 0.05)	61
Figura 14	Efecto de casimiroedina, sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca de cobayos anestesiados. (t no pareada: *p < 0.05)	62
Figura 15	Mecanismo de acción desencadenado al estimular el receptor H ₁ localizado en las células endoteliales de los vasos de resistencia	76
Figura 16	Mecanismo de acción desencadenado al activar la guanilato ciclasa con el óxido nítrico liberado de las células endoteliales que revisten los vasos de resistencia	77
Figura 17	Estructuras moleculares y dosis treinta de la histamina y de sus análogos imidazólicos aislados de la semilla de <i>C. edulis</i>	79
Figura 18	Síntesis del acetónido de sinefrina a partir de sinefrina. Reacción realizada teóricamente en la <i>Casimiroa edulis</i>	82
Figura 19	Diferencias estructurales entre monometil histamina y casimiroedina. Dos sustancias con núcleo imidazólico aisladas de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> .	86

III. LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro 1a Resonancia Magnética Nuclear de protones (500 MHz) de una fracción separada del extracto metanólico de la semilla de <i>C. edulis</i> , que produce hipotensión arterial transitoria en la rata anestesiada. Espectro amplificado	29
Espectro 1b Resonancia Magnética Nuclear de protones (500 MHz) de una fracción separada del extracto metanólico de la semilla de <i>C. edulis</i> , que produce hipotensión arterial transitoria en la rata anestesiada. Espectro completo	30
Espectro 2 Espectro de infrarrojo obtenido en película de la monometilhistamina aislada del extracto metanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i>	32
Espectro 3 Espectro de masas obtenido por impacto electrónico de la monometilhistamina aislada del extracto metanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i>	33
Espectro 4 Espectro de infrarrojo obtenido en película de la dimetilhistamina aislada del extracto metanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i>	34
Espectro 5 Espectro de masas obtenido por impacto electrónico de la dimetilhistamina aislada del extracto metanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i>	35
Espectro 6 Resonancia Magnética Nuclear de protones (300 MHz) del acetónido de sinefrina aislado del extracto metanólico de la semilla de <i>Casimiroa edulis</i> , el cual produce hipertensión arterial transitoria en la rata anestesiada	37
Espectro 7 Correlación homonuclear de hidrógeno del acetónido de sinefrina aislado del extracto metanólico de la semilla de <i>C. edulis</i>	38
Espectro 8 Resonancia Magnética Nuclear de protones (500 MHz) de una mezcla de sustancias separadas del extracto metanólico de la semilla de <i>C. edulis</i> , que produce hipotensión arterial transitoria en la rata anestesiada	41

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

AA	=Ácido araquidónico
AC	=Adenilato ciclasa
ANOVA	=Análisis de varianza
AMPc	=Adenosín monofosfato cíclico
AS	=Acetónido de sinefrina
ATP	=Adenosín trifosfato
C	=Carbono
C.	= <i>Casimiroa</i>
CAS	=Casimiroedina
CC	=Cromatografía en columna
CCF	=Cromatografía en capa fina
COSY	=Correlated Spectroscopy =Correlación Homonuclear de hidrógeno
CCLM	=Cinasa de cadenas ligeras de miosina
D ₃₀	=Dosis 30
δ	=Desplazamiento químico en partes por millón
DEPT	= <i>"Distorsionless enhancement by polarization transfer"</i> Incremento en las distorsiones a través de transferencias de polarización de energía
DG	=Diacilglicerol
DMH	=Dimetilhistamina
EMeOH	=Extracto metanólico
EMIE	=Espectros de masas por impacto electrónico
ε	=Constante dieléctrica

eV	=Electrón/voltios
FLA ₂	=Fosfolipasa A ₂
FLC	=Fosfolipasa C
FC	=Frecuencia cardíaca
g	=gramo
GC	=Guanilato ciclasa
GABA	=Acido gama amino butírico
gem	=gemelo
GDP	=Guanosindifosfato
GMPc	=Guanosinmonofosfato cíclico
GTP	=Guanosintrifosfato
Hg	=Mercurio
H	=Histamina
HMQC	= "Heteronuclear multiple quantum coherence" Correlación heteronuclear a través de coherencia múltiple cuántica
HMBC	= "Heteronuclear multiple bond correlation" Correlación heteronuclear a través de varios enlaces
Hz	=Hertz
hs	=horas
IP ₃	=Inositol 1,4,5-trifosfato
IR	=Infrarrojo
kg	=kilogramo
lat	=latido
L-NAME	=éster metílico de N- ω -nitro-L-arginina
MHz	=Mega Hertz
mm	=milímetro
min	=minutos
MMH	=Monometilhistamina

m/z	=masa/carga
MP	=Metilprolina
ON	=óxido nítrico
p	=probabilidad
P	=Prolina
PAM	=Presión arterial media
PAS	=Presión arterial sistémica
PCC	=Proteíncinasa C
ppm	=partes por millón
PIP ₂	=fosfatidilinositol 4,5 bifosfato
RMN	=Resonancia Magnética Nuclear
S	=Sinefrina
SON	=Sintasa de óxido nítrico
Sp	=Especie no reportada
TOCY	="Total correlation spectroscopy" Espectroscopia de correlación total
ZB	=Zapote blanco

V. RESUMEN

Casimiroa edulis, planta llamada popularmente zapote blanco, se ha empleado desde tiempos prehispánicos en la medicina tradicional mexicana, y por más de 60 años, como "remedio" antihipertensivo. La ministración del extracto hidroalcohólico obtenido de las hojas y semillas de dicha planta, produce en diferentes especies de animales incluyendo al ser humano, importante hipotensión arterial sistémica. A pesar de la escasa investigación química y farmacológica sobre dicho efecto, se ha postulado desde hace cuatro décadas que el derivado imidazólico identificado como N-N dimetilhistamina, es el único constituyente responsable de la hipotensión arterial. Sin embargo, existen diversas observaciones que no apoyan totalmente esta explicación y que han dado origen a hipótesis alternativas. En el presente trabajo, realizado con el extracto metanólico obtenido de la semilla de *C. edulis*, se aislaron e indentificaron 7 compuestos que exhiben actividad sobre el sistema cardiovascular. Estos pertenecen a los grupos químicos conocidos como: 1) derivados imidazólicos 2) aminoácidos y 3) oxazolidina. Del primer grupo, se obtuvieron los análogos de la histamina: N-N dimetilhistamina y N monometilhistamina, y el glucoalcaloide casimiroedina, tres sustancias que ya han sido descritas químicamente en la semilla de la planta, pero se carece de información farmacológica sobre sus efectos. Del segundo grupo, se identificó en una zona cromatográfica de alta polaridad a tres sustancias: metilprolina, prolina y GABA, que no han sido descritas en las plantas del género de las Casimiroas. Del tercer grupo, únicamente se obtuvo un nuevo compuesto denominado acetónido de sinefrina.

Los efectos cardiovasculares de cada uno de los siete compuestos aislados, se investigan en esta tesis mediante registros poligráficos de presión arterial media directa y frecuencia cardíaca de ratas y cobayos anestesiados. Los resultados obtenidos indican que los derivados imidazólicos, análogos de la histamina, producen hipotensión arterial transitoria mediada por receptores histaminérgicos H_1 . En el caso de la N, N-dimetilhistamina, la hipotensión probablemente se debe a la liberación de óxido nítrico; mientras que la hipotensión producida por la N-monometilhistamina, probablemente sea una acción directa sobre el músculo liso vascular. Además, observamos que la casimiroedina carece de acciones en la rata normotensa, pero produce hipotensión arterial sostenida en el cobayo anestesiado. Por otra parte encontramos que la mezcla natural de los tres aminoácidos identificados de una zona cromatográfica homogénea, produce importante hipotensión prolongada. Este hallazgo cuestiona la hipótesis original de que una sola sustancia sea la responsable del efecto hipotensor. Por último, se observa que el compuesto denominado acetónido de sinefrina, produce hipertensión y taquicardia mediadas por los receptores α y α - β adrenérgicos, respectivamente. Los resultados de esta investigación apoyan la idea de la participación de más de una sustancia en los efectos cardiovasculares producidos por el extracto metanólico de la semilla de *C. edulis*.

VI. SUMMARY

Seven constituents of *Casimiroa edulis* which possess cardiovascular activity as determined by bioguided fractionation of the methanolic extract were isolated from the seeds. These compounds were identified as N,N-dimethylhistamine (DMH), N-monomethylhistamine (MMH), N-methylproline (MP), proline (P), N-methyl- γ -amino butyric acid (GABA), casimiroedine (CAS), and synephrine acetone (AS). The latter was identified as a compound not known previously in this plant. In anesthetized rats, DMH and MMH produced a transient hypotension and tachycardia in a dose-dependent manner. The transient hypotensive effect of both histamine derivatives, was antagonized by loratadine (histamine H₁-receptor antagonist). However, the nitric oxide (NO)-synthase inhibitor (NG-nitro-L-arginine methyl ester L-NAME), only antagonizes the hypotension produced by DMH. In addition, AS produces transient hypertension and tachycardia, mediated via α - and β adrenergic receptors, respectively. MP, P and GABA were found in a well defined homogeneous chromatographic zone which induces in the anesthetized rat, a strong long lasting hypotensive action. Finally, CAS has no effect on normotensive rat, but decreases blood pressure persistently in anesthetized guinea pig. Therefore, the immediate effect can be attributed to the histamine derivatives acting on H₁-receptors and more prolonged hypotension would be produced by the mixture of amino acids through an unknown mechanism, as well as by casimiroedine, possibly by activation of H₃-receptors. Also, hypotension is partially offset by synephrine acetone through adrenergic mechanisms. It can be postulated that the observed hypotensive effect of alcoholic extracts of *C. edulis* is caused by the simultaneous action of several active compounds.

1. INTRODUCCIÓN

En los Estados Unidos Mexicanos, en el año de 1995 las enfermedades del corazón constituyeron la principal causa de mortalidad general con una tasa de 70.4 por cada 100, 000 habitantes, cerca de las dos terceras partes de los decesos (tasa de 43.2), corresponde a las enfermedades isquémicas (Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud, 1997). En esta patología, la hipertensión arterial sistémica (HAS), es el factor directo más importante que determina la aparición, evolución y pronóstico de la cardiopatía. La HAS en el ser humano, es uno de los problemas de mayor importancia en la salud pública mundial. En Latinoamérica, la prevalencia de esta enfermedad tiende a ser de igual magnitud a la referida para los países desarrollados (Ribeiro, 1993). Desafortunadamente en el 90 al 95% de los hipertensos, la etiología es desconocida, razón por la cual su tratamiento es fundamentalmente paliativo y en gran parte se basa en el uso de sustancias con las que se busca mantener la presión arterial dentro de un rango de valores normales.

No obstante la existencia de numerosos medicamentos antihipertensivos, gran parte de la población mexicana tanto de zonas rurales como urbanas, emplean plantas para mitigar uno o varios de los síntomas que en ocasiones acompañan a la HAS (Instituto Nacional Indigenista, 1994). La terapéutica con plantas, ha sido practicada desde tiempos inmemoriales y en México a principios de este siglo constituía la base de la prevención y curación de la mayoría de las enfermedades más frecuentes (Díaz, 1977). Con el progreso de la industria químico farmacéutica y el incremento de la síntesis de nuevos productos, el interés científico por la flora de interés medicinal disminuyó drásticamente. En la ciudad de México, los estudios multidisciplinarios de la

herbolaria nacional que se realizaban durante la época porfirista en el extinto Instituto Médico Nacional, se vieron truncados con la "nueva" concepción posrevolucionaria de la terapéutica médica, la cual se basó en el consumo de principios activos sintetizados en los laboratorios farmacéuticos (Lozoya, 1994). Ante la necesidad de mejores recursos terapéuticos, en las últimas tres décadas del siglo actual, ha resurgido la demanda popular por plantas medicinales. Países como Alemania, Francia, Inglaterra, Suiza e Italia, conocedores de este fenómeno, utilizan mayores recursos económicos para desarrollar y producir, con métodos biotecnológicos sofisticados, formulaciones herbolarias que permitan abrir un nuevo mercado de productos medicinales de origen natural (Lozoya, 1994). La información científica sobre este campo se ha incrementado notoriamente; sin embargo, para una gran cantidad de extractos y sustancias de origen vegetal, no se cuenta con los estudios preclínicos y/o clínicos que permitan reconocer científicamente sus propiedades medicinales y tóxicas. De las 250, 000 a 750, 000 especies de plantas superiores que existen en el planeta, actualmente cerca del 10%, son utilizadas en la medicina tradicional y sólo el 1% de esta flora es empleada en forma de extractos crudos (lo que equivale a 250 a 750 especies), a las cuales se les ha comprobado científicamente su efecto real (Farnsworth, 1993).

De las 25, 000 a 75, 000 especies de plantas registradas en el mundo, en la República Mexicana, la más reciente información registra 3, 000 con propiedades medicinales. La evaluación de 1, 000 de estas especies, bajo diseños experimentales específicos, detectó actividad biológica en 524. Los resultados generales de estas especies activas, indican que la actividad antibiótica e hipotensora son las más predominantes, encontrándose la primera en 158 especies y la segunda en 58 (Instituto Nacional Indigenista, 1994). El análisis de la información científica sobre las

especies referidas como hipotensoras, revela la ausencia de investigación interdisciplinaria detallada que permita reconocer los principios activos y los mecanismos de acción responsables de dicho efecto. Ante esta situación, la presente investigación pretende acercarse al conocimiento químico farmacológico de la *Casimiroa edulis*, una de las plantas más utilizadas por la población mexicana para el control de la HAS. Esta planta, conocida popularmente como zapote blanco (ZB), es la única de las especies identificadas del género *Casimiroa*, que cuenta con investigaciones etnobotánicas, químicas y farmacológicas realizadas por varios e importantes grupos de investigadores nacionales y extranjeros, que así lo señalan (Lozoya y Enríquez, 1981).

A pesar de la carencia de investigaciones interdisciplinarias sistematizadas, la investigación química realizada desde 1893 hasta 1984 con las hojas, corteza y semillas de la *C. edulis*, ha identificado la presencia de varias sustancias, de las cuales la N,N-dimetilhistamina se propuso como la única sustancia activa responsable del efecto hipotensor. Sin embargo, el análisis detallado de los datos farmacológicos existentes (Major y Dürsch, 1958; Ling, P'an y Hochstein, 1958; Lozoya y col., 1977; Lozoya y col., 1998; Mágos y Vidrio, 1991; Vidrio y Magos, 1991), plantea la duda si en realidad la N,N-dimetilhistamina es la única sustancia activa sobre el sistema cardiovascular y si los mecanismos de acción propuestos para explicar el efecto hipotensor son correctos. Con estas interrogantes, se inició la presente tesis con el fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico (EMeOH) de la semilla del ZB y se continuó hasta aislar e identificar las estructuras químicas que modifican la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC) de la rata y del cobayo anestesiados. Además, con algunas de las sustancias identificadas, se realizaron los estudios farmacológicos pertinentes, para proponer los mecanismos de acción responsables de la actividad cardiovascular observada con las sustancias puras y con el extracto

completo. Se considera que el presente trabajo, aporta información científica que sirve para entender parte del complejo mundo de las plantas medicinales y propone una perspectiva para futuros estudios sobre esta planta.

2. ANTECEDENTES DE LA *Casimiroa edulis*

2.1 Botánicos

La *Casimiroa edulis* (Llave et Lex) comúnmente llamada ZB, es un árbol de la familia Rutaceae nativa de México que crece en zonas subtropicales y templadas desde el norte de México hasta Nicaragua. Al parecer también se ha introducido en California, Florida, Argentina, Brasil, el Mediterráneo y la India (Popenae, 1920; Martínez, 1951; Morton, 1962; Ochse y col., 1965 y Rizvi y col., 1985). Su posición taxonómica según Engler, es la siguiente: subfamilia: Toddalleae, subtribu: Toddalinae, género: *Casimiroa*, especie: *edulis* (Engler, 1931). La nomenclatura de género y especie se atribuye a los botánicos mexicanos Pablo de la Llave y Juan Martínez Lexarza, cuyas descripciones originales se encuentran en el Fascículo II p. 9 del *Novorum Vegetabilium Descriptionis* de 1825 (De la Llave y Martínez Lexarza, 1825). Las flores son fragantes de olor sui generis, de color amarillo verdoso o blanquecinas. Sus frutos maduros son globosos o ligeramente alargados, de color verde amarillento y llegan a medir hasta 10 cm de diámetro. La pulpa o mesocarpo es blanca, con numerosas glándulas de aceite de origen lisígeno y suele consumirse por su sabor dulce y agradable. El fruto maduro, contiene de uno a cinco semillas cubiertas por una capa coriácea, fibrosa y dura llamada endocarpo. Las semillas son ovoides ligeramente aplanadas en una de sus caras y miden de 3 a 4 cm de largo por 1.5 a 2.5 cm de ancho. La cubierta seminal es lisa, delgada, lustrosa y de color pardo claro; en ella se distinguen dos zonas: una llamada paquicalaza que ocupa alrededor del 70 % de su superficie y la otra llamada testa que cubre el 30 % de la superficie restante. El 86 % del volumen total de la semilla, está formado por dos cotiledones grandes y gruesos que contienen glándulas de aceite lisígenas,

granos de almidón y de proteína (Zavaleta, 1989). En la información existente hasta la fecha, no se puede precisar el número de especies que se reconocen para el género, sin embargo la *C. edulis* y la *C. zapota* son las más conocidas, cultivadas y parecidas, quizás por tratarse de especies arbóreas con frutos grandes y comestibles. El término ZB, probablemente corresponde al cochitzapotl de los aztecas (cochi: dormir, tzapotl: fruto carnosos dulces), y ha sido utilizado indistintamente para referirse a *C. edulis* y a *C. zapota*, originando la duda de cuál de ellas fue la estudiada en aquellos trabajos que carecen de clasificación taxonómica y dan por hecho que se trataba de la especie *edulis* (Lozoya y Enríquez, 1981). A pesar que en varios estados de la República Mexicana, es común encontrar ZB en forma silvestre o cultivado en huertos familiares y sus frutos puestos a la venta en mercados populares, no parece ser que se cultive con fines netamente comerciales.

2.2 Etnobotánicos

Las hojas y las semillas de *C. edulis* se han usado durante siglos en la medicina tradicional mexicana como sedantes e hipnóticos (Martínez, 1944) y más recientemente como agentes antihipertensivos. El ZB, con suma frecuencia se emplea en la zona centro del país: Estado de México (Bringas, 1988), Hidalgo (Barquín y Zamora, 1991), Michoacán (Flores, 1987; Reyes, 1989; Suárez, 1990), Morelos (Avilés, 1985; Cedillo, 1990; Matosic, 1991) y Puebla (Castro, 1988; Gutiérrez, 1985; Linares, 1991), para el tratamiento de la hipertensión arterial, conocida comúnmente en estos lugares como "presión alta". También se ha informado su consumo como antihipertensivo en el sur del país, por ejemplo Chiapas (Maldonado y Heras, 1990). Para tal indicación, se recomienda tomar en ayunas cada tercer día, la infusión de las hojas de esta planta o

comer un fruto después de cada comida hasta tener la presión normal. La infusión también se prepara añadiendo hojas de chayote (*Sechium edule*) y alpiste (*Phalaris canarceasis*) o sólo con cáscara de tomate verde (*Physalis sp.*).

Otros usos medicinales señalan que la decocción de hojas ó de semillas y el fruto del ZB, suelen emplearse contra el insomnio o como "reguladores del sueño". Los informantes refieren que la ingestión del té o del fruto más que provocar el sueño, lo facilitan. Se indica la ingesta de esta planta, después del último alimento y de preferencia una a dos horas antes de irse a dormir; esto bastará para poder dormir durante toda la noche (Barquín y Zamora, 1991). Por otra parte, se aconseja utilizar el cocimiento de las hojas para preparar infusiones y ministrirlas por vía oral para tratar la diabetes o por vía local para dar baños de "mujer" después del parto (Avilés, 1985). Para dolores artríticos se ocupa el cocimiento de la corteza, hoja o semilla y para quitar los cólicos se utiliza la infusión de la semilla. Otros usos populares del ZB son: "reumas", dolores del riñón , afecciones del corazón, "nervios", dolor de cabeza y de muelas, fiebre, mareos . Incluso se le emplea como diurético (Avilés, 1985; Cedillo, 1990; Matosic, 1991).

2.3 Farmacológicos: sobre el efecto hipotensor de la planta

En el Instituto Médico Nacional, se realizó la primera investigación preclínica del ZB. Los resultados, publicados en los Anales de dicho Instituto, describen minuciosamente las alteraciones de diferentes aparatos y sistemas, producidas por un extracto hidroalcohólico de la semilla de *C. edulis*. En el sistema circulatorio de la rana se menciona el efecto de bradicardia, en la oreja del conejo se señalan los efectos de vasodilatación periférica con repleción venosa y sin establecerse la especie animal estudiada, por primera vez se informa de "baja de tensión" (Anónimo, 1897).

Teniendo en cuenta que la metodología experimental de aquella época se basaba prácticamente en la descripción del fenómeno, se puede suponer que la hipotensión arterial "observada", debió ser de gran magnitud, pero el prevaleciente interés médico por el efecto hipnótico del ZB y el incipiente conocimiento de la HAS, hicieron que esta observación pasara inadvertida.

No es sino hasta 1933, cuando el pasante de Medicina Samuel García Carmona, en su Tesis de licenciatura refiere que en 10 pacientes con insomnio, tratados con un extracto acuoso de semilla, el tratamiento tuvo alguna vez que suspenderse por el intenso efecto colateral de hipotensión arterial producido por el ZB (García Carmona, 1933). Este hallazgo clínico se confirmó con registros de presión arterial, tomados directamente de un perro al que se le ministró por vía i.v. un extracto similar al empleado por García Carmona (De Lille, 1934). y con lecturas de la presión arterial indirecta, realizadas en humanos normotensos (Flores-Montalvo, 1936) e hipertensos (Cruz y Corro, 1939). La actividad cardio-circulatoria del ZB había sido demostrada; sin embargo, llama la atención que en la literatura consultada, no existen otros estudios clínicos y sólo están referidos tres estudios preclínicos farmacológicos relacionados con las acciones cardiovasculares del ZB. El primer estudio publicado (Ramírez y Rivero, 1935), analiza en el perro anestesiado y en el corazón aislado de rana, los efectos producidos por un extracto purificado de semilla conocido comercialmente como "Rutelina Garcol", la palabra Garcol hace alusión al "visionario" comerciante mexicano, García Colín que lo puso de venta al público. La administración de dicho preparado en el perro, originó disminución inmediata de la presión arterial de 40 mm Hg, la cual se recupera paulatinamente sin llegar a las cifras basales durante las cuatro horas que dura el experimento. Cuando se incrementa la dosis del extracto se registra taquicardia y el pretratamiento con atropina, no previene la hipotensión arterial. En el corazón aislado de rana

bajo condiciones isotónicas, el mismo extracto produce efectos cronotrópico e inotrópico negativos y parálisis diastólica ventricular solo con dosis tóxicas. El segundo estudio publicado en 1977 (Lozoya y col. , 1977), es realizado con extractos hidroalcohólicos obtenidos de la semilla, los cuales se ministran por vía i.v. en animales íntegros de tres especies: gatos, perros y cobayos o bien se depositan en varias concentraciones a la solución que baña diferentes tejidos aislados. Los resultados refieren que el extracto etanólico administrado en dosis de 0.3 mg por Kg de peso corporal, produce marcada disminución de la presión arterial en las tres especies empleadas. En este trabajo, sólo se presentan y analizan los registros de presión arterial de gatos anestesiados y despiertos, especie en la que el efecto hipotensor producido por el ZB, parece ser de similar magnitud y duración que el observado en el perro. En el gato despierto, la hipotensión se acompaña de un estado general de relajación con sincronización electrocortical de ondas delta, theta y husos de sueño. En la preparación de "encéfalo aislado de gato", los autores refieren que la ministración del extracto no produce efecto hipotensor. Por otra parte, las preparaciones *in vitro* de útero, tráquea, vejiga, ileo y aorta de diferentes especies animales, cuando son tratadas con los extractos, se contraen con una intensidad de magnitud variable. Con los datos mencionados, Lozoya y colaboradores proponen que el efecto hipotensor del ZB, es originado probablemente en el centro vasomotor y que el efecto hipnótico también descrito, es secundario a la hipotensión arterial. Si bien este estudio se publica 42 años después del de García Carmona, la población en este lapso, al parecer hacía uso cotidiano de la planta, práctica que quizás se adquirió mediante un fenómeno de interculturización; es decir, la información experimental recopilada de 1897 a 1938 trascendió a la población, de manera que la medicina tradicional incorporó a su conocimiento el efecto que sobre la presión fue descubierto en el laboratorio (Lozoya y Enríquez, 1981). Cabe

mencionar que la hoja de *C. edulis*, es la parte de esta planta que más se utiliza en la medicina tradicional con propósitos antihipertensivos, sin embargo las investigaciones farmacológicas han sido realizadas con la semilla, porque según Lozoya y Enríquez (1981) es el componente del ZB con mayor efecto hipotensor sostenido. El tercer estudio preclínico, es realizado en el extinto Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAM) y tiene la virtud de correlacionar la investigación química con la farmacológica (Lozoya y col., 1978). Este trabajo relata la separación y evaluación farmacológica de los componentes de un extracto alcohólico de semilla. Para tal fin, los autores utilizan columnas empacadas con sílice o alúmina eluidas con mezclas de etanol-metanol-cloroformo y metanol-agua. Los componentes de las fracciones recolectadas son analizados mediante cromatografía en capa fina bajo luz ultravioleta y con el revelador de yodo. La actividad de los componentes se siguió por ensayos en útero aislado, y sólo aquellas fracciones que muestran actividad uterotónica se probaron en la preparación de presión arterial directa del perro anestesiado. A pesar de la carencia de ensayos farmacológicos sistemáticos, los autores refieren haber aislado e identificado en la semilla del ZB, la sustancia responsable del efecto hipotensor. Sobre la base de la espectrometría de masas y a la resonancia magnética nuclear (RMN) realizada a la sustancia activa, los autores concluyen que la estructura corresponde a la N-N dimetilhistamina (DMH). En realidad este derivado histamínico, ya había sido aislado del ZB en forma de sales de picrato y clorhidrato y fue propuesto como el principio activo de la semilla (Major y Dürsch, 1958). Estos investigadores de la Universidad de Virginia, trabajando para la compañía farmacéutica Merck Co, refieren que el Dr. C. A. Stone, también del Instituto Merck, realizó pruebas farmacológicas con un extracto de semilla, demostrando que su actividad hipotensora es bloqueada por una sustancia antihistamínica. Con este antecedente

farmacológico, más el aislamiento de una sustancia con similitud estructural a la histamina, los autores concluyen que el efecto hipotensor producido por el ZB, se debe al derivado imidazólico DMH. Sin embargo, en el artículo original no se exhiben los registros de dichas pruebas experimentales, como tampoco se muestran evidencias de haber realizado el estudio farmacológico con la sustancia pura. En el mismo año (Ling y col., 1958) también habían notado la presencia de DMH en *C. edulis* y observado su marcada actividad hipotensora. El hecho de que el pretratamiento con antihistamínicos previene completamente la hipotensión causada por *C. edulis* (Major y Dürsch, 1958; Lozoya y col., 1978; Magos y Vidrio, 1991), puede considerarse como evidencia de que el componente responsable de los efectos de la planta, está relacionado estructuralmente a la histamina (H). Sin embargo, existen informes que sostienen que la acción hipotensora producida por la H y sus análogos incluyendo la DMH, es transitoria (Vartiainen, 1935; Bertaccini y Vitali, 1964) y contrasta notoriamente con el efecto hipotensor duradero inducido por la semilla. Además, en estudios farmacológicos realizados en nuestro laboratorio, encontramos que el extracto total hidroalcohólico de la semilla, posee más de un componente con actividad cardiovascular, ya que un efecto hipertensor de naturaleza adrenérgica, es desenmascarado al antagonizar la hipotensión arterial con antihistamínicos (Magos y Vidrio, 1991; Vidrio y Magos, 1991). Semejante suposición también se deduce de los resultados obtenidos en estudios con anillos de aorta de rata, donde el extracto metanólico de la semilla del ZB, produce marcado efecto vasoconstrictor (Magos y col., 1995).

2.4 Químicos

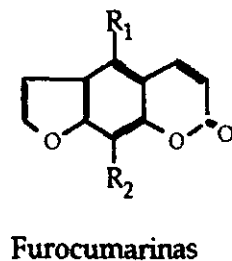
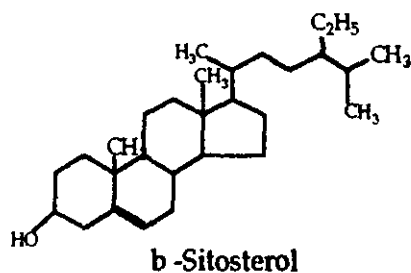
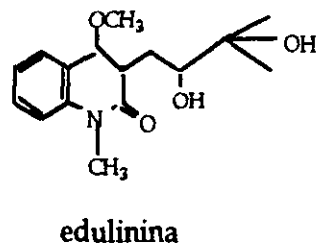
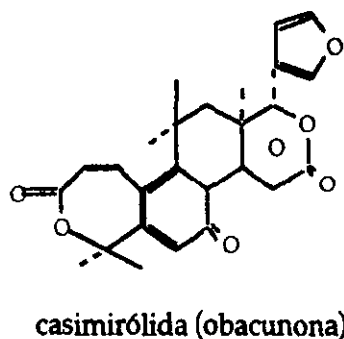
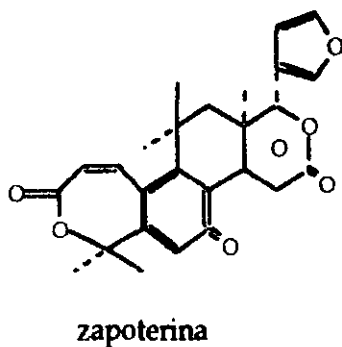
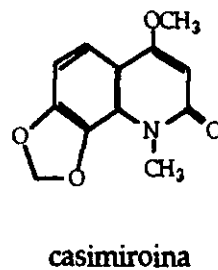
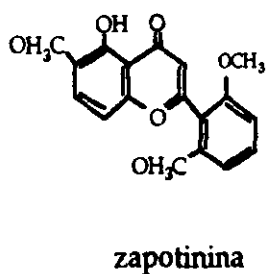
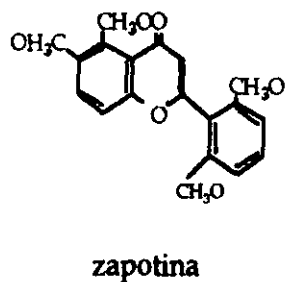
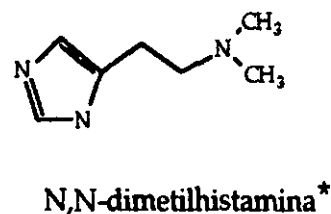
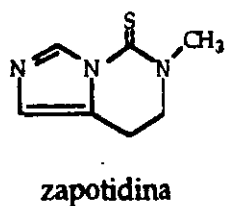
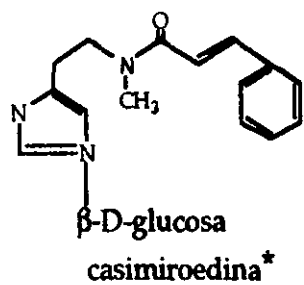
El estudio químico de la *Casimiroa edulis* es iniciado en la ciudad de México por José Sánchez, quien al sustentar su examen general de Farmacia en el año de 1893, presenta la Tesis titulada: "Breve estudio sobre la almendra del fruto del zapote blanco", en donde resalta la presencia de un cuerpo cristalizado, positivo a las reacciones químicas empleadas en la época para identificar alcaloides. Power y Callan (1911), trabajando con la semilla, aíslan y establecen la fórmula empírica de seis sustancias: casimiroina, casimiroedina (CAS), casimirolida (identificada posteriormente como obacunona por los estudios de Sondheimer y col. (1959), "sustancia fenólica amarilla" (identificada como una mezcla de furocumarinas por Enríquez y col. (1984), ipuranol (β -sitosterol β -D-glucósido) y β -sitosterol. Kincl y col. (1956) identifican en la semilla siete sustancias más: zapotina, zapotinina, zapoterina, edulina, zapotidina, palmitamida y N-benzoiltiramina; de las cinco primeras sustancias no se disponía de información documentada, mientras que las dos restantes ya habían sido identificadas en otras plantas. Major y Dürsch (1958), informan de la presencia en la semilla, del derivado histamínico DMH y lo postulan como el probable principio activo del efecto hipotensor del ZB. Debido al uso de métodos analíticos modernos, los trabajos que aparecieron a finales de los 50's y durante los años 60's, ilustran la sucesiva identificación completa y detallada de la estructura química de las sustancias que en el período anterior habían sido aisladas y parcialmente identificadas.

Las estructuras de casimirolida (Sondheimer y col., 1959) y CAS (Djerassi y col., 1958) son elucidadas. Esta última sustancia es el derivado N-cinámico de la N-metilhistamina, y hasta 1973 se establece la identificación completa de su estructura química (Panzica y Townsend, 1973).

En 1960, se publica la estructura de la zapotidina (Mechoulan y col., 1961) haciendo hincapié los autores de que esta sustancia se halla íntimamente relacionada a la DMH y a la CAS, caracterizándose las tres por tener un núcleo imidazólico. En 1967 se logran elucidar las estructuras de zapotina (Dreyer y Bertelli, 1967) de edulina (Toube y col., 1967) y zapoterina (Dreyer, 1968). De la semilla también se extrajo un aceite en donde se identificaron los ácidos grasos esteárico, linoleico, oleico y el flavonoide camférico. Por lo que respecta a las propiedades farmacológicas de todas estas sustancias, la literatura científica es sumamente escasa y a pesar de haberse realizado la mayoría de las investigaciones químicas en los laboratorios Syntex S. A., resulta extraño que no se hayan realizado las pruebas farmacológicas idóneas a tal investigación (Lozoya y Enríquez, 1981). A excepción de la DMH, para las demás sustancias mencionadas, prácticamente se carece de información sobre alguna posible acción sobre el sistema cardiovascular. En la Tabla I se indican en orden de extracción, las concentraciones de los compuestos identificados en la semilla del ZB y en la Figura 1 se representan sus estructuras.

TABLA I. Rendimiento en % de los compuestos obtenidos a partir de 100 kg de semilla de *C. edulis*. Tomado de Kincl y col. (1956).

COMPUESTO	EXTRACCION	DISOLVENTE	RENDIMIENTO %
β -Sitosterol	"Acida"	Hexano	0.0027
Palmitamida	"	"	0.0003
Zapotina	"	Benzeno	0.004
Casimiroina	"	"	0.0012
N-benzoiltiramina	"	"	0.0015
Furanocumarinas	"	"	0.0112
Zapotinina	"	Diclorometano	0.0005
Zapoterina	"	"	0.0027
Casimirovida	"	"	0.0021
Sitosterol- β -D-Glucosido	"	"	0.0016
Edulina	Alcalina	Benzeno	0.0002
Zapotidina	"	Diclorometano	0.0014
Casimiroedina	"	Alcohol	0.95



	R ₁	R ₂
I	OCH ₃	H
II	OCH ₃	OCH ₃
III	OCH ₃	OCH ₂ CHC(CH ₃) ₂
IV	H	O-geranilo
V	H	OCH ₂ CHC(CH ₃) ₂
VI	O-geranilo	H
VII	OCH ₃	O-geranilo
VIII	OCH ₃	OH
IX	H	OH

Fig 1. Compuestos identificados en la semilla de *C. edulis*. *Estructuras imidazólicas aisladas de las fracciones activas del extracto metanólico y estudiadas química y farmacológicamente en la presente tesis.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La DMH, sustancia imidazólica aislada de la semilla del ZB, ha sido propuesta como responsable del efecto hipotensor observado en diferentes especies animales, cuando estos son tratados con extractos crudos hidroalcohólicos obtenidos de las hojas y las semillas. Sin embargo, esta propuesta no guarda relación con lo informado en la literatura, ya que la DMH ministrada por vía i.v. produce disminución transitoria de la PAS, mientras que los extractos crudos ministrados por la misma vía, producen hipotensión arterial sostenida. Además, también existen evidencias de la presencia de otro componente activo, el cual se comporta como agonista de los receptores α adrenérgicos, dado que el pretratamiento con prazosina y zolertina, antagonistas de dicho receptor, bloquean respectivamente sus efectos contráctil en la aorta aislada de rata (Magos y col., 1995) e hipertensor en la misma especie y en el perro (Vidrio y Magos, 1991; Magos y Vidrio, 1991). Debido a estos antecedentes, parece razonable postular la presencia en el extracto metanólico de la semilla, de más componentes activos. Ello explicaría con más apego a la realidad, el uso racional de los preparados medicinales del ZB. Con el propósito de comprobar esta hipótesis nos propusimos en el presente estudio, aislar e identificar del EMeOH de la semilla, el o los compuestos que muestren actividad sobre la PAS y la FC de la rata y del cobayo anestesiados. Asimismo, con la ó las sustancias puras aisladas, determinar el ó los mecanismos de acción responsables de la hipotensión e hipertensión observada con el extracto completo. Por otra parte, la posibilidad de identificar sustancias nuevas, con ventajas sobre las ya conocidas en cuanto a eficacia, características farmacocinéticas, margen de seguridad, patrón de efectos colaterales, etc., abre un campo de investigación interesante, es suficiente motivo *per se* para iniciar la búsqueda y valoración farmacológica de sustancias potencialmente útiles en el tratamiento de la HAS.

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO

- a) En los extractos crudos de la semilla de *C. edulis*, existe más de una sustancia activa cuyo rendimiento depende de la polaridad del disolvente empleado para su extracción.
- b) La valoración de cada uno de los extractos obtenidos de la semilla de *C. edulis*, sobre el sistema cardiovascular de la rata anestesiada, permitirá elegir el proceso de extracción que proporcione una mayor cantidad de los principios activos.
- c) La cromatografía en columna y en placa fina preparativa del extracto más activo, permitirán fraccionar y separar las sustancias responsables de los efectos observados en el sistema cardiovascular de la rata anestesiada.
- d) La preparación de ratas anestesiadas para registro directo de la presión arterial y de la frecuencia cardíaca, permitirá identificar y caracterizar farmacológicamente, las sustancias responsables de las acciones producidas por el extracto crudo de semilla del ZB.
- e) La valoración farmacológica de cada una de las sustancias activas, permitirá demostrar que los efectos cardiovasculares observados con la ministración del EMeOH completo, son producidos por distintas sustancias.
- f) El empleo de antagonistas histaminérgicos, para caracterizar la actividad hipotensora de los componentes activos, permitirá establecer la naturaleza histaminérgica del efecto hipotensor de la semilla.
- g) El empleo de antagonistas adrenérgicos para caracterizar la actividad hipertensora de los componentes activos, permitirá establecer la naturaleza adrenérgica del efecto hipertensor de la semilla.

5. OBJETIVOS

- a) Preparar extractos de semilla de la planta mexicana *C. edulis*, empleando disolventes de polaridad creciente.
- b) Seleccionar el extracto con mayor actividad sobre la presión arterial y frecuencia cardíaca de la rata anestesiada.
- c) Fraccionar el extracto seleccionado, hasta obtener la identificación y el aislamiento de sus componentes activos, utilizando como criterios el análisis cromatográfico y la actividad mostrada por cada una de las fracciones recolectadas, sobre el sistema cardiovascular de la rata anestesiada.
- d) Caracterizar las estructuras químicas de los principios activos, utilizando técnicas espectrométricas y espectroscópicas incluyendo experimentos de RMN de correlación de desplazamientos y los de detección inversa HMBC y HMQC, útiles para identificar estructuras químicas en mezclas de difícil resolución.
- e) Caracterizar farmacológicamente las sustancias responsables de las acciones cardiovasculares de la semilla que hasta el momento han sido publicadas.
- f) Comparar los efectos cardiovasculares producidos por las sustancias aisladas de la semilla, con los efectos cardiovasculares producidos por sustancias de referencia.
- g) Determinar la influencia de los antagonistas histaminérgicos conocidos, en los efectos cardiovasculares producidos en la rata anestesiada, por los componentes hipotensores aislados de la semilla.
- h) Determinar la influencia de los antagonistas adrenérgicos conocidos, en los efectos cardiovasculares producidos en la rata anestesiada, por los componentes hipertensores aislados de la semilla.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 *Recolección y comprobación taxonómica del fruto de la *Casimiroa edulis**

Los frutos del ZB empleado para el presente estudio, se recolectaron durante los meses de junio y julio del año de 1995, de un árbol de la huerta familiar del Sr. Armando Domínguez Hidalgo, situado en San Luis Huexotla Edo. de México a 3 Km al sureste de Texcoco, cabecera de este municipio. Uno de los ejemplares, se identificó como *C. edulis* por José García Pérez, botánico a cargo del Herbario del Centro Botánico del Colegio de Posgraduados de Chapingo CHAPA Magos 1.

6.2 *Estudio químico de la semilla*

6.2.1 *Preparación por los procedimientos de maceración, reflujo y extracción rápida, con diferentes disolventes orgánicos*

A la semilla fresca proveniente del fruto del ZB, se le quitó el endocarpo que la cubre, para rebanarla en rodajas de 2 a 3 mm de espesor y secarla durante cuatro semanas bajo la sombra a temperatura ambiente. El material seco, se pulverizó con un molino y se guardó en bolsas de plástico herméticamente cerradas. Para la preparación de los extractos, se utilizaron los procedimientos de maceración, reflujo y extracción rápida. Para cada procedimiento, se empleó un Kg de polvo exponiéndolo en forma sucesiva al hexano, diclorometano y metanol. En el primer procedimiento, el polvo se maceró a temperatura ambiente con cada uno de los disolventes orgánicos mencionados. Transcurridas 48 hs de este proceso, el disolvente en turno se removía del

material biológico y se intercambiaba por disolvente libre de residuo, maniobra que se repitió 5 veces para cada disolvente. El segundo procedimiento, se realizó empleando un equipo de Soxhlet con capacidad para contener 50 g de polvo empacado en cartuchos de celulosa. El reflujo se mantuvo durante 24 hs a temperaturas bajas que permitían la volatización del disolvente en turno y la percolación del polvo empacado. El tercer procedimiento denominado extracción rápida, consistió en colocar el polvo molido en dos columnas de vidrio, diseñadas con un filtro de vidrio poroso, cuyo poro es lo suficientemente pequeño para impedir el paso de material biológico. Cada uno de los tres disolventes empleados, es eluido con presión positiva a través del polvo empacado hasta que ya no se extrae residuo. Todos los disolventes se eliminaron por destilación con un rotavapor a presión reducida y los residuos se agruparon de acuerdo al proceso de extracción utilizado y al disolvente que los extrajo, obteniéndose tres extractos en cada procedimiento. Los nueve extractos que resultaron de los procesos antes mencionados, se probaron por separado en ratas anestesiadas preparadas para registro directo de la PAM y la FC. Para llevar a cabo el estudio químico, se seleccionó el extracto que mostró la actividad hipotensora más intensa y duradera, a dosis de 10 mg por Kg. de peso corporal por vía i.v..

6.2.2 Fraccionamiento y análisis cromatográfico del extracto metanólico

25g del extracto seleccionado, se fraccionaron por cromatografía en columna (CC), empleando como soporte 500g de sílica-gel 60 (Merck malla de 0.063-0.200 mm) y como eluyentes mezclas de polaridad ascendente de acetonitrilo-agua y propanol-agua con hidróxido de amonio al 0.5%. Se colectaron 300 fracciones de 50 ml, se agruparon por analogía cromatográfica en capa fina (CCF) y para definir sus componentes se utilizó yodo como revelador. Cada residuo

agrupado, se ensayó en ratas anestesiadas y las fracciones activas, nuevamente se separaron en CC y en CCF preparativas, hasta obtener muestras con mayor grado de pureza.

6.2.3 Identificación de las estructuras químicas de las sustancias activas por Infrarrojo, Masas, Resonancia Magnética Nuclear de protones y difracción de Rayos X.

Los estudios espectroscópicos que permitieron la identificación de los compuestos aislados, se llevaron a cabo en el Instituto de Química de la UNAM como se indica a continuación: los espectros de infrarrojo (IR) se realizaron en los espectrofotómetros Perkin Elmer 283-B y Nicolet FT-JR 5 SX por la Q.F.B. Rocío Patiño. La RMN de protones, se realizó con espectrómetros Varian FT 80A (80 Mhz), Varian Gemini 2000 (200 Mhz) y Varian XL 300 (300 Mhz) por el Químico Atilano Gutiérrez y la Maestra en Ciencias Isabel Chávez. Los espectros de masas por impacto electrónico (EMIE), se efectuaron en un espectrómetro Joel JMS-SX102A operando en 70 eV por el Ingeniero Químico Luis Velasco. Los estudios de difracción de Rayos X para metilprolina se realizaron con un difractómetro Nicolet P-3F por el Maestro en Ciencias Rubén Alfredo Toscano. Las fracciones de alta polaridad, en las cuales se identificó como principal componente la metilprolina (MP), se sometieron a RMN de 500 MHz para estudios de RMN de protones en conjunción con COSY (correlación homonuclear de hidrógeno), TOCSY (espectroscopia de correlación total), HMQC (correlación heteronuclear a través de coherencia múltiple cuántica) y HMBC (correlación heteronuclear a través de varios enlaces). Estos espectros se realizaron en las instalaciones del Departamento de Química de la Universidad de Toronto, en Ontario Canadá por el Dr. William F. Reynolds. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm).

6.2.4 Reactivos empleados para la extracción y análisis cromatográfico de las fracciones activas

El hexano, diclorometano, metanol, propanol, hidróxido de amonio, acetonitrilo, Yodo y sílica gel 60 para CC y en placa para CCF, se obtuvieron de Merck-México S. A. Agua y metanol deuterado para los estudios de RMN se obtuvieron de Sigma Chemical Co., de San Luis Missouri U.S.A.

6.3 Estudio farmacológico

6.3.1 Preparación de ratas y cobayos anestesiados para registro directo de presión arterial media y frecuencia cardíaca

Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar y cobayos Hartley machos adultos con pesos entre 250-300 g y 300-400 g respectivamente. Todos los animales son mantenidos bajo condiciones de alimentación, temperatura e higiene controladas y ciclos de luz-obscuridad de 12 por 12 hs. Anestesiados con pentobarbital sódico (30 mg/Kg i.p.) se canularon: 1) en la tráquea para facilitar la respiración espontánea, 2) en la arteria femoral para registro directo y continuo de la PAM y 3) en la vena femoral para la ministración de los extractos, fracciones y sustancias en estudio. La cánula arterial se conectó a un transductor de presión Statham P 231D y la señal filtrada electrónicamente se registró en un polígrafo Grass 79D. La FC se registró con un tacógrafo Grass 7P4F, accionado por otro canal del polígrafo en el que se inscribió la señal proveniente del canal de la presión arterial. Ambos parámetros: PAM y FC, se registran durante 60 min. Se mantuvo la temperatura de los animales con una lámpara de mesa colocada a 30 cm por encima de la rata, lo cual permitía alcanzar aproximadamente 30°C alrededor de la preparación. La posible actividad de cada uno de los extractos y de cada una de las fracciones recolectadas, se

evaluó sobre el sistema cardiovascular de la rata, ministrándolas en dosis de 10 mg por kg de peso corporal. Las fracciones activas, se reagruparon de acuerdo a sus componentes analizados por CCF y a la actividad biológica observada. Dichas fracciones se volvieron a ensayar en la preparación de rata anestesiada para registro de PAM y FC, eligiéndose las más activas para recromatografiarlas hasta obtener las sustancias activas puras. En todos los experimentos realizados con cada una de las sustancias activas aisladas del ZB, se utilizaron grupos de seis animales y los pretratamientos se llevaron a cabo por vía i.v. 10 minutos antes de administrar las sustancias probadas.

6.3.2 Fármacos empleados para caracterizar la actividad cardiovascular de las sustancias activas

La loratadina micronizada fue proporcionada por Schering Plough de México. Los clorhidratos de histamina, prazosina, dl-propranolol, l-fenilefrina y el ester metílico de N- ω -nitro-L-arginina así como el sulfato de atropina, (\pm)-sinefrina y las bases o ácidos libres de cimetidina, ácido γ -aminobutírico, L-prolina y N-metil-L-prolina se obtuvieron de Sigma Chemical Co., de San Luis Missouri U.S.A. Loratadina y casimiroedina se ministraron resuspendidos en agua destilada; los demás compuestos se disolvieron en solución salina isotónica. En todos los casos, el volumen inyectado es de 1 ml/Kg de peso corporal.

6.3.3 Análisis estadístico

La significancia de las diferencias con los valores básales de la PAM y la FC, así como los cambios de estos parámetros producidos por los compuestos probados a diferentes dosis o tiempos, se compararon en los grupos control y pretratados, utilizando la prueba t de Student's

no pareada ó pareada según sea el caso. Cuando se compararon diferentes grupos tratados con un mismo grupo control, se estableció la significancia de las diferencias realizando análisis de varianza de una ruta con la subsecuente aplicación de la prueba de Dunnett para comparaciones múltiples con un control. El valor de probabilidad límite para establecer significancia estadística de las diferencias observadas es de 0.05. La Dosis 30 (D_{30}) se calcula mediante regresión lineal de los experimentos en donde las respuestas graduales de hipotensión y taquicardia producidas por los imidazoles son mayores de 30 mm Hg y de 30 latidos por min respectivamente.

7. RESULTADOS

7.1 Químicos

7.1.1 Rendimiento de extractos obtenidos de la semilla de *Casimiroa edulis*, por procesos de maceración, reflujo y extracción rápida

Los rendimientos expresados en tanto por ciento, de los extractos obtenidos a partir de 100 g de semilla pulverizada de *C. edulis* mediante cada uno de los tres procedimientos de extracción empleados, se muestran en la Tabla II. Los rendimientos de los tres extractos obtenidos por extracción rápida, son notoriamente menores a los obtenidos por reflujo y maceración. A pesar de este resultado, la extracción rápida con metanol permite obtener el residuo con mayor actividad hipotensora (véase resultados farmacológicos Tabla VII).

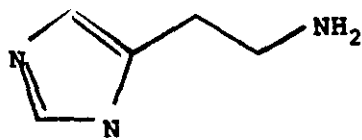
Tabla II. Rendimiento en tanto por ciento (%), de los extractos obtenidos a partir de 100 g de semilla pulverizada de *C. edulis*, mediante tres procedimientos.

Disolventes	Procedimientos de extracción		
	Reflujo	Maceración	Rápida
	%	%	%
Hexano	1.10	0.92	0.77
Diclorometano	1.46	2.34	0.77
Metanol	7.39	7.42	2.63

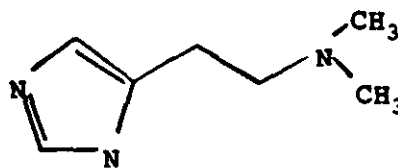
7.1.2. Sustancias identificadas en las fracciones activas aisladas del extracto metanólico

El EMeOH obtenido de la semilla de *C. edulis* por el procedimiento de extracción rápida, se fraccionó por CC. La elución se efectuó con propanol-agua (2:1) al 0.5 % en hidróxido de

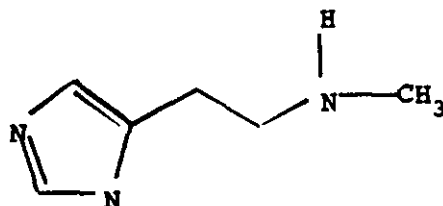
amonio. Las fracciones eluidas (250 fracciones de 50 ml cada una) se agruparon de acuerdo a sus similitudes cromatográficas en CCF y a la actividad cardiovascular observada con cada una de ellas. La recromatografía en columna y en CCF preparativa de los agrupamientos activos, condujo a la separación de fracciones puras en las cuales se identificaron siete sustancias: 1) **N-monometilhistamina (MMH)**; 2) **N,N-dimetilhistamina (DMH)**; 3) **casimiroedina (CAS)**, 4) **acetónido de sinefrina (AS)**; 5) **N-metilprolina (MP)**; 6) **prolina (P)** y 7) **ácido- γ -amino butírico (GABA)**. Las tres primeras sustancias son de naturaleza imidazólica y producen hipotensión arterial transitoria; la cuarta es una oxazolidina que incrementa la PAM y la FC, mientras las tres últimas son aminoácidos que provienen de una zona cromatográfica homogénea de alta polaridad cuya mezcla produce hipotensión arterial sostenida. Cabe mencionar que la elucidación estructural de los componentes de esta zona, sólo fue posible con estudios bidimensionales de RMN de alta resolución (500 MHz), los cuales revelaron la presencia de MP (70%) , P (18%), GABA (11 %) y de otros compuestos que no se identificaron (<1%). Las estructuras de los siete compuestos aislados del EMeOH de la semilla se muestran en la Figura 2 y su separación cromatográfica (CCF) se representa en la Figura 3.



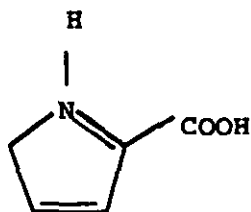
Histamina (H)
(Referencia)*



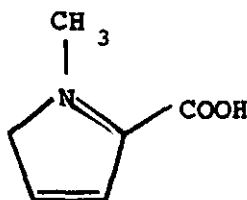
N,N-dimetilhistamina (DMH)



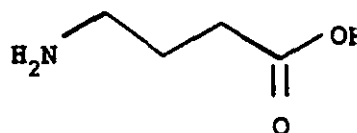
N-monometilhistamina (MMH)



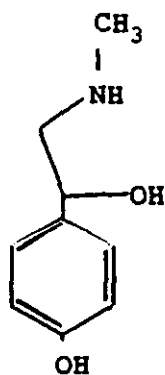
Prolina (P)



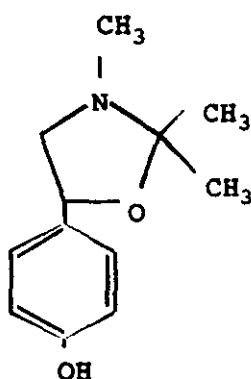
N-Metilprolina (MP)



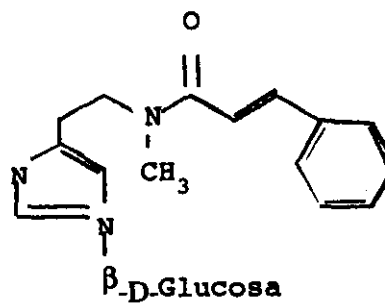
Acido γ -amino-butírico (GABA)



Sinefrina (S)
(Referencia)*



Acetónido de Sinefrina (AS)



Casimiroedina (CAS)

Fig 2. Estructuras de los compuestos activos, aislados del EMeOH (extracto metanólico) de la semilla de *C. edulis*. *La histamina y la sinefrina no se identificaron en la planta, se representan para señalar la analogía estructural con los compuestos aislados.

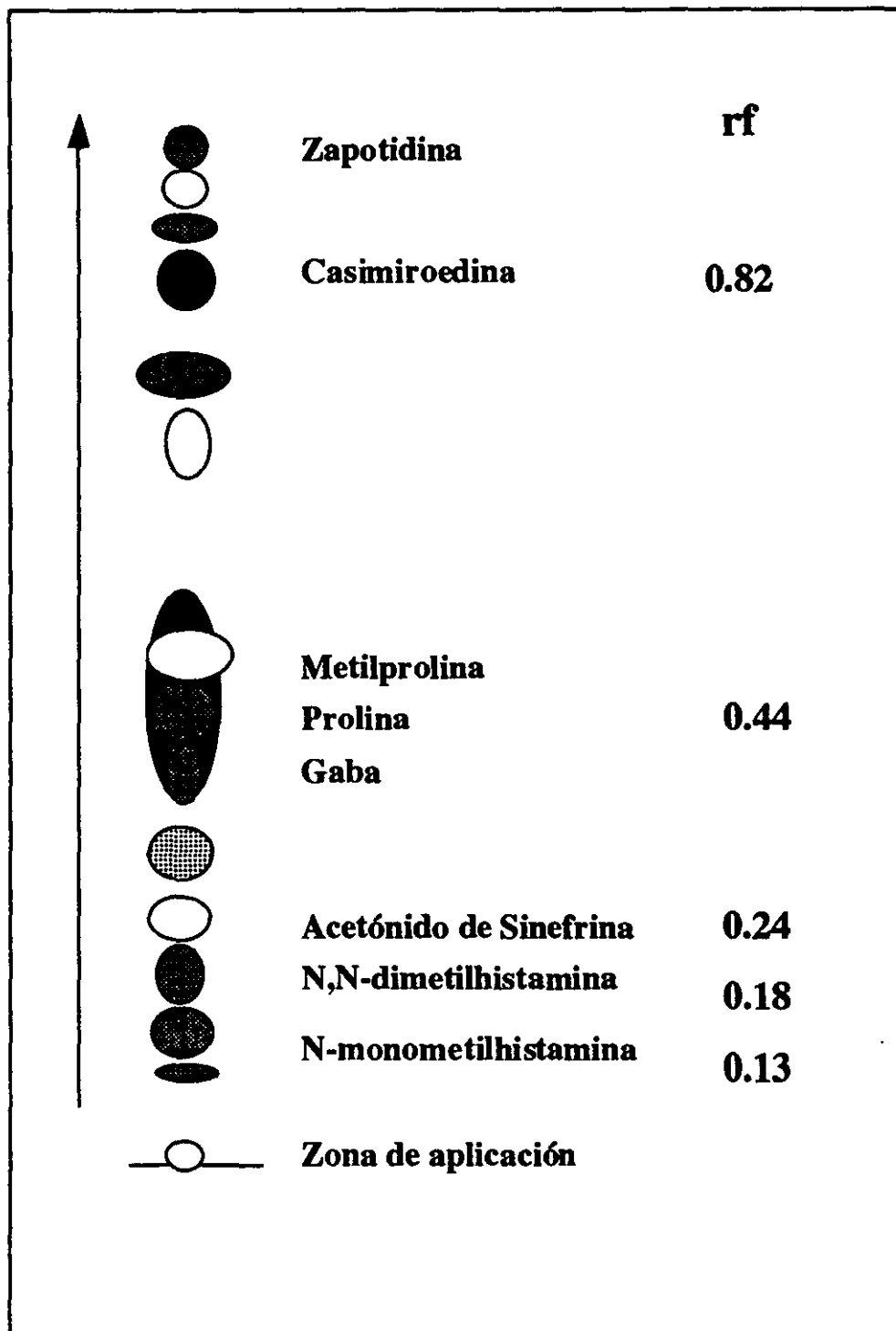
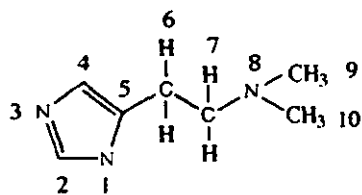


Fig 3. Separación cromatográfica de los componentes aislados de la semilla de *C. edulis*. La muestra obtenida del EMeOH (extracto metanólico), se aplicó en una placa fina con soporte de sílica gel y se eluyó con una mezcla de propanol agua (2:1) con hidróxido de amonio al 0.5%. El revelador utilizado es yodo. El rf es una cantidad numérica que indica la relación que guarda la distancia desplazada por una zona cromatográfica, con respecto a la distancia recorrida por el frente del disolvente utilizado como eluyente.

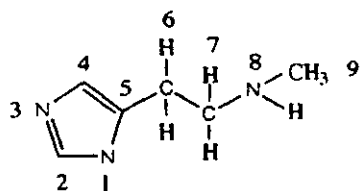
7.1.2.1 Análogos de Histamina

El fraccionamiento del EMeOH con la mezcla antes mencionada permitió separar y agrupar las fracciones con características cromatográficas semejantes. El agrupamiento de las fracciones 170 a la 225 que originan en la rata hipotensión arterial fugaz, resultó en una masa amorfa higroscópica de coloración café claro. Esta se purificó por CC y en CCF preparativa hasta obtener dos manchas con r_f de 0.13 y 0.18 (Fig 3). El análisis por RMN unidimensional de hidrógenos de dicho agrupamiento, mostró mezclas de señales para MMH y DMH (Espectro Ia amplificado y Ib completo). Como puede observarse en el espectro amplificado, los desplazamientos químicos de los núcleos de hidrógenos ubicados en las posiciones señaladas con los números 6 y 7 de la estructura de DMH aparecen en δ 3.49 y 3.28 ppm con estructura del tipo AA'BB', mientras que para MMH, semejantes desplazamientos de los núcleos de hidrógenos aparecen en δ 3.4 y 3.18 ppm. Adicionalmente las señales de los metilos N-(CH₃)₂ para DMH y la del metilo -NH-(CH₃) para MMH aparecen en δ 2.96 y 2.76 ppm respectivamente y son las más adecuadas para propósitos de cuantificación. La relación entre MMH y DMH de la muestra analizada es de 2.5/1, lo cual se deduce del área bajo la curva de las señales que aparecen en δ 2.96 y 2.76 ppm del Espectro Ia amplificado. Observe que la integración de dichas áreas, es notoriamente mayor para la MMH que para la DMH. En un espectro conteniendo una mol para cada uno de los análogos imidazólicos, el área bajo la curva sería de 2 para DMH y de 1 para MMH, lo cual se explica por los dos grupos metilo de la DMH en comparación con un sólo grupo metilo de la MMH. Sin embargo, como lo demuestra la integración de las áreas bajo la curva de MMH y de DMH, la relación entre ambas sustancias es de 2.5:1 respectivamente.

Espectro amplificado

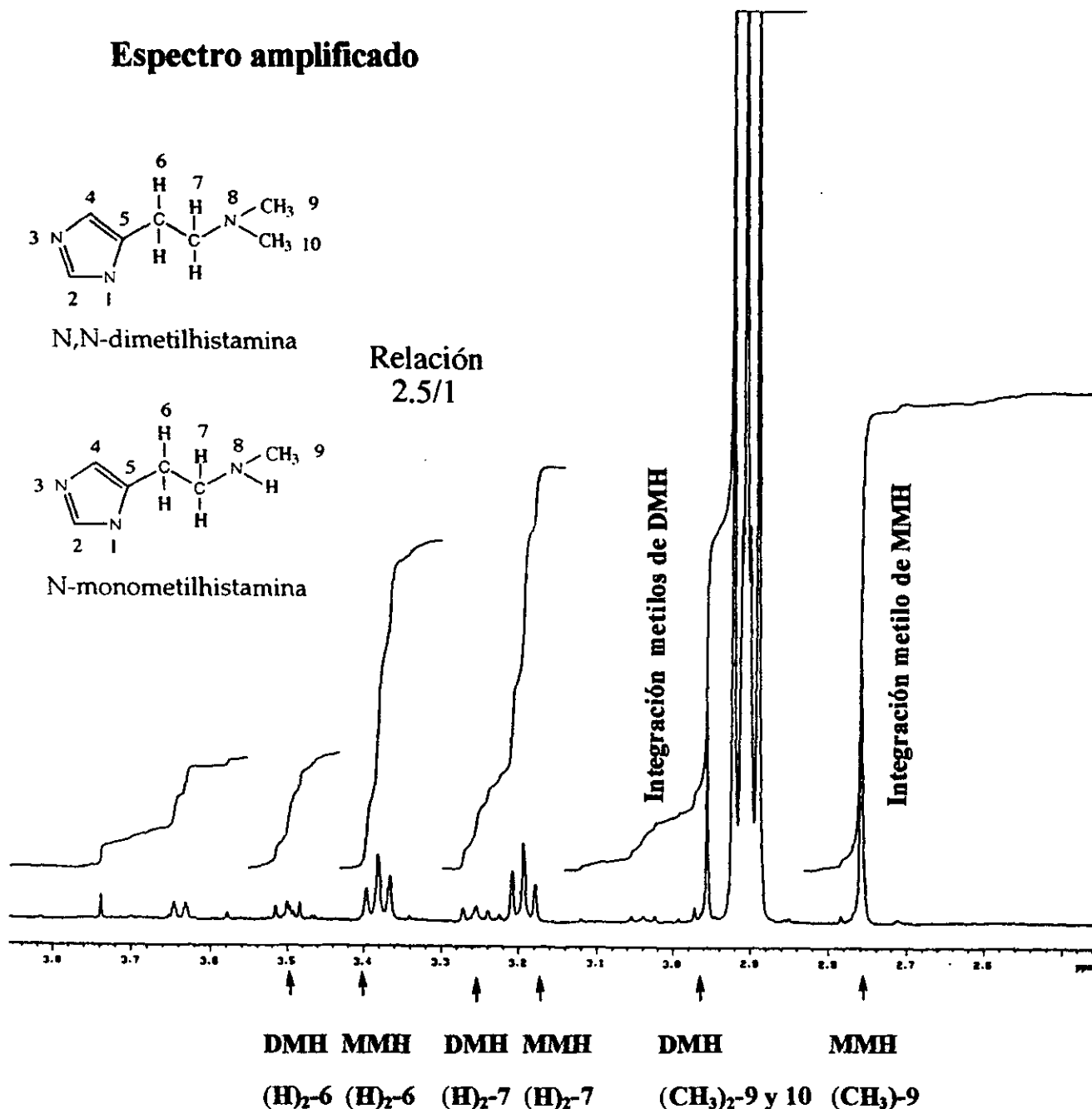


N,N-dimetilhistamina



N-monometilhistamina

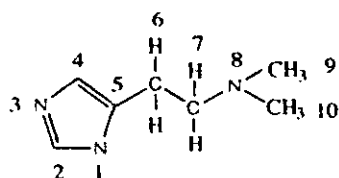
Relación
2.5/1



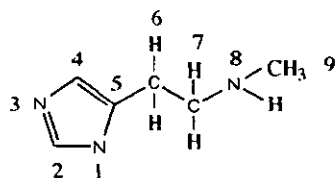
Espectro Ia. RMN de protones realizada con una muestra que produce hipotensión arterial transitoria en la rata anestesiada. La muestra se disolvió en agua deuterada (D_2O) con 1 % de dimetilsulfóxido y se determinó a temperatura ambiente en un equipo Varian Unity de 500 MHz. Se muestra una zona amplificada de δ 2.6 a 3.8 ppm. del espectro completo mostrado en el Espectro Ib. La numeración del 1 al 10, es una asignación arbitraria para ubicar la posición de los hidrógenos en la estructura de los análogos imidazólicos. Ejemplo $(H)_2-6$ se puede leer dos hidrógenos ubicados en la posición 6 del análogo imidazólico indicado como DMH ó MMH.

Por otra parte, la sobreposición en δ 6.80 y 7.54 ppm de las señales de los núcleos de los hidrógenos del anillo imidazólico de DMH y MMH (Espectro Ib), imposibilita utilizarlas para diferenciar y corroborar la cuantificación de cada uno de los compuestos.

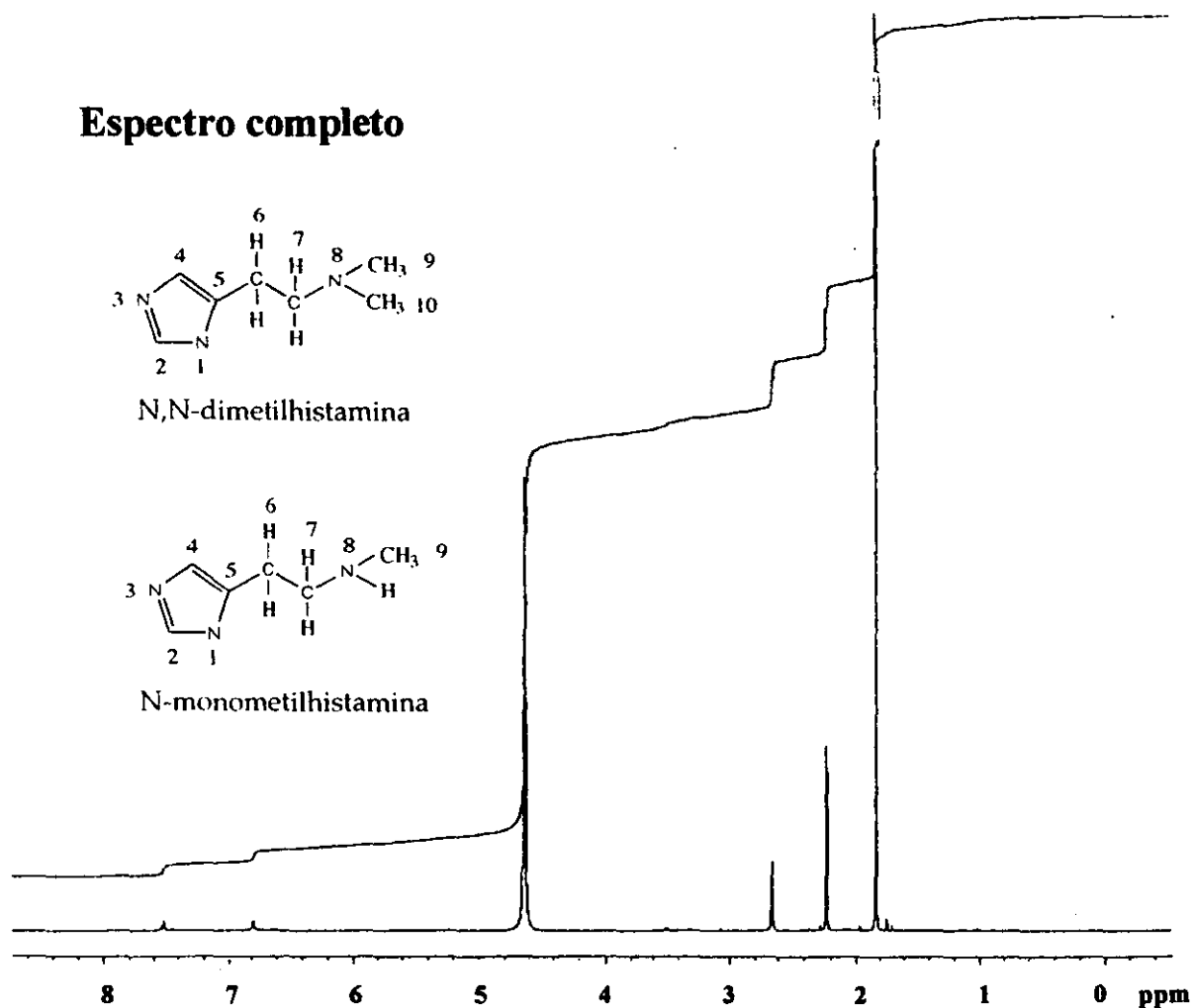
Espectro completo



N,N-dimetilhistamina



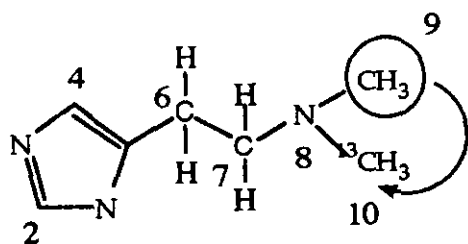
N-monometilhistamina



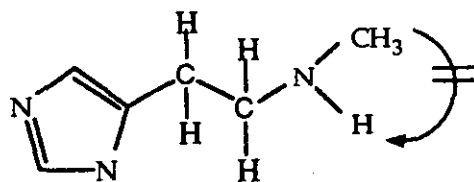
H-1 y H-3

Espectro Ib. RMN de protones realizada con una muestra que produce hipotensión arterial transitoria en la rata anestesiada. La muestra se disolvió en agua deuterada (D_2O) con 1 % de dimetilsulfóxido y se determinó a temperatura ambiente en un equipo Varian Unity de 500 MHz. La numeración del 1 al 10, es una asignación arbitraria para ubicar la posición de los hidrógenos en la estructura de los análogos imidazólicos. Observe las señales de los hidrógenos enlazados a los nitrógenos del anillo imidazólico ubicados en posiciones 1 y 3 (H-1 y H-3).

Con el propósito de diferenciar las sustancias imidazólicas, se realizaron experimentos de correlación heteronuclear a varios enlaces (HMBC) que no son mostrados en la presente tesis. Estos experimentos fueron posibles debido al hecho de que las señales de los grupos metilos unidos al nitrógeno de la DMH y la MMH, tienen desplazamientos químicos diferentes. Como se ilustra en el siguiente diagrama, en función del grupo N-CH₃ ubicado en la posición 9, se establecieron las correlaciones entre las señales de sus núcleos de hidrógeno con las señales del núcleo del C situado a tres enlaces, es decir con el ¹³C (carbono magnéticamente activo capaz de absorber radiofrecuencias) ubicado en la posición 10.



N,N-dimetilhistamina

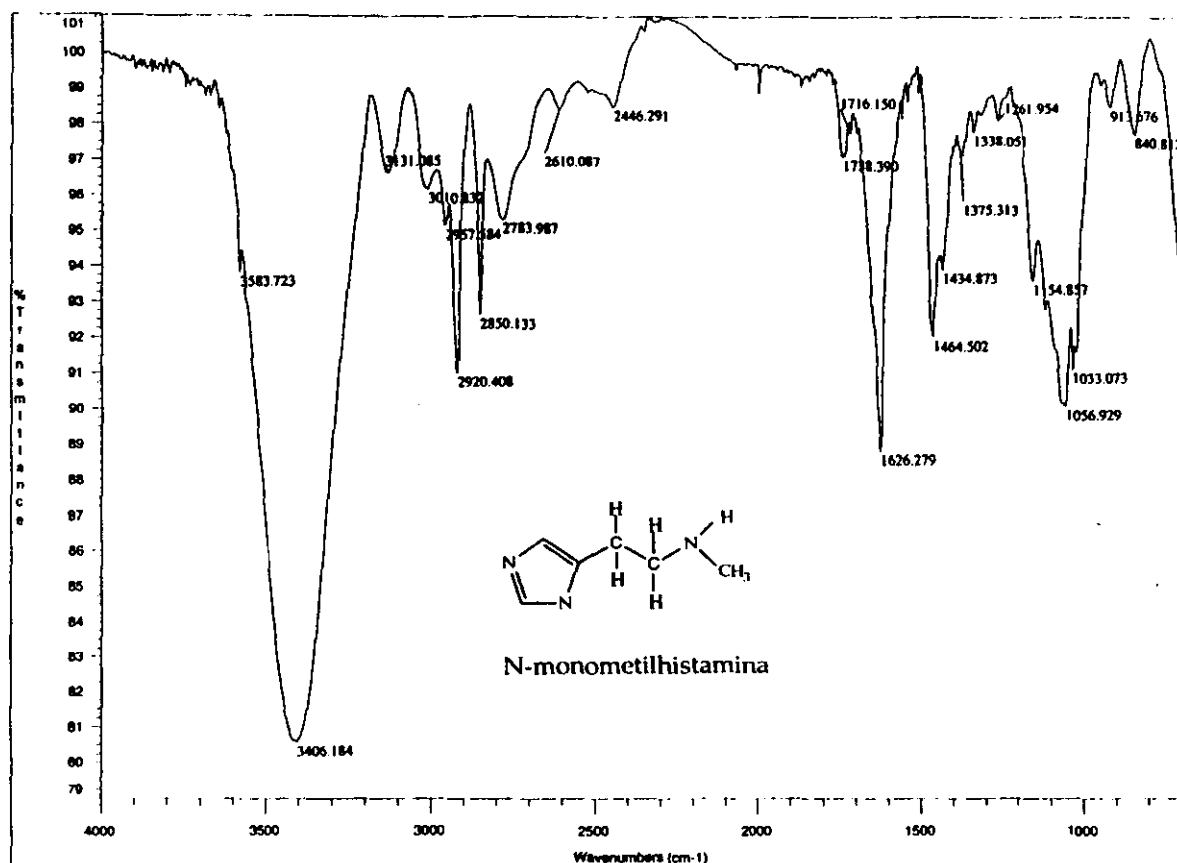


N-monometilhistamina

Al irradiar los hidrógenos del grupo CH₃ señalado con un círculo y ubicado en la posición 9, la correlación a tres enlaces indicada con las flechas, se manifiesta para el caso de la DMH en el ¹³C del grupo CH₃ ubicado en la posición 10 y que también se encuentra unido al nitrógeno. En cambio en la MMH, no hay correlación a tres enlaces porque no hay ¹³C sino un hidrógeno unido al nitrógeno.

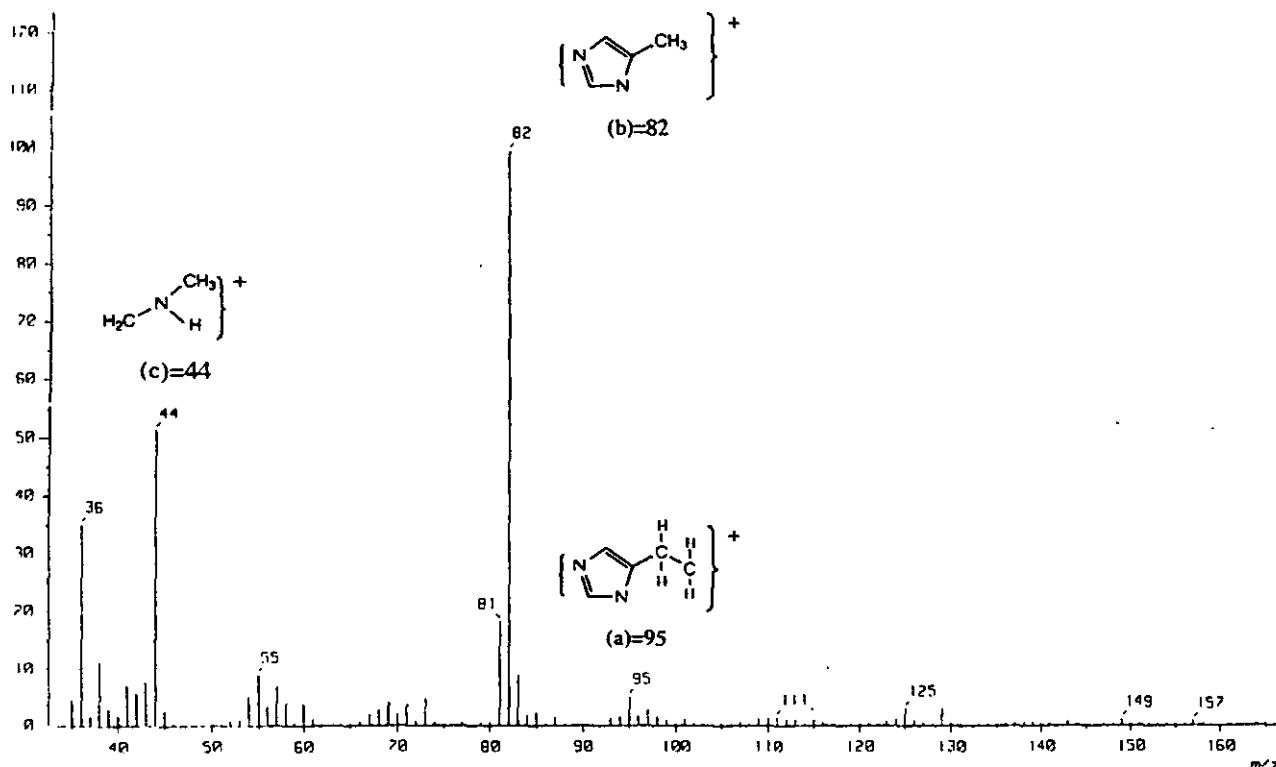
La separación cromatográfica en capa fina de las fracciones que producen disminución transitoria de la PAM, permitió obtener muestras puras para confirmar la identidad de cada compuesto. Además la valoración farmacológica de cada análogo de la H, también confirmó la

naturaleza histaminérgica de dicho efecto (inciso 7.2.4.). La MMH se aisló como un semisólido de color café claro soluble en MeOH y H₂O. Este líquido al liofilizarse es sólido, de color amarillo claro, pero al contacto con la atmósfera se hidrata rápidamente tornándose otra vez líquido. En el espectro de IR de MMH (Espectro 2), se observan las bandas de absorción (cm⁻¹) sugestivas de los grupos funcionales, amino (3406 a), enlaces carbono-hidrógeno alifático (2920 f y 2850 f), dobles enlaces carbono-carbono (1626 f) y grupos metilos y metilenos (1464 f, 1434 f y 1375 f) según tablas de frecuencias características (Nakanishi, 1969). La forma de las bandas se describen por las letras a, m y f para ancha, mediana y fina respectivamente.



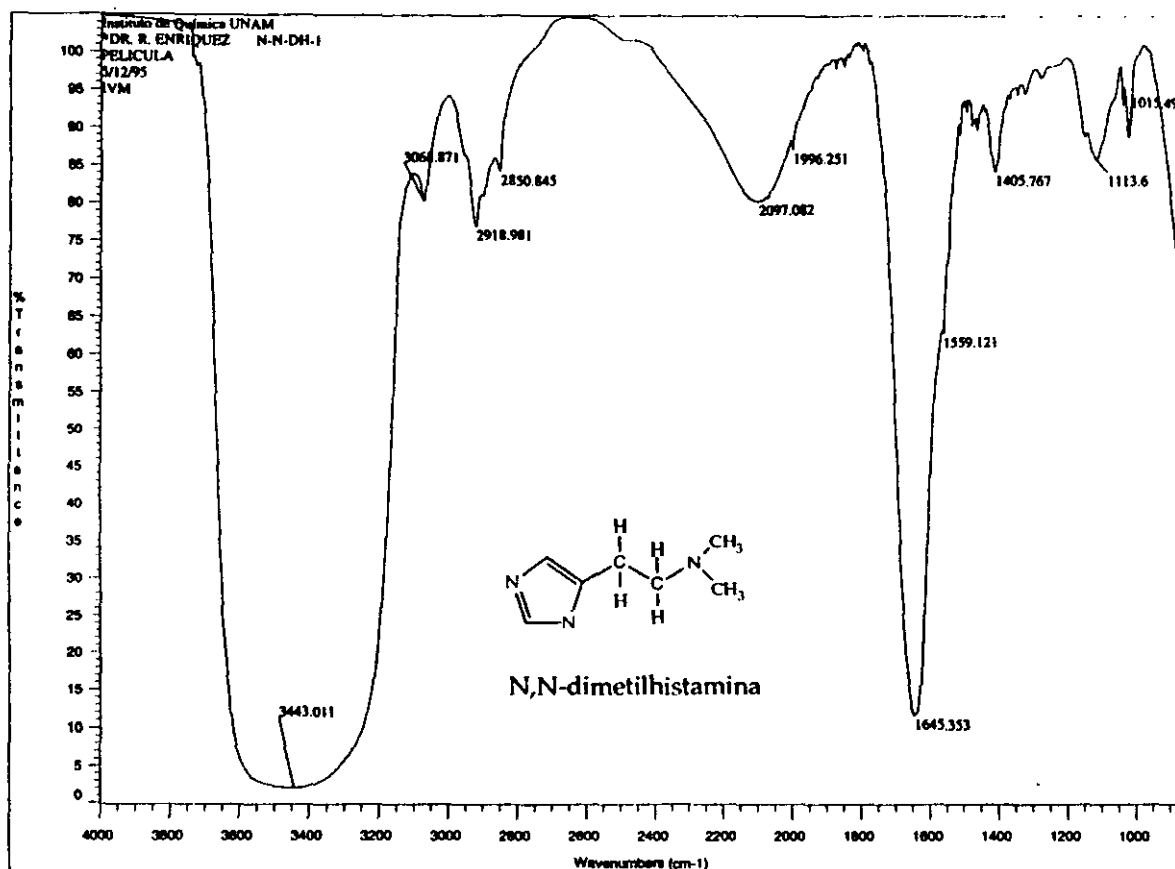
Espectro 2. Espectro de Infrarrojo obtenido en película de monometilhistamina.

En el espectro de masas de MMH obtenido por impacto electrónico (Espectro 3), no se observa el ion molecular esperado [$M^+=124$], es decir la masa molecular que pierde un electrón al impactar la sustancia eléctricamente neutra con electrones. Sin embargo, los picos masa/carga (m/z) 95 (8%), 82 (100%) y 44 (55%) son compatibles con el patrón de fragmentación de MMH. El pico base (82) se origina por la pérdida del fragmento $[CH_2-NH-CH_3]^+$ con transferencia de un hidrógeno dando lugar al fragmento **b**. El fragmento $(CH_2-NH-CH_3)$ que tiene una $m/z=44$, también se aprecia con una intensidad del 55 % (Fragmento **c**). Otra ruptura importante ocurre por la pérdida del grupo $[NH-CH_3]^+$ con transferencia de un hidrógeno al fragmento **a** de $m/z=95$ y una intensidad menor del 10% (Espectro 3).



Espectro 3. Espectro de masas obtenido por impacto electrónico de la monometilhistamina. Observe los picos m/z sugestivos de la presencia de los fragmentos **a**, **b** y **c** descritos en el texto.

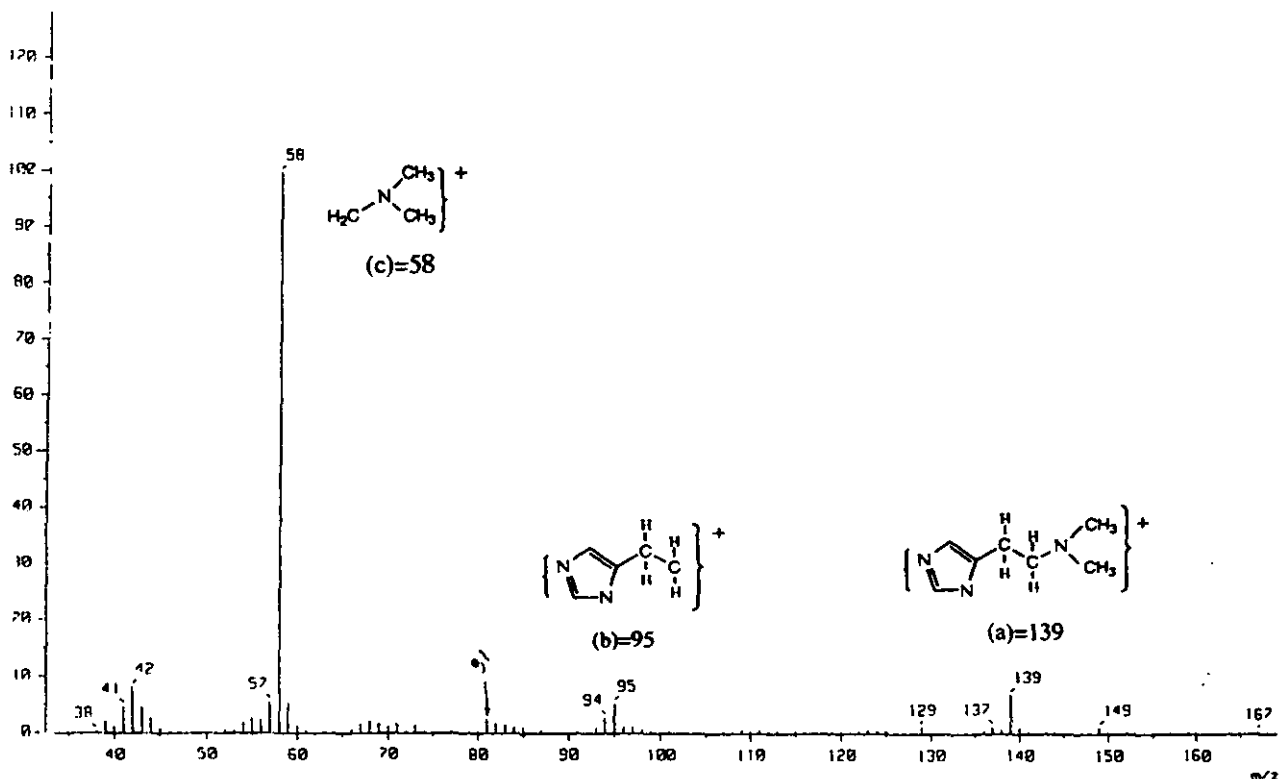
Por otra parte, la DMH se obtuvo como un líquido con características físicas similares a la MMH. En el espectro de IR de la DMH (Espectro 4), se observan las siguientes bandas sugestivas de los grupos funcionales, amina (3443 a), enlaces carbono-hidrógeno alifático (2918 m), nitrógeno-metilo (2097 a) y dobles enlaces carbono-carbono (1645 m) según tablas de frecuencias características (Nakanishi, 1969).



Espectro 4. Espectro de Infrarrojo obtenido en película de dimetilhistamina.

En el espectro de masas de DMH obtenido por impacto electrónico (Espectro 5), se observa el ion molecular $[M=139]^+$ señalado con la letra a. Este valor es superior en 15 unidades de m/z al previamente descrito para el compuesto MMH $[M=124]^+$, lo cual confirma que la

DMH posee un grupo metilo adicional. Lo anterior se corrobora por el pico base de $m/z=58$ correspondiente al fragmento c (metilendimetilamina). Adicionalmente el pico de $m/z=95$ correspondiente al fragmento b, es indicativo de la pérdida del fragmento dimetilamina [$M^+-N-(CH_3)_2$]

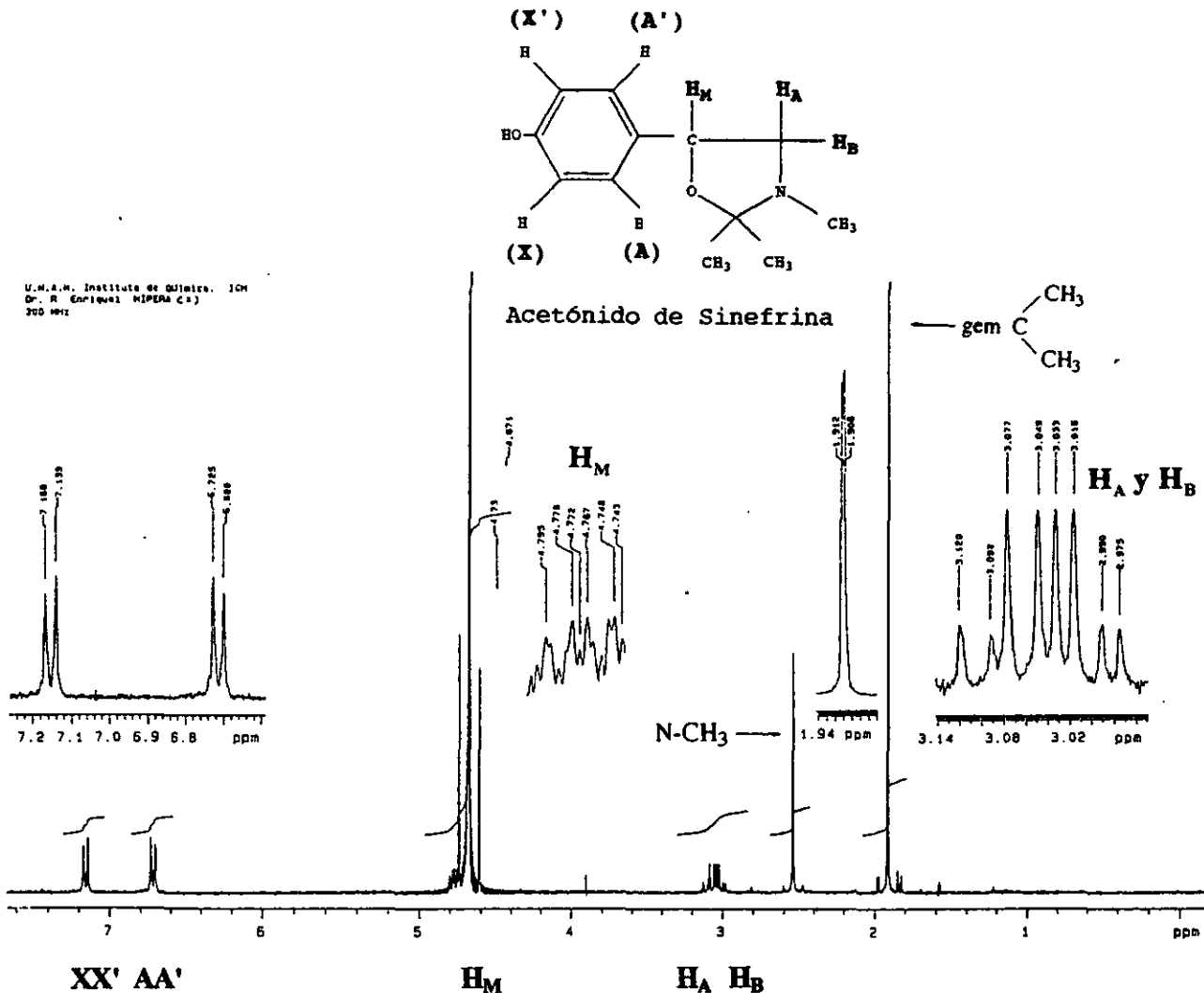


Espectro 5. Espectro de masas obtenido por impacto electrónico de una muestra de dimetilhistamina. Observe los picos m/z sugestivos de la presencia de los fragmentos a, b y c descritos en el texto.

7.1.2.2 Acetónido de sinefrina

La purificación por CCF del agrupamiento formado con las fracciones 145 a la 167, permitió obtener un sólido blanquecino con r_f de 0.24 y soluble en MeOH y H_2O . Cuando dicho sólido se ministra en la rata normotensa anestesiada, se produce HAS y taquicardia. La RMN de hidrógeno y la espectroscopia de masas, permitió identificarlo como AS. El espectro de RMN de

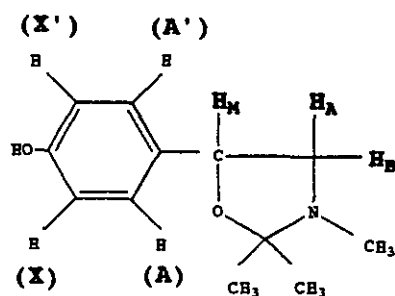
hidrógeno de éste análogo de S contiene a campo bajo señales que corresponden a un sistema AA' XX' por sus características de simetría (Espectro 6). Este sistema es producido por un anillo aromático con sustitución para, el cual presenta dos señales dobles en δ 7.18 y δ 6.71 ppm con una constante de acoplamiento de $J=7.8$ y 7.1 Hz. El análisis de la simetría molecular en RMN y en otras espectroscopias, sirve para predecir el tipo de espectro. Así, si tenemos un sistema clasificado como A_2 , significa que ambos miembros del conjunto (2 partículas A) no se distinguen espectralmente y dan origen a la misma señal. La distinción AA' significa que ambos núcleos no son equivalentes completamente. En el caso del anillo aromático del AS al girarlo 180° , cada núcleo de hidrógeno señalado en dicho espectro con la letra A y A', se interconvierten y no se distinguen. Lo mismo ocurre con los núcleos de hidrógeno señalados con la letra X y X'. Sin embargo, cada núcleo de hidrógeno A "ve" en posición orto al núcleo del hidrógeno X y en posición para al núcleo de X' es decir, químicamente son iguales pero distintos por simetría y por lo tanto dan señales diferentes como se observa en el Espectro 6. Además en el mismo espectro, el hidrógeno base del oxígeno y alfa al grupo fenilo señalado como H_M , aparece como un doble de doble en δ 4.77 ppm y los protones del metileno alfa al nitrógeno señalados como H_A y H_B aparecen en δ 3.04 ppm con constantes de acoplamiento $J_{AB}= 12.9$ Hz, $J_{BX}=4.5$ Hz y $J_{AX}= 8.4$ Hz. Estas tres señales corresponden a un sistema ABM. En δ 2.54 ppm se encuentra la señal del grupo metilo sobre el nitrógeno y el grupo gem dimetilo aparece como una señal simple en δ 1.93 ppm.



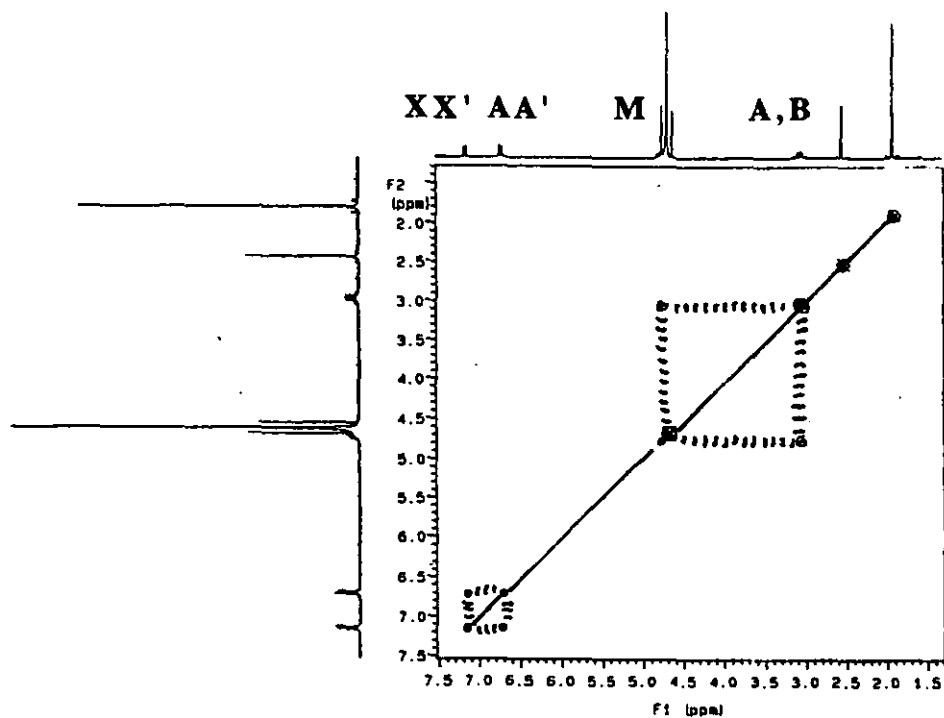
Espectro 6. RMN de protones del acetónido de sinefrina. La muestra se disolvió en metanol deuterado y se determinó a temperatura ambiente en un equipo Varian XL 300 MHz.

El espectro COSY (correlación homonuclear de hidrógeno) corrobora el acoplamiento entre los protones XX' y AA' que se encuentran en δ 7.18 y 6.71 ppm, respectivamente. El acoplamiento establecido se realiza a tres enlaces de distancia. Las señales de los metilos N-CH₃ y C-(CH₃)₂ aparecen como singletes y no muestran ningún acoplamiento. En cambio, el

acoplamiento entre los hidrógenos del sistema ABM es claramente observable en concordancia con la estructura propuesta (Espectro 7).



Acetónido de Sinefrina

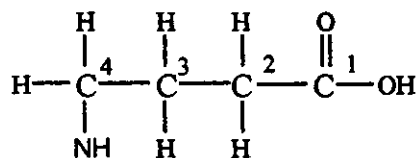


Espectro 7. COSY (correlación homonuclear de hidrógeno) del acetónido de sinefrina. La muestra se disolvió en metanol deuterado y se determinó a temperatura ambiente en un equipo Varian XL 300 MHz.

7.1.2.3. *N*-metilprolina, prolina y ácido gama aminobutírico

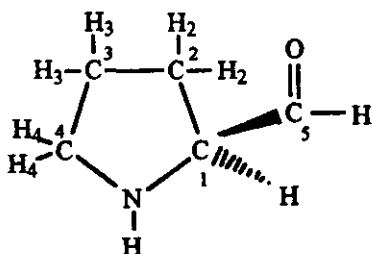
Las fracciones 40 a la 65 separadas del EMeOH por CC, se agruparon por similitud cromatográfica en CCF y porque producen hipotensión arterial sostenida en la rata normotensa anestesiada. El agrupamiento resultó en una masa pastosa de coloración café oscuro la cual fue objeto de sucesivas recromatografías en columna y en CCF preparativa hasta obtener un precipitado cristalino en forma de agujas. Este precipitado da una mancha (rf de 0.44) bien delimitada que no fue posible separar en sus componentes puros con diversos sistemas de elución (mezclas de propanol, acetonitrilo y agua). El análisis de las fracciones por RMN de 500 MHz permitió identificar una mezcla constituida por MP (70%), P (18 %), GABA (12 %) y otros componentes (< 1%) no identificados. La identificación de las señales obtenidas por RMN de ^1H (Espectro 8) y de ^{13}C de la mezcla mencionada, se efectuó mediante espectros bidimensionales, COSY, TOCSY, HMQC y HMBC y las asignaciones para cada compuesto se resumen en las Tablas III, IV y V.

TABLA III Asignaciones finales de los espectros de ^1H y ^{13}C para GABA. Disolvente: Agua deuterada. δ_{C} = desplazamiento químico de carbono. δ_{H} = desplazamiento químico de Hidrógeno.



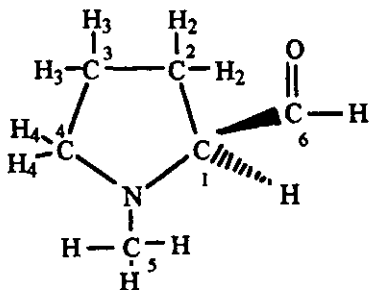
CARBONO	GABA		GABA en la mezcla	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
CO ₂ H	182.5	^1H ácido 2.39	174.5	-----
2	35.6	3.58	-----	2.14
3	26.1	1.83	24.5	1.75
4	40.4	3.00	40	2.86

TABLA IV. Asignaciones finales de los espectros de ^1H y ^{13}C para L-Prolina. Disolvente: Agua deuterada. δ_{C} = desplazamiento químico de carbono. δ_{H} = desplazamiento químico de Hidrógeno.

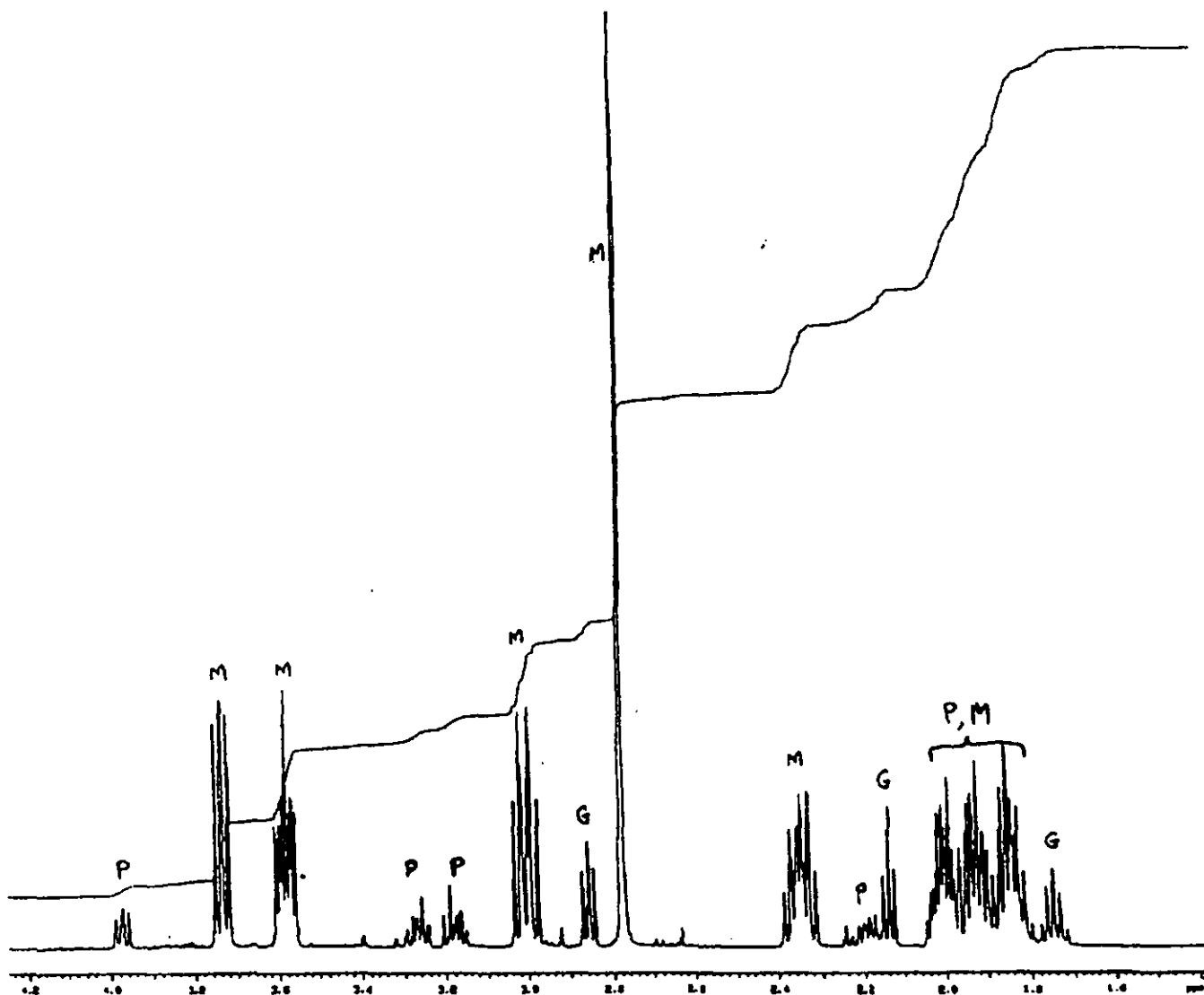


CARBONO	L-Prolina		L-Prolina en la mezcla	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C ₁	63.97	3.6	-----	3.98
C ₂	31.78	1.92	32	2.2
		1.96	-----	-----
C ₃	26.56	1.67	25	-----
		1.76	-----	-----
C ₄	48.83	3.0	47	3.18
		3.2	-----	3.26
CO ₂ H	177.36	-----	178	-----

TABLA V. Asignaciones finales de los espectros de ^1H y ^{13}C para L-Metil-Prolina. Disolventes: Agua deuterada y dimetilsulfóxido δ_{C} = desplazamiento químico de carbono. δ_{H} = desplazamiento químico de Hidrógeno.



CARBONO	L-Metil-Prolina		L-Metil-Prolina en la mezcla	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C ₁	70.04	3.6	-----	3.74
C ₂	28.81	1.92	29	-----
		1.98	-----	-----
C ₃	22.87	1.67	24	-----
		1.75	-----	-----
C ₄	55.57	2.98	56	3.0
		3.19	-----	3.6
C ₅	40.44	2.65	42	2.78
CO ₂ H	170.09	-----	175	-----



Espectro 8. RMN de protones realizada con una muestra que produce hipotensión arterial sostenida en la rata anestesiada. La muestra se disolvió en agua deuterada (D_2O) y se determinó a temperatura ambiente en un equipo Varian Unity de 500 MHz. Las señales correspondientes a Prolina, Metilprolina y Gaba, se indican con las letras P, M y G respectivamente.

7.1.2.4 Casimiroedina

Las fracciones 20 a la 55 separadas del EMeOH por CC empacada con sílica-gel y eluida con una mezcla de propanol-agua (2:1) con hidróxido de amonio al 0.5 %, se agruparon por sus características cromatográficas y concentraron en rotavapor obteniéndose un polvo amorfo,

esponjoso, blanquecino con r_f de 0.82 en CCF cuando se eluye con la mezcla mencionada. El polvo se purificó por precipitaciones sucesivas en MeOH y $\text{CH}_2\text{-Cl}_2$ (diclorometano) hasta obtener el compuesto puro que se caracterizó como CAS por sus constantes físicas informadas en la literatura (Kincl y col., 1956). Resulta interesante que los espectros bidimensionales de correlación heteronuclear (HETCOR) y de detección inversa (HMQC y HMBC), muestran en torno al enlace amídico, señales independientes para dos isómeros conformacionales de CAS los cuales se ilustran en la Figura 4.

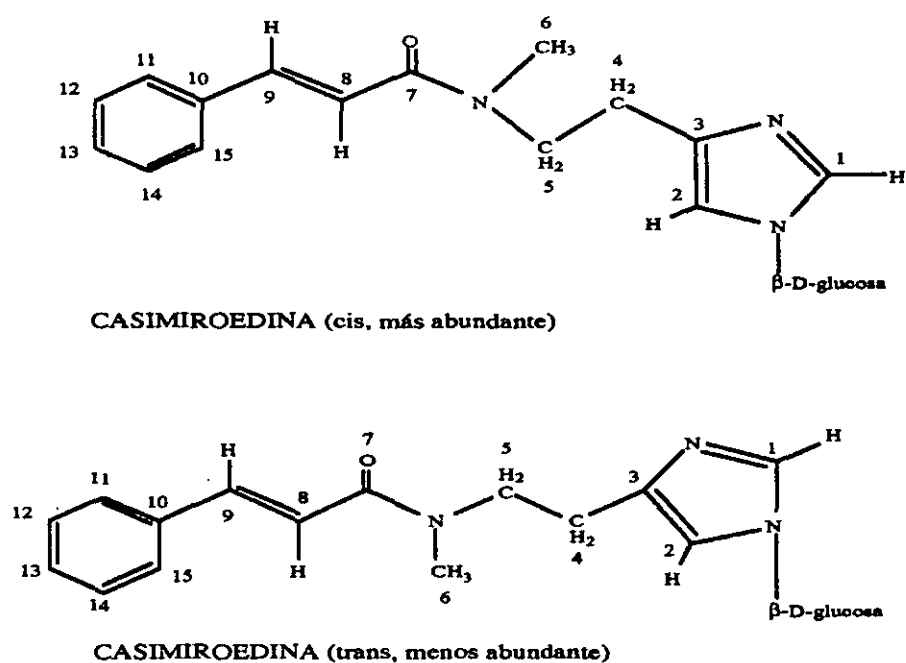


Fig 4. Representación estructural enumerada de los dos isómeros de casimiroedina aislados del EMeOH (extracto metanólico) de la semilla de *C. edulis*.

Los desplazamientos químicos de hidrógeno y carbono para cada isómero de CAS se resumen en la Tabla VI.

TABLA VI. Asignaciones finales de los espectros de ^1H y ^{13}C para cada uno de los isómeros de Casimiroedina. Disolvente: cloroformo deuterado. δ_{C} = desplazamiento químico de carbono. δ_{H} = desplazamiento químico de Hidrógeno.

CARBONO	ISOMERO más abundante		ISOMERO menos abundante	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	138.08	7.74	137.76	7.80
2	116.57	7.13	115.92	7.14
3	138.76	-----	139.76	-----
4	28.09	2.855	26.81	2.82
5	50.82	3.78	49.54	3.70
6	34.47	3.03	36.48	3.17
7	168.83	-----	168.30	-----
8	118.60	6.96	119.01	7.095
9	143.12	7.445	143.35	7.54
10	136.47	-----	136.42	-----
11	129.00	7.62	128.95	7.63
12	129.79	7.40	129.85	7.40
13	130.62	7.38	130.75	7.38
14	129.79	7.40	129.85	7.40
15	129.00	7.62	128.95	7.63

7.2. Farmacológicos

7.2.1. Efectos cardiovasculares de los nueve extractos

Los residuos extraídos del polvo de la semilla con diclorometano y metanol, mediante los procedimientos de reflujo y maceración, producen disminución de la PAM e incremento de la FC. Los extractos obtenidos con diclorometano, son más taquicardizantes y menos hipotensores que los extractos obtenidos con metanol. Estos resultados, contrastan con los efectos observados con la ministración de los residuos extraídos de manera rápida, en donde sólo el EMeOH produce

hipotensión y taquicardia, siendo el efecto hipotensor más intenso que el producido por los extractos metanólicos del macerado y del reflujo (Tabla VII).

Tabla VII. Efectos máximos producidos en la PAM (mm Hg) y en la FC (lat/min) de ratas anestesiadas^a, por nueve extractos^b obtenidos con disolventes orgánicos de la semilla pulverizada de *C. edulis*, mediante tres procedimientos de extracción.

Disolventes	Reflujo		Maceración		Rápida	
	Efectos máximos		Efectos máximos		Efectos máximos	
	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC
Hexano	-10 ± 6	10 ± 8	-5 ± 5	5 ± 21	5 ± 2	10 ± 5
Diclorometano	-32 ± 8*	58 ± 16*	-30 ± 18*	62 ± 18*	-10 ± 5	17 ± 8
Metanol	-52 ± 12*	42 ± 12*	-56 ± 16*	44 ± 16*	-74 ± 12*	38 ± 14*

^aLos valores son las medias ± E.E.M. de los cambios máximos producidos por los extractos, sobre la PAM y la FC basal de ratas anestesiadas; n=3. ^bCada uno de los extractos se ministra de manera independiente por vía i.v. en dosis de 10 mg/Kg *Diferencia significativa con respecto a los valores basales p < 0.05.

7.2.2 Efectos cardiovasculares del extracto alcohólico completo comparados con la histamina

La ministración i.v. del extracto alcohólico completo, produce en la rata anestesiada, disminución de la PAM e incremento de la FC, ambos efectos son dosis dependientes. En contraste, la H ministrada por la misma vía, produce hipotensión arterial sin modificar la FC (Figura 5). Como se observa en la misma figura, el efecto hipotensor del extracto ocurre segundos después de inyectarlo y se revierte inmediatamente para volver a presentarse hasta que desaparece gradualmente en los siguientes 12 minutos. Este efecto bifásico difiere del efecto hipotensor transitorio producido por la H.

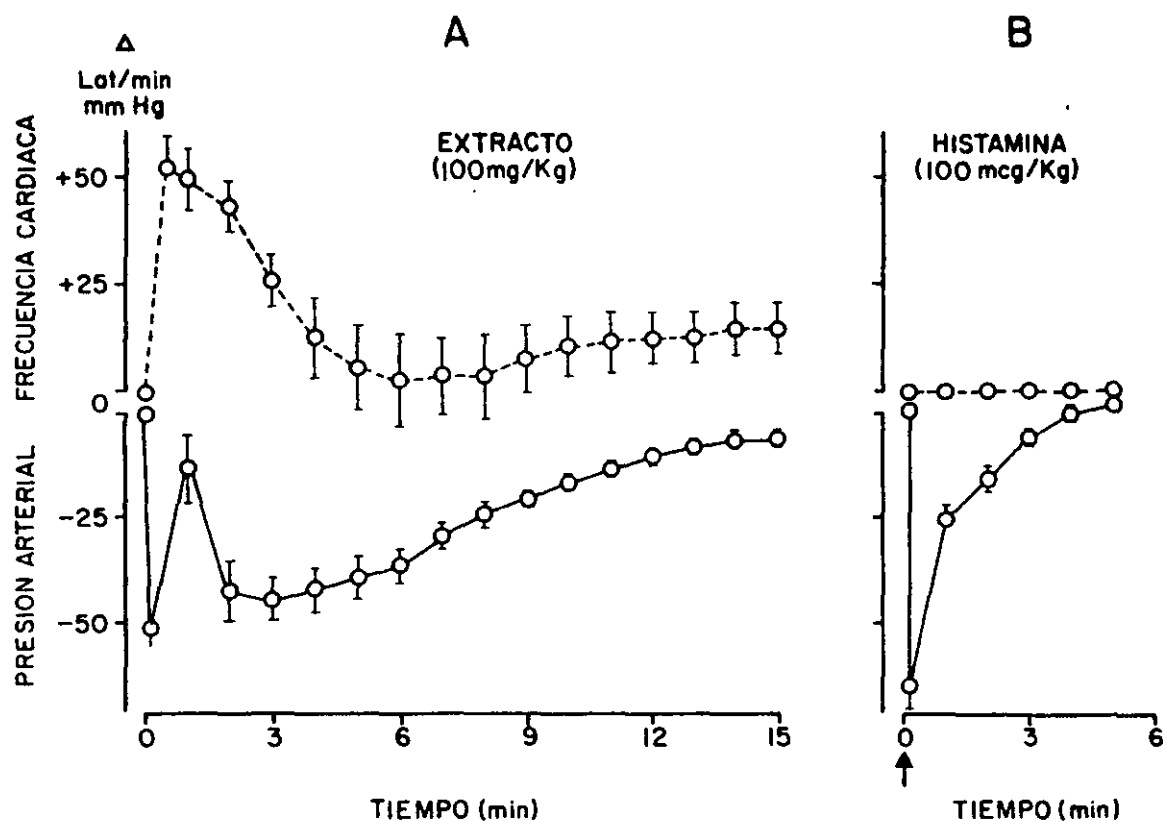


Fig 5. Cambios en la presión arterial media (o—o—o) y en la frecuencia cardíaca (o---o---o), producidos por la ministración i.v. del extracto alcohólico de la semilla de *C. edulis* (panel A) y por la Histamina (panel B) en ratas anestesiadas. EL extracto se liberó del alcohol con alto vacío y se disolvió en solución salina para su ministración. Los círculos representan la respuesta media de 6 animales. Las líneas verticales denotan el error estándar. Las abscisas indican el tiempo de registro después de la ministración del extracto alcohólico o de la histamina. Las ordenadas indican los cambios en mm Hg y latidos por minuto con respecto a los valores basales.

7.2.3 Influencia del pretratamiento con difenhidramina o cimetidina, sobre los efectos cardiovasculares del extracto alcohólico y de la histamina

La hipotensión producida por el extracto liberado del alcohol con alto vacío, es revertida a un efecto hipertensor cuando se ministra previamente el antagonista H₁ difenhidramina, pero no es afectada por el pretratamiento con el antagonista H₂ cimetidina. En contraste, la hipotensión

producida por H se antagoniza significativamente, pero no se revierte, con difenhidramina y en menor intensidad es modificada por cimetidina. La taquicardia producida por el extracto, es parcialmente inhibida por el antagonista H₁ y no se modifica por la ministración previa del antagonista H₂ (Figura 6).

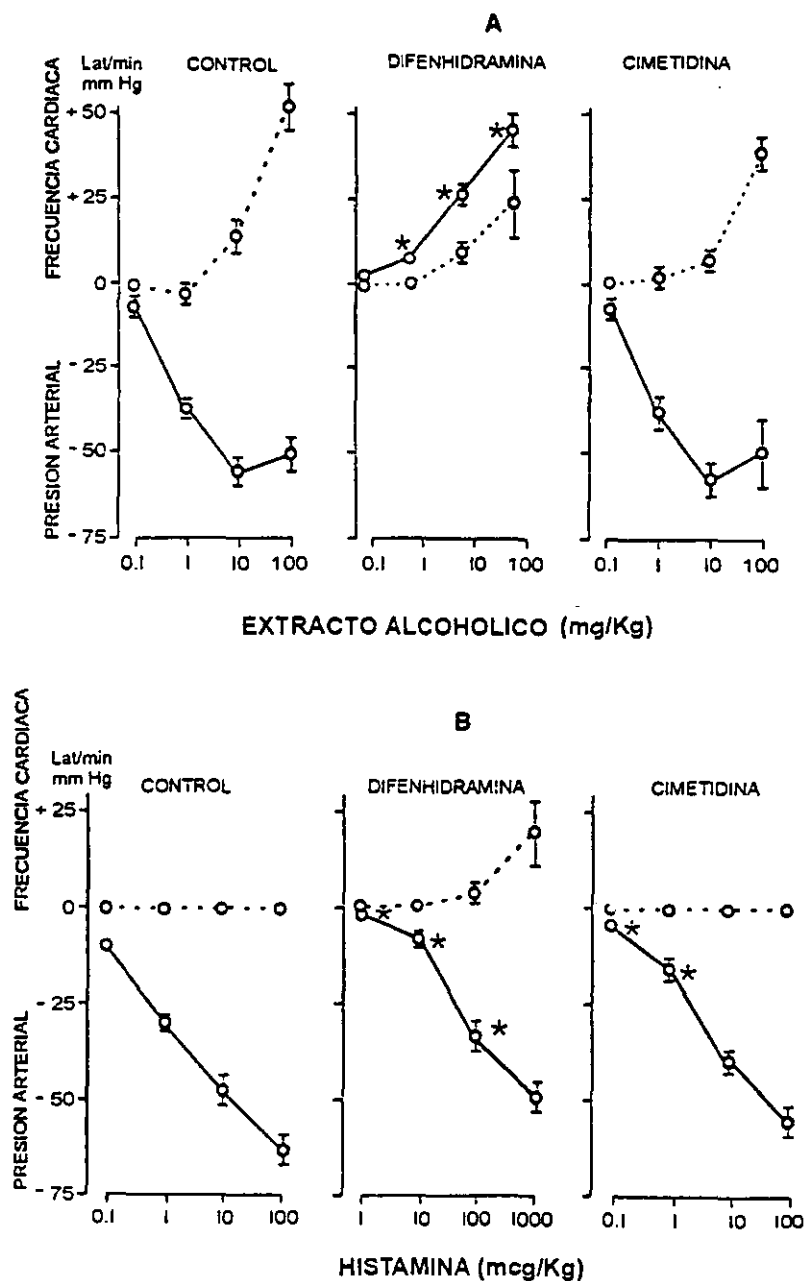


Fig 6. Influencia del pretratamiento con: difenhidramina, 10 mg/Kg; cimetidina, 10 mg/Kg ó solución salina, 1ml/kg (grupo control), sobre las respuestas inmediatas de presión arterial media (O—O—O) y frecuencia cardíaca (O---O---O) observadas en ratas anestesiadas después de la ministración i.v. de dosis crecientes del extracto etanólico de la semilla de *C. edulis* (panel A), ó de la histamina (panel B). Los símbolos representan la respuesta media de 6 animales. Las líneas verticales denotan el error estándar de la media. Los asteriscos indican las diferencias significativas con respecto al grupo control $p < 0.05$. Las abscisas indican las dosis ministradas del extracto ó de la histamina. Las ordenadas los cambios en la PAM y en la FC en mm Hg y latidos por minuto respectivamente. Nótese la diferente escala en la abscisa del grupo que recibió la histamina previa ministración de difendhidramina.

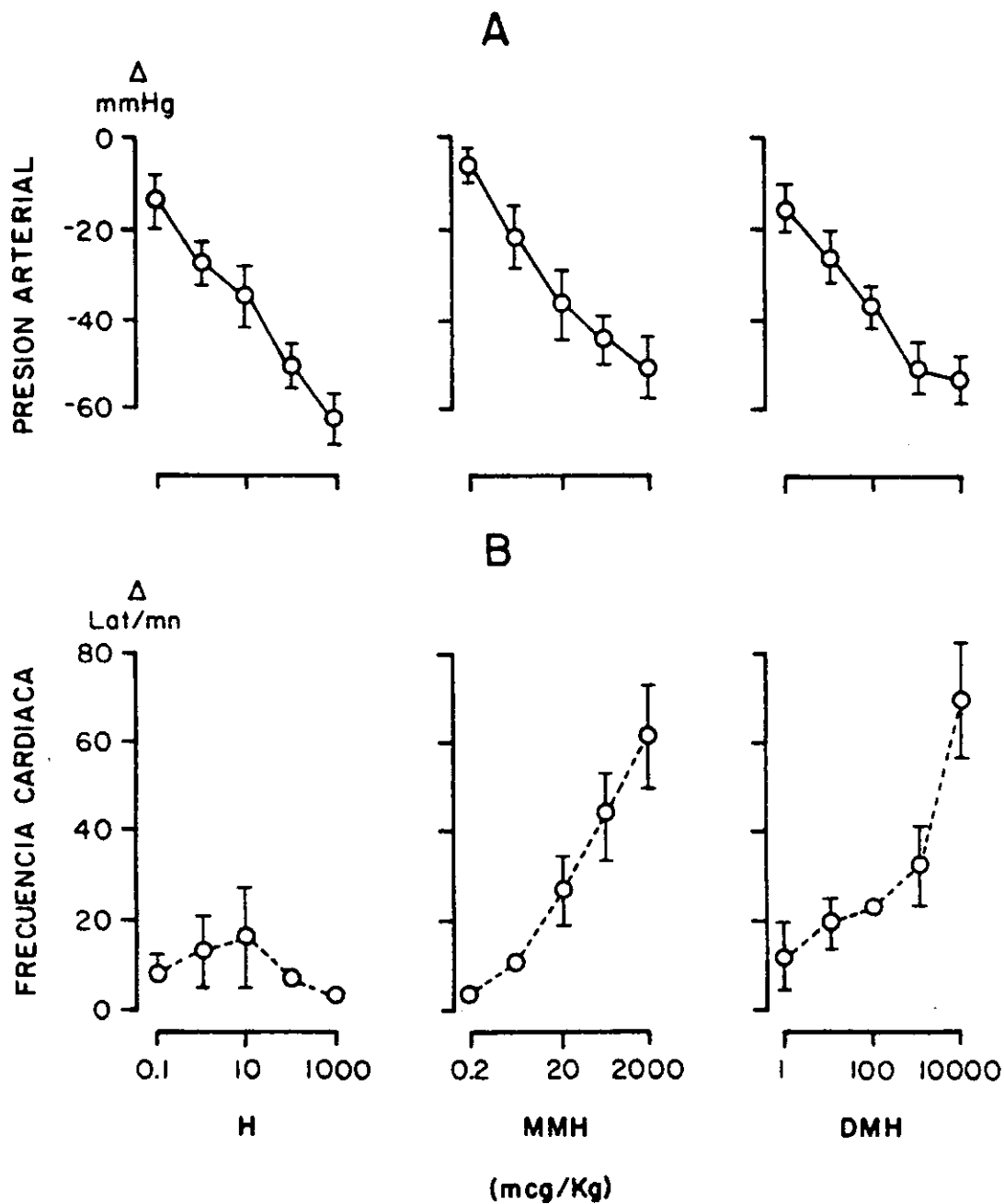


Fig 7. Cambios en la presión arterial media (panel A) y en la frecuencia cardíaca (panel B) de la rata anestesiada, producidos por la ministración i.v. de dosis crecientes de H, histamina; MMH, N-monometilhistamina y DMH, N,N-dimetilhistamina. Resto de la descripción como en la Figura 6. Nótese la diferente escala en la abscisa de los tres grupos experimentales.

7.2.5. Influencia del pretratamiento con loratadina o cimetidina sobre los efectos cardiovasculares de la histamina, N-monometilhistamina y N,N-dimetilhistamina

Los valores iniciales de la PAM y de la FC, registrados antes de administrar las sustancias antihistamínicas y las sustancias imidazólicas, se muestran en la Tabla IX. La comparación de estos valores por ANOVA, no muestra diferencias significativas. En todos los grupos, los valores de la PAM se encuentran incrementados, de manera similar a lo observado en los grupos de ratas cuyos valores de PAM son resumidos en la Tabla VIII.

Tabla IX. Valores iniciales de PAM y FC, obtenidos en diferentes grupos experimentales de ratas anestesiadas^a antes de iniciar los tratamientos.

Grupos ^b	PAM (mm Hg)	FC (lat/min)
Loratadina + Histamina	130 ± 3.65	443 ± 10.94
Cimetidina + Histamina	116 ± 2.71	432 ± 8.72
Loratadina + N-Monometilhistamina	130 ± 3.42	438 ± 6.01
Cimetidina + N-Monometilhistamina	125 ± 5.77	417 ± 9.46
Loratadina + N,N-Dimetilhistamina	127 ± 9.46	430 ± 18.44
Loratadina + N,N-Dimetilhistamina	124 ± 6.11	423 ± 9.86

^aLos valores son las medias ± E.E.M. de la PAM y FC, n=6. ^bEl nombre del grupo se asignó de acuerdo a las sustancias que se ministraron posteriormente, solo para diferenciarlos, y no se registra en la presente tabla, actividad alguna de las sustancias referidas.

El efecto hipotensor producido por cada una de las tres sustancias imidazólicas, es inhibido significativamente por el fármaco antagonista de los receptores periféricos H₁, loratadina, y no se modifica por el fármaco antagonista de los receptores H₂, cimetidina. El efecto cronotrópico positivo producido por MMH se modifica significativamente con cimetidina solo en un punto de

la gráfica, en cambio ninguno de los fármacos antihistamínicos parece modificar la taquicardia producida por la DMH (Figura 8).

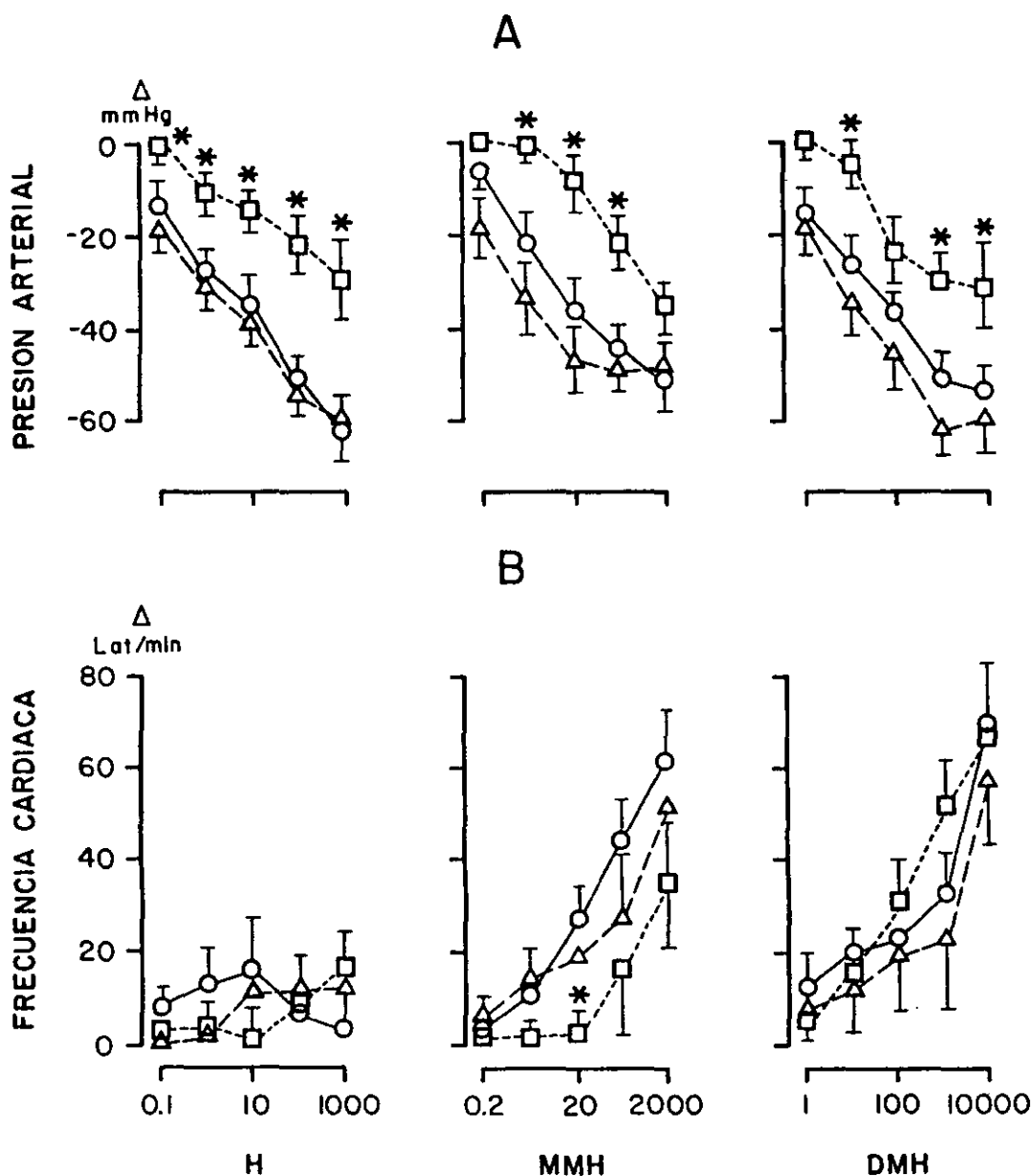


Fig 8. Influencia del pretratamiento con: loratadina, 10 mg/Kg (□---□---□); cimetidina, 10 mg/Kg (Δ---Δ---Δ) o solución salina, 1ml/kg (grupo control o—o—o), sobre las respuestas inmediatas de presión arterial media (panel A) y frecuencia cardíaca (panel B) producidas en ratas anestesiadas por dosis crecientes de H, histamina, MMH, N-monometilhistamina y DMH, N,N-dimetilhistamina. Nótese la diferente escala en las abscisas de los tres imidazoles. El resto de la descripción está como en la Figura 6.

Con el propósito de cuantificar y comparar la susceptibilidad de las ratas, a la hipotensión y taquicardia producidas por cada una de las sustancias imidazólicas, se determinó la dosis que produce disminución de 30 mm Hg o incremento de 30 latidos por min (D_{30}). Este valor, se calculó mediante regresión lineal de los experimentos en donde las respuestas graduales de hipotensión y taquicardia producidas por los imidazoles, son mayores de 30 mm Hg y de 30 latidos por min, respectivamente. Además, sólo se incluyeron las respuestas cardiovasculares que guardan relación directamente proporcional a las dosis empleadas y que se encuentren dentro del rango del 20% al 80 % del efecto máximo alcanzado con las dosis empleadas de cada sustancia imidazólica. La (Tabla X) y la (Tabla XI) muestran los valores de la D_{30} promedio para cada una de las sustancias. Estas dosis producen disminución de 30 mm Hg en la PAM (D_{30} mm Hg) e incremento de 30 latidos por minuto en la FC (D_{30} lat/min). Como se esperaba, la loratadina incrementó significativamente la D_{30} mm Hg de las tres sustancias imidazólicas probadas, mientras que la cimetidina prácticamente no las modificó (Tabla X).

Tabla X. D_{30} 's^a de tres sustancias imidazólicas que disminuyen en 30 mm Hg la PAM de ratas anestesiadas^b pretratadas con solución salina (control) o con sustancias antihistamínicas.

Imidazoles	P r e t r a t a m i e n t o ^d		
	Control	Loratadina	Cimetidina
	D_{30}	D_{30}	D_{30}
Histamina	2.78 ± 1	135 ± 21*	3 ± 1
N-Monometilhistamina	21.3 ± 14	1696 ± 206*	4.2 ± 6
N,N-Dimetilhistamina	50.7 ± 15	2109 ± 649*	18.6 ± 3

^a D_{30} : dosis (mcg/Kg) que disminuye 30 mm Hg la PAM. ^bLos valores son las medias ± E.E.M. de la D_{30} , n=6. ^cSe realizó 10 min. antes de la ministración de las sustancias imidazólicas. *Diferencia significativa con el grupo control ($p < 0.05$).

En los mismos experimentos, el cálculo de las dosis que incrementan en 30 lat/min la FC, indican que el efecto cronotrópico positivo producido por MMH o DMH, no parece ser modificado por los antagonistas de los receptores H₁ y H₂, ya que las D₃₀'s lat/min de ambos imidazoles, no muestran diferencias estadísticas (Tabla XI).

Tabla XI. D₃₀'s^a de tres sustancias imidazólicas que incrementan en 30 lat/min la FC de ratas anestesiadas^b pretratadas con solución salina (control) o con sustancias antihistamínicas.

Imidazoles	P r e t r a t a m i e n t o ^c		
	Control	Loratadina	Cimetidina
	D ₃₀	D ₃₀	D ₃₀
Histamina	-----	-----	-----
Monometilhistamina	225 ± 110	158 ± 106	121 ± 80
Dimetilhistamina	832 ± 1114	474 ± 356	1436 ± 915

^aD₃₀: dosis (mcg/Kg) que incrementa 30 latidos por minuto la FC. ^bLos valores son las medias ± E.E.M. de la D₃₀, n=6. ^cSe realizó 10 min antes de la ministración de las sustancias imidazólicas. *Diferencia significativa con el grupo control (p < 0.05).

7.2.6. Influencia del pretratamiento con fenilefrina y el éster metílico de N- ω -nitro-L-arginina (L-NAME), sobre los efectos cardiovasculares de la histamina, N-monometilhistamina y N,N-dimetilhistamina

Para demostrar la participación del óxido nítrico (ON) en los efectos cardiovasculares producidos por las sustancias imidazólicas, inicialmente se realizaron pruebas preliminares en ratas pretratadas con el inhibidor de la sintasa de ON, L-NAME y la ministración de dosis crecientes de la sustancia de referencia H. En estos experimentos, el L-NAME no antagoniza la actividad hipotensora de la H. Sin embargo, cuando se incrementa la resistencia vascular periférica

en las ratas anestesiadas, por medio de una infusión iv. continua de fenilefrina, el L-NAME, logra bloquear significativamente el efecto hipotensor del fármaco histaminérgico (Figura 9).

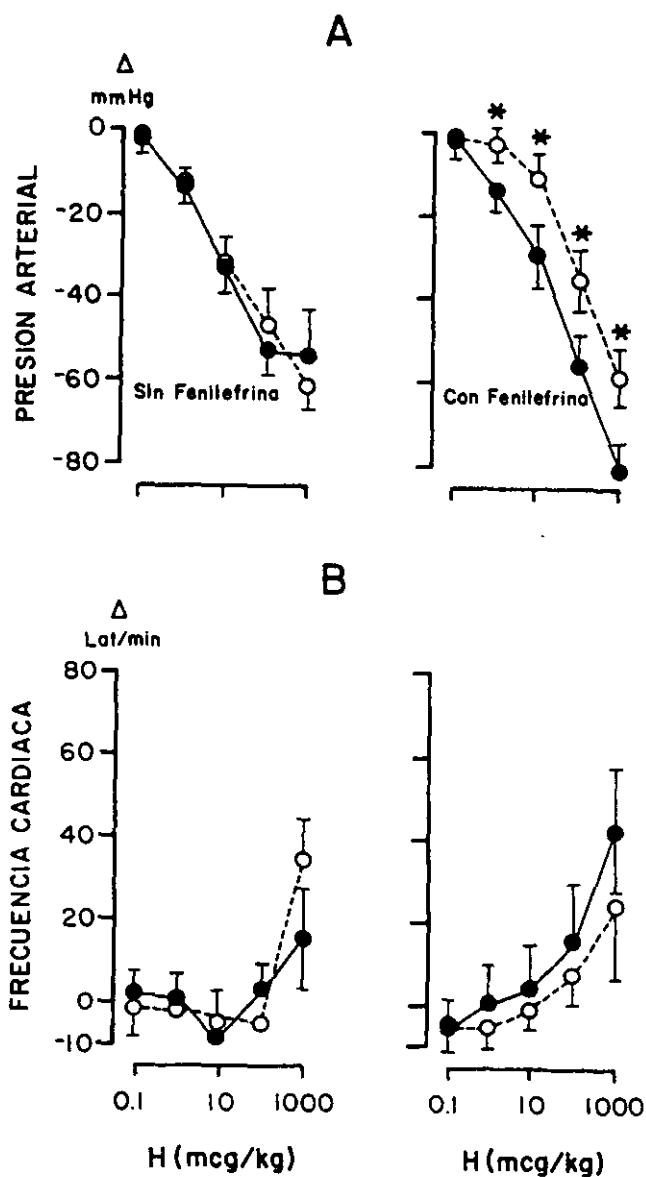


Fig 9. Influencia del pretratamiento i.v. con 31 mg/Kg del éster metílico N- ω -nitro-L-arginina (L-NAME), sobre las respuestas inmediatas de presión arterial media (panel A) y de frecuencia cardíaca (panel B) a la histamina (H) en ratas anestesiadas. Las gráficas son obtenidas antes (●—●—●) y después (○—○—○) de la ministración de L-NAME, en animales sin y con infusión i.v. continua de 30 mcg/Kg/min de fenilefrina (gráficas izquierdas y derechas respectivamente). Los asteriscos denotan las diferencias significativas con respecto a los valores registrados antes de la ministración de L-NAME $p < 0.05$. El resto de la descripción esta como en la Fig 6.

Basados en estos estudios, se exploró la participación del ON en los efectos cardiovasculares producidos por MMH y DMH. Para tal propósito, todos los experimentos se realizaron en ratas sometidas a una infusión i.v. continua de fenilefrina y bajo estas condiciones, se realizaron curvas dosis-respuesta a los dos análogos de la H, antes y después de la administración de L-NAME. Como se esperaba, la fenilefrina incrementa significativamente la PAM y disminuye la FC de los tres grupos de ratas (Tabla XII). El primer efecto se estabiliza y se mantiene a los 15 min de haber iniciado la infusión del agonista α adrenérgico, mientras que el segundo efecto observado en los primeros 5 min (bradicardia refleja), disminuye paulatinamente hasta desaparecer, lo cual ocurre antes de iniciar la ministración de los imidazoles. Obsérvese que los valores de la FC al minuto 15 son prácticamente similares a los valores basales (Tabla XII).

Tabla XII Valores de la PAM y de la FC de diferentes grupos de ratas anestesiadas^a, obtenidos antes (basal) y durante la ministración de fenilefrina^b.

Grupos ^c	Tiempo transcurrido de la infusión de fenilefrina					
	0 min (Basal)		5 min		15 min	
	PAM mmHg	FC lat/min	PAM mmHg	FC lat/min	PAM mmHg	FC lat/min
Histamina	121 ± 6	402 ± 16	158 ± 5*	248 ± 27*	168 ± 4*	397 ± 10
Monometilhistamina	128 ± 6	402 ± 12	164 ± 4*	235 ± 20*	152 ± 8*	390 ± 10
Dimetilhistamina	129 ± 4	403 ± 9	160 ± 2*	230 ± 14*	149 ± 9*	398 ± 7

^aLos valores son las medias \pm E.E.M. de la PAM y de la FC, n=6. ^bInfusión i.v. continua de 30 mcg/Kg/min. ^cEl nombre del grupo se asignó, de acuerdo a las sustancias imidazólicas que se ministraron durante la infusión de la fenilefrina, solo para diferenciarlos, y no que se registra en la presente tabla, actividad alguna de las sustancias referidas.

Además, el pretratamiento con L-NAME antagoniza el efecto hipotensor producido por la DMH, por un mecanismo aparentemente similar al observado en el bloqueo de la actividad

hipotensora de la H (Figura 10A). En contraste, la hipotensión producida por MMH no se modifica. En estos mismos experimentos, el efecto cronotrópico positivo producido por DMH, es parcialmente inhibido por el pretratamiento con L-NAME (Figura 10B).

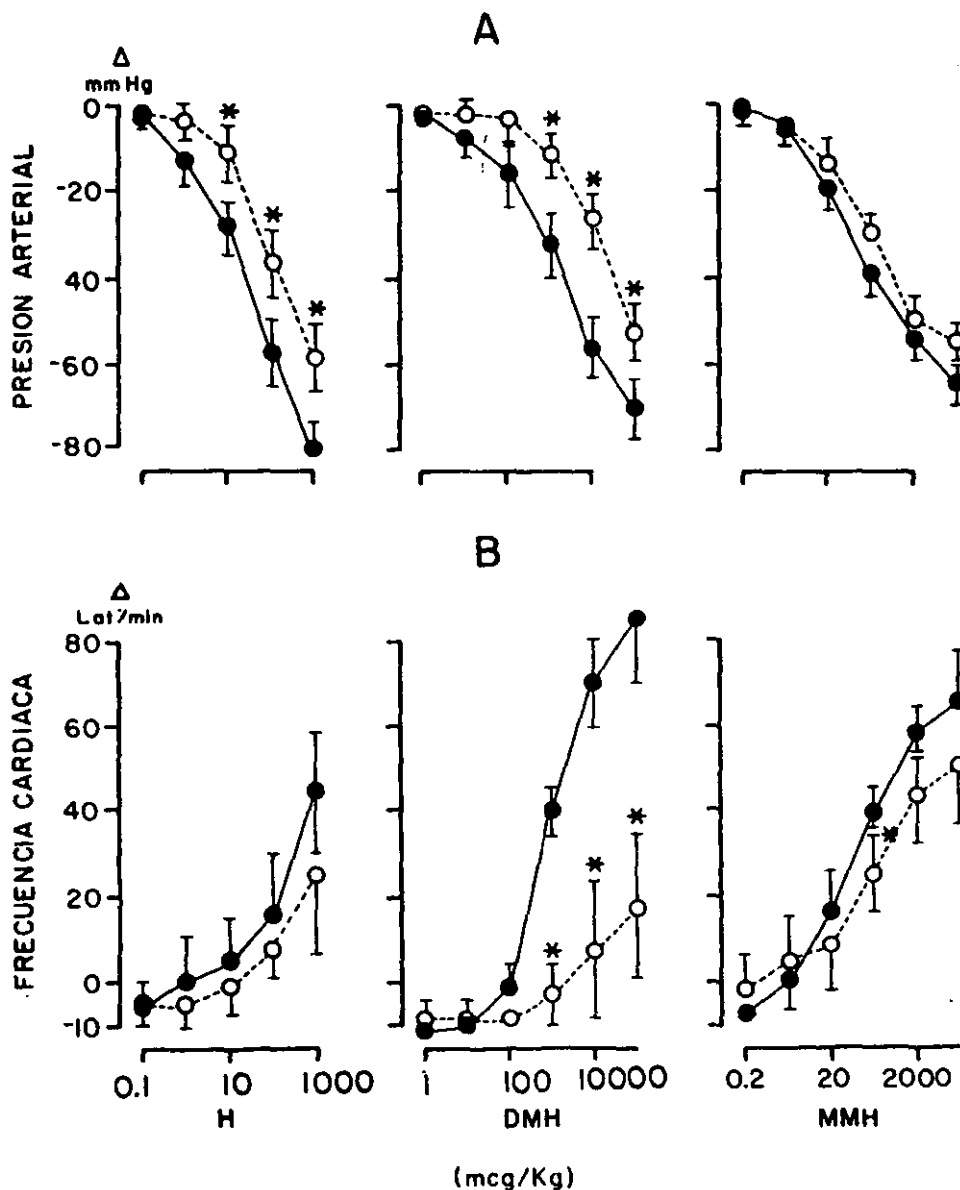


Fig 10. Influencia del pretratamiento i.v. de 31 mg/Kg del éster metílico N ω -nitro-L-arginina (L-NAME), sobre las respuestas inmediatas de presión arterial media (panel A) y frecuencia cardíaca (panel B) a la histamina (H) N,N-dimetilhistamina (DMH) y N-monometilhistamina (MMH) en ratas anestesiadas. Las gráficas son obtenidas de animales tratados con infusión i.v. continua de fenilefrina (30 mcg/Kg/min), antes (●—●—●) y después (○---○---○) de la ministración de L-NAME. Los asteriscos denotan las diferencias significativas con respecto a los valores registrados antes de la administración de L-NAME $p < 0.05$. Resto de la descripción como en la Fig 6. Nótese las diferentes escalas en las abscisas.

El cálculo de la dosis que disminuyen 30 mm Hg los valores básales de la PAM confirman que el pretratamiento con el inhibidor de la sintasa de ON, bloquea el efecto hipotensor de la H y de la DMH, ya que las D₃₀'s mm Hg de ambos imidazoles, calculadas después de la ministración de L-NAME, se incrementan alrededor de 14 veces. En contraste, la hipotensión producida por MMH no se encuentra modificada por L-NAME, manteniéndose las D₃₀'s mm Hg de este grupo, sin diferencias estadísticas (Tabla XIII).

Tabla XIII. D₃₀'s mm Hg^a de tres sustancias imidazólicas, calculadas antes y después de ministrar L-NAME^b en ratas tratadas con fenilefrina^c

Imidazoles	Antes de L-NAME	Después de L-NAME
	D ₃₀ mcg/Kg	D ₃₀ mcg/Kg
Histamina	11.72 ± 4.78	173 ± 70.6*
N-Monometilhistamina	106 ± 36.3	182 ± 34.7
N,N-Dimetilhistamina	122 ± 44.8	1705 ± 623*

^aD₃₀: dosis que disminuye 30 mm Hg la presión arterial media de ratas anestesiadas. Los valores son las medias ± E.E.M. de la DE₃₀ mm Hg, n=6. ^bDosis i.v. de 31 mg/Kg. ^cInfusión i.v. continua de 30 mcg/Kg/min. *Los asteriscos indican diferencias significativas comparadas con el mismo grupo antes de recibir L-NAME p < 0.05.

7.2.7. Efectos cardiovasculares comparativos entre la sinefrina y el acetónido de sinefrina

En esta serie de experimentos, todas las ratas fueron pretratadas con atropina para prevenir la bradicardia refleja inducida por el AS y por el fármaco de referencia sinefrina (S). La feniletilamina ciclizada, denominada AS, cuando se ministra a ratas anestesiadas, 10 min después de haber ministrado atropina, produce incremento de la PAM y de la FC dosis dependiente. Estos efectos son idénticos a los efectos producidos por la S (Figura 11).

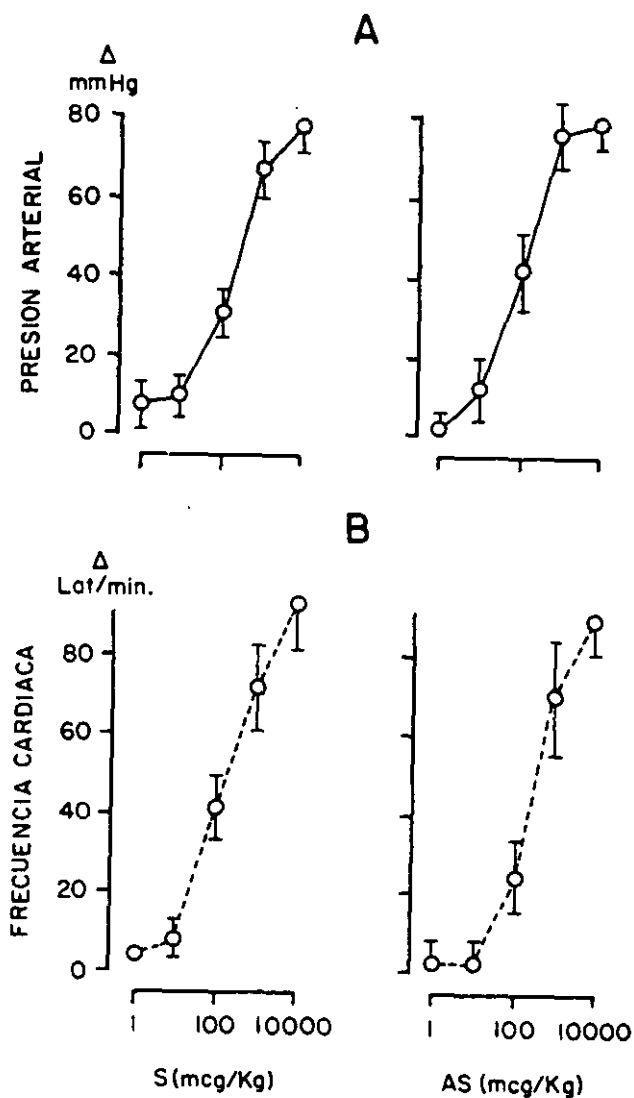


Fig 11. Cambios en la presión arterial media (panel A) y en la frecuencia cardíaca (panel B) de ratas anestesiadas, producidos por la ministración i.v. de dosis crecientes del AS, acetónido de sinefrina y de la S, sinefrina. Todos los animales recibieron 10 min antes de los tratamientos, 1 mg/Kg i.v. de atropina. Resto de la descripción como en la Figura 6.

7.2.8. Influencia del pretratamiento con atropina, prazosina o propranolol sobre los efectos cardiovasculares de la sinefrina y del acetónido de sinefrina

La Tabla XIV contiene los cambios en la PAM y en la FC basal, producidos por la ministración de atropina, prazosina o propranolol, fármacos antagonistas de los receptores

muscarínicos y de los receptores adrenérgicos α_1 y β respectivamente. La ministración de atropina (1 mg/Kg), no cambia de manera significativa los valores básales promedio de la PAM (100 ± 2 mm Hg) y de la FC (391 ± 5 lat/min). La prazosina (0.31 mg/Kg) disminuye significativamente la PAM y no modifica la FC, mientras que el propranolol (1 mg/Kg) disminuye significativamente ambas variables.

Tabla XIV. Valores iniciales de PAM y FC basal de ratas^a pretratadas con antagonistas de receptores adrenérgicos y del receptor muscarínico.

Grupos ^b	F á r m a c o s a n t a g o n i s t a s					
	Atropina		Propranolol		Prazosina	
	PAM mm Hg	FC lat/min	PAM mm Hg	FC lat/min	PAM mm Hg	FC lat/min
Acetónido de sinefrina	108±7.1	394±17.7	72±6.2*	352±6.9*	78±8.2*	380±15
Sinefrina	104±6.2	373±21.2	78±4.2*	330±13.7*	80±57*	375±17

^aLos valores son las medias \pm E.E.M. de la PAM y de la FC de ratas, n=6. ^bEl nombre del grupo se asignó, de las sustancias que se ministraron posteriormente, solo para diferenciarlos, y no se registra en la presente tabla, actividad alguna de las sustancias referidas.

El efecto hipertensor producido por el AS y por el fármaco de referencia S, se inhibe significativamente por el pretratamiento con prazosina y no se modifica por el pretratamiento con propranolol. En contraste, la taquicardia producida por el AS y por el compuesto de referencia S, se inhibe parcialmente con ambos fármacos antagonistas de los receptores α_1 y β adrenérgicos (Figura 12).

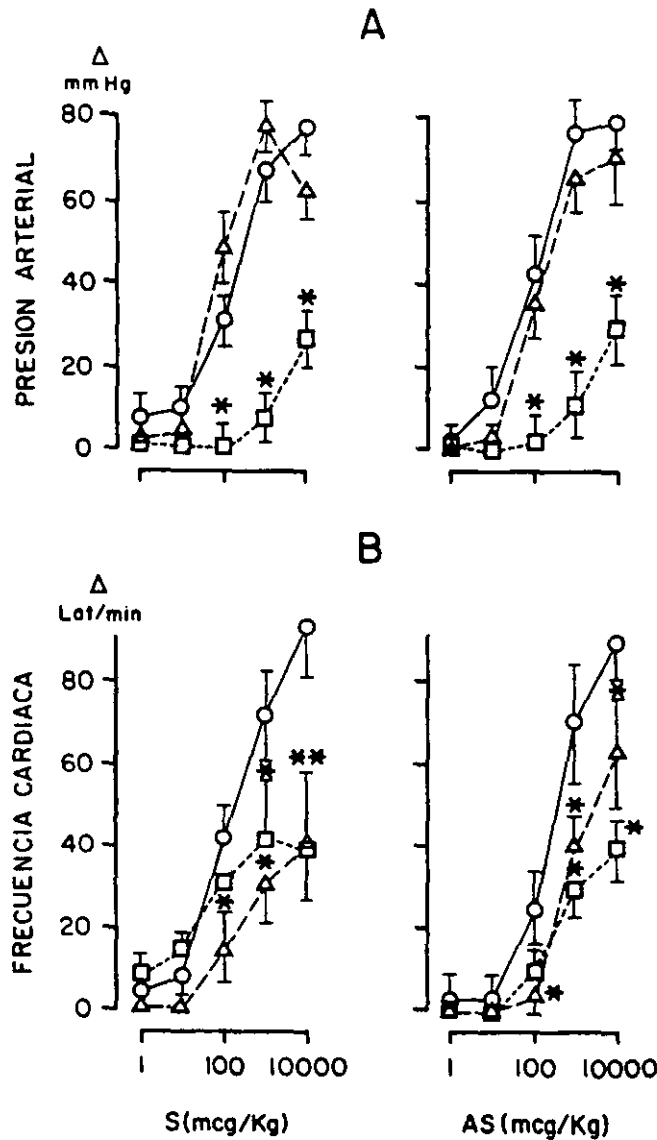


Fig 12. Influencia del pretratamiento con: 1 mg/Kg de propranolol (Δ --- Δ --- Δ); 1 mg/Kg de prazosina (\square ---- \square ---- \square) o 1ml/kg de solución salina (grupo control O—O—O), sobre las respuestas inmediatas de presión arterial media (panel A) y frecuencia cardíaca (panel B) a la sinefrina (S) y al acetónido de sinefrina (AS) en ratas anestesiadas. Todos los animales recibieron 10 min antes de los tratamientos, la ministración i.v. de 1 mg/Kg de atropina. Resto de la descripción como en la Figura 6.

7.2.9. Efectos de la mezcla natural de metilprolina, prolina y GABA sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca

La fracción homogénea de alta polaridad que contiene como principal constituyente MP, ministrada en dosis única por vía i.v. a ratas anestesiadas, produce marcada hipotensión arterial

sostenida acompañada de taquicardia discreta (Fig 13). Los aminoácidos identificados en esta zona, cuando se ministran por separado o en una mezcla artificial de similares proporciones a las encontradas en la mezcla natural, no modifican los valores báseles de la PAM y de la FC de las ratas anestesiadas (no se muestran los datos).

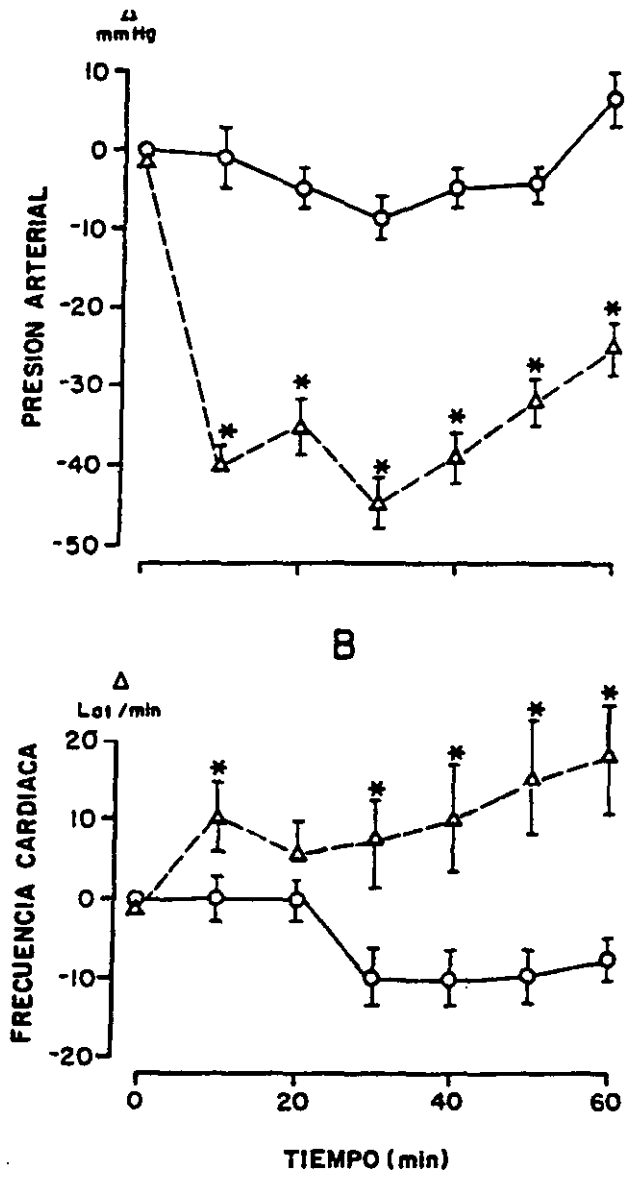


Fig 13. Cambios de la presión arterial media (panel A) y de la frecuencia cardíaca (panel B) producidos por la ministración i.v. de 1ml/Kg de solución salina, (o---o---o) y de 10 mg/Kg de la mezcla natural de metilprolina-prolina-GABA disuelta en solución salina (Δ---Δ---Δ). Los asteriscos denotan las diferencias significativas con respecto al grupo tratado con solución salina, $p < 0.05$. Las abscisas indican el tiempo transcurrido después de la ministración de las sustancias. Resto de la descripción como en la Fig 6.

7.2.10. Efectos de Casimiroedina sobre la presión arterial media y la frecuencia cardíaca de cobayos anestesiados

Bajo las mismas condiciones de anestesia, el glucoalcaloide identificado como CAS, carece de actividad hipotensora en las ratas, mientras que en los cobayos, produce disminución prolongada de la PAM, con apreciables cambios en la FC (Figura 14). A pesar de que las cifras iniciales promedio de la PAM del cobayo y de la rata, difieren ostensiblemente (67 y 110 mm Hg, respectivamente), el efecto producido por CAS es definitivo, puesto que provoca una baja de 30 % (20 mm Hg) en la PAM del cobayo. Similar porcentaje de hipotensión arterial, se obtiene en las ratas cuando se experimenta con la mezcla natural de aminoácidos.

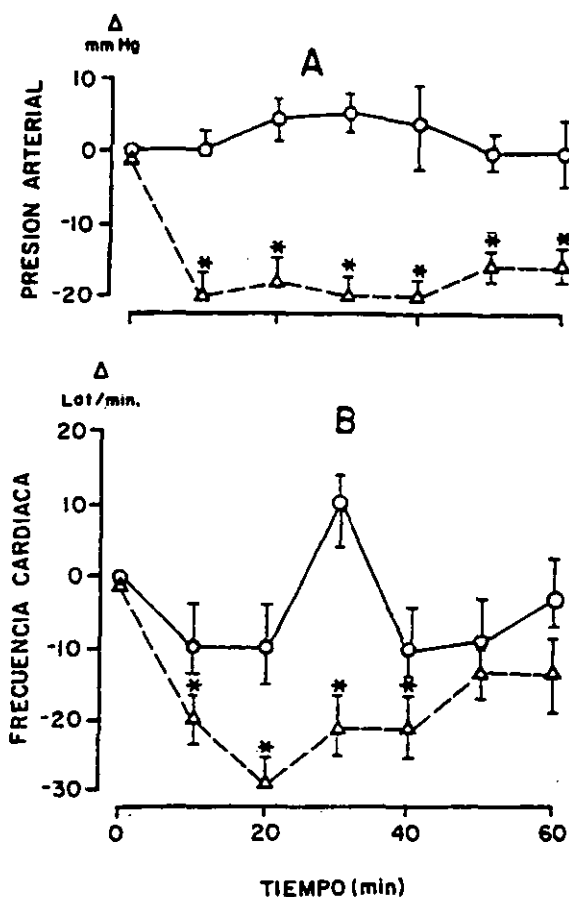


Fig 14. Cambios de presión arterial (panel A) y frecuencia cardíaca (panel B) producidos por solución salina, 1ml/Kg (o---o---o) y casimiroedina, 31 mg/Kg disuelta en solución salina (Δ---Δ---Δ). Los asteriscos denotan las diferencias significativas con respecto al grupo tratado con solución salina, $p < 0.05$. Las abscisas indican el tiempo después de la ministración de las sustancias. Resto de la descripción como en la Fig 6.

8. DISCUSIÓN

El estudio farmacológico de la semilla de *C. edulis*, permitió guiar el aislamiento de las sustancias que muestran actividad cardiovascular en la rata íntegra anestesiada. Todas las sustancias identificadas en la presente investigación, se agrupan dentro de los alcaloides, los cuales de acuerdo a Mann (1992), son todas aquellas sustancias caracterizadas por la presencia de uno o más átomos de nitrógeno de naturaleza básica. Hasta finales del siglo XIX, este grupo químico representaba en la Medicina el recurso farmacológico primario para padecimientos gastrointestinales, respiratorios, cardiovasculares y del sistema nervioso central, pero debido a la multiplicidad de efectos que producen, han sido reemplazados por fármacos semisintéticos y sintéticos con acciones más específicas. Por el momento, los alcaloides son los principios activos de origen natural, que más han cautivado la atención del ser humano, por su amplia variedad de acciones tóxicas y terapéuticas (Molyneux, 1993).

Numerosos estudios fitoquímicos tradicionales aprovechan la naturaleza alcalina de los alcaloides para aislarlos con soluciones ácidas diluidas en agua y posteriormente bajo un esquema químico determinado, separar sólo los grupos funcionales que al investigador interesan (Molyneux, 1993). La metodología de aislamiento del presente estudio, contrasta con lo anterior, porque no buscamos grupos funcionales definidos, sino sustancias activas de naturaleza química aún desconocida, lo cual implica que todos los componentes separados del extracto crudo original, deben ser biovalorados en un modelo experimental previamente seleccionado. En la literatura se señala que los estudios fitoquímicos biodirigidos, han demostrado ser eficientes para obtener

principios activos a partir de extractos naturales con propiedades biológicas conocidas (Hamburger y Hostettman 1991; Ghisalberti, 1993).

Para la extracción de sustancias de la semilla de *C. edulis* en la presente investigación, se utilizaron tres técnicas: maceración, reflujo y extracción rápida. En todas ellas se emplearon como disolventes hexano, metanol y diclorometano. En el proceso de maceración, los componentes del polvo de la semilla, estuvieron en contacto a temperatura ambiente con cada uno de los tres disolventes durante diez días. En el procedimiento por reflujo, los componentes de la semilla, se expusieron durante 3 días a temperaturas que oscilaron entre 30 y 60 °C, dependiendo del punto de ebullición del disolvente en turno. En cambio, la extracción rápida se realizó a temperatura ambiente y el tiempo de contacto del polvo de la semilla con cada uno de los tres disolventes empleados solamente fue de 6 horas. En la Tabla II se indica que la extracción de las sustancias de la semilla de *C. edulis*, parece estar facilitada por el mayor tiempo de exposición y de temperatura que se emplea en la maceración y el reflujo. Estos procesos facilitan la penetración de los disolventes entre los solutos, así como la disolución, la suspensión y la transferencia al diclorometano de una mayor cantidad de sustancias tanto polares como no polares, de acuerdo a la ley de distribución o de equilibrio heterogéneo (Dick, 1979; Douglas y col., 1993). La capacidad para separar los constituyentes de la semilla, se ve reflejada en el rendimiento de los residuos para cada uno de los tres métodos de extracción empleados. En los métodos de maceración o reflujo, el rendimiento es alto, sin embargo la separación y la resolución cromatográfica de los componentes no es satisfactoria; en cambio en el método de extracción rápida, el rendimiento es bajo pero permite mejor resolución. La posibilidad de concentrar las sustancias activas polares en el residuo metanólico, señala al procedimiento de extracción rápida, como el más eficiente de los tres para

iniciar la separación y purificación de los componentes en base a la polaridad de los disolventes orgánicos utilizados.

Nuestros resultados indican que el EMeOH obtenido de la semilla de *C. edulis* por el proceso de extracción rápida, produce los mayores efectos sobre la PAM y la FC, con respecto a los producidos por los extractos preparados con disolventes de menor polaridad como el diclorometano y el hexano (Tabla VII). Esto concuerda con la literatura que señala al metanol y al etanol, como los dos disolventes más utilizados para extraer alcaloides de productos naturales (Molyneux, 1993). La importante actividad cardiovascular producida por el EMeOH, puede explicarse porque las sustancias activas de la *Casimiroa* son muy polares y por lo tanto son fácilmente extraídas con el disolvente más polar (MeOH). Sin embargo, también nuestros resultados sugieren, que los componentes polares activos pueden extraerse aunque en concentraciones menores, con un disolvente de polaridad intermedia, como diclorometano. Esto se demostró por la moderada actividad cardiovascular que produce el extracto obtenido con dicho disolvente (Tabla VII).

La separación cromatográfica del EMeOH obtenido por extracción rápida de la semilla de *C. edulis*, se realizó utilizando como fase estacionaria sílica gel; el inconveniente de dicho soporte es que sustancias altamente polares, podrían formar enlaces covalentes o adsorberse irreversiblemente a la sílice, dificultando su remoción con los eluyentes convencionales y por lo tanto su valoración farmacológica. No obstante, de acuerdo al análisis cromatográfico por CCF (Figura 3), el empleo de la mezcla propanol y agua con hidróxido de amonio como eluyentes, permitió remover de la sílice, la mayoría de las sustancias presentes en el EMeOH completo. Una evidencia de ello es el aislamiento de la MP, sustancia altamente polar que se encuentra en el

extracto crudo en forma de zwitterion (Toscano y col., 1997). En apoyo a esta hipótesis, nuestros resultados farmacológicos indican que el patrón de respuestas cardiovasculares al EMeOH completo, puede explicarse considerando todos los efectos cardiovasculares observados al evaluar las acciones de cada una de las sustancias aisladas de la sílice, lo cual parece indicar, que todos los componentes activos extraídos de la semilla por el metanol, fueron estudiados.

Las sustancias señaladas en la Figura 3, fueron obtenidas de cuatro agrupamientos realizados con las fracciones separadas por recromatografía en columna y por CCF que resultaron activas. Los agrupamientos enumerados con números romanos del I al IV se presentan en la siguiente Tabla XV según el orden de elución y el tipo de actividad farmacológica encontrada con su ministración. Obsérvese que los agrupamientos I y III se fraccionaron hasta la identificación de una sustancia por grupo. En cambio, en los agrupamientos II y IV se aislaron e identificaron tres y dos sustancias respectivamente. Como se mencionó anteriormente la MP, la P y el GABA representan alrededor del 99 % de una zona cromatográfica bien delimitada. El 1 % restante, no pudo ser identificado por la pequeña cantidad que representa para realizar estudios de RMN. La DMH y la MMH inicialmente se identificaron por RMN bidimensional en una mezcla impura. Sin embargo, posteriormente las sustancias imidazólicas fueron separadas para su estudio farmacológico y químico. Es recomendable ver también la Figura 3 para correlacionar las sustancias aisladas e identificadas de los residuos, con la imagen obtenida del estudio analítico realizado con el EMeOH en CCF.

Tabla XV. Efectos sobre la PAM de la rata y del cobayo, producidos por cada uno de los agrupamientos de las fracciones separadas del EMeOH de la semilla de *C. edulis*. Las sustancias anotadas, se aislaron al recromatografiar cada agrupamiento en columna y en capa fina preparativa.

AGRUPAMIENTOS ACTIVOS	SUSTANCIAS	TIPO DE EFECTO
I	CASIMIROEDINA	HIPOTENSOR SOSTENIDO EN COBAYO
II	MEZCLA DE: METILPROLINA PROLINA GABA SUSTANCIAS NO IDENTIFICADAS	HIPOTENSOR SOSTENIDO EN RATA
III	ACETÓNIDO DE SINEFRINA	HIPERTENSOR TRANSITORIO
IV	MONOMETILHISTAMINA	HIPOTENSOR TRANSITORIO
	DIMETILHISTAMINA	HIPOTENSOR TRANSITORIO

La CAS, la DMHy la MMH, ya habían sido obtenidas previamente de la semilla de *C. edulis* (Power y Callan, 1911; Major y Dürsch, 1958; Romero y col., 1983), mientras que la MP, la P, el GABA y el AS, son obtenidas por primera vez de esta planta. La CAS es una sustancia que sólo se ha identificado en la semilla de la *Casimiroa*, mientras que las sustancias DMH, MMH, MP, P, y GABA ya habían sido aisladas de otras especies de plantas. Es importante resaltar que el AS es una sustancia nueva, reconocida en el EMeOH durante el curso de la presente investigación.

Los datos espectroscópicos de los compuestos aislados P, MP, GABA y MMH, se compararon con los espectros obtenidos de muestras comerciales (Sigma Chemical Co). La

identidad química de CAS y DMH se estableció por comparación con los datos publicados en la literatura especializada (Panzica y Townsend, 1973; Lozoya y col., 1978). Cabe señalar que no fue posible obtener muestras de estas sustancias, por donación o de fuentes comerciales. Por otra parte, la estructura molecular del AS, se elucidó a partir de sus datos de IR, RMN de protón y EM. Dicha sustancia no ha sido previamente descrita en la literatura química y será objeto de publicación en revista especializada. (Enríquez, comunicación personal inédita, 1999). Sin embargo, su actividad cardiovascular señalada en la presente investigación ha sido recientemente publicada (Magos y col., 1999).

No obstante que las siete sustancias anteriormente mencionadas tienen diferentes estructuras químicas, es probable que todas ellas sean biosintetizadas en las plantas superiores a partir de aminoácidos comunes. De hecho, todos los alcaloides se sintetizan a partir del metabolismo de los aminoácidos, y debido a este origen, se sugiere que funcionan como medios de defensa y/o reservorio de aminoácidos cuando las plantas están sujetas a condiciones ambientales desfavorables para su crecimiento y desarrollo (Mann, 1992). Se ha señalado que la MMH y la DMH, se biosintetizan del aminoácido aromático histidina, mientras que la CAS, probablemente proviene de dos precursores que son el aminoácido histidina y el ácido cinámico (Mann, 1992). Ambas sustancias poseen un origen biogénico común cuyo precursor inmediato es el ácido sikímico. Las sustancias como el AS y la MP parecen provenir respectivamente, del metabolismo de los aminoácidos aromáticos fenilalanina-tirosina y prolina, mientras que la P y el GABA, son aminoácidos propiamente dichos que se originan en plantas superiores a partir de vías metabólicas primarias (Mann, 1992).

La MMH, la DMH y la CAS, son alcaloides imidazólicos de origen biogénico relacionados con el aminoácido aromático histidina (Maat y Beyerman, 1983). Los dos primeros compuestos han sido identificados en la semilla de *C. edulis* mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (Romero y col, 1983). La DMH también ha sido aislada de diferentes especies por ejemplo: de la esponja *Lanthella* (German, 1971), de *Nictimystis disrupta* (Ferrigni y col., 1984), y de plantas como *Echinocereus blanckii*, en donde se le responsabiliza de la cardioactividad observada con extractos de esta planta (Wagner y Grevel, 1982). En cambio la CAS, es una sustancia exclusiva *C. edulis* en donde hasta el día de hoy solo se ha identificado en la semilla como el metabolito secundario más abundante (Kincl y col., 1956). Es interesante señalar que la única actividad biológica conocida para la CAS, es su efecto citostático sobre una línea de células leucémicas (Panzica y Townsend, 1973), por otra parte, la MMH y la DMH, poseen acciones semejantes a las producidas por H en el animal íntegro y en tejidos aislados de útero, estómago y tráquea. En el sistema cardiovascular del gato anestesiado, ambos imidazoles, producen hipotensión arterial inmediata, intensa y fugaz (Vartiainen, 1935; Bertaccini y Vitali, 1964).

Los informes publicados sobre los aminoácidos P y su derivado MP, presentes en otras especies de plantas (Jones y col., 1987; Solomon y col., 1994; Jones y col., 1995), no refieren actividad sobre el sistema cardiovascular de la rata anestesiada; mientras que el GABA parece producir efecto hipotensor de origen central (Takenaka y col., 1996). En el caso del AS, antes de nuestra reciente publicación (Magos y col., 1999), se carece de antecedentes químico-farmacológicos. En Tabla XVI se resumen las referencias y los efectos cardiovasculares producidos en el animal íntegro, para cada una de las siete sustancias que se aislaron e identificaron en la presente investigación.

Tabla XVI. Actividad cardiovascular referida para cada una de las siete sustancias aisladas de la semilla de *C. edulis*.

SUSTANCIAS	EFFECTOS	REFERENCIAS
CASIMIROEDINA	HIPOTENSOR EN COBAYOS	(Magos y col. 1999)
METILPROLINA	?	?
PROLINA	?	?
GABA	HIPOTENSOR DE ACCION CENTRAL EN LA RATA	(Takenaka y col. 1996)
ACETÓNIDO DE SINEFRINA	HIPERTENSOR Y TAQUICARDIZANTE EN LA RATA	(Magos y col., 1999)
MONOMETILHISTAMINA	HIPOTENSOR EN EL GATO Y RATA TAQUICARDIZANTE EN RATA	(Vartiainen, 1935; Vitali, 1964; Magos y col., 1999)
DIMETILHISTAMINA	HIPOTENSOR EN EL GATO Y RATA TAQUICARDIZANTE EN RATA	(Vartiainen, 1935; Vitali, 1964; Magos y col., 1999)

De acuerdo a los antecedentes farmacológicos de la *C. edulis* revisados en la sección correspondiente, se ha planteado la hipótesis de que el efecto hipotensor sostenido probablemente sea de naturaleza histaminérgica. Empero, a partir de la información existente en la literatura relacionada con los aspectos farmacológico y químico de las sustancias identificadas en el presente trabajo, no es posible apoyar o descartar dicha hipótesis. Sin embargo, la evaluación farmacológica de cada una de las sustancias estudiadas en la presente investigación, permiten

explicar parte de las acciones cardiovasculares producidas por el EMeOH obtenido de la semilla de *C. edulis* y aclara parcialmente, cual es la participación del mecanismo histaminérgico en el efecto hipotensor de esta planta. A continuación se analizan las evidencias experimentales farmacológicas obtenidas con las sustancias aisladas e identificadas en este estudio y su participación en los efectos cardiovasculares observados con el EMeOH completo.

8.1 Influencia de la DMH y la MMH en la hipotensión arterial producida por el EMeOH.

Debido a que los efectos cardiovasculares de la H (Figura 5), no son estrictamente comparables a los de su análogo DMH, la diferencia encontrada en la duración del efecto hipotensor producido en la rata anestesiada por el EMeOH (12 min), con respecto a la H (3 min), no es argumento suficiente para descartar la posibilidad de que la DMH del EMeOH, a través de la estimulación de receptores histaminérgicos, sea efectivamente la sustancia responsable de la hipotensión sostenida informada por otros autores para *C. edulis* (Major y Dürsch, 1958; Ling y col., 1958; Lozoya y Enríquez, 1981). Sin embargo, en la presente investigación la DMH y la MMH provenientes de la semilla, producen en ratas con valores basales de PAM y FC parecidos (Tabla VIII), hipotensión arterial de similar duración e intensidad a la hipotensión producida en la misma especie con la ministración de H (Figura 7). Estos resultados, confirman los estudios previamente realizados en el gato anestesiado con cloralosa, en donde se observó que la ministración i.v. de la H o de sus análogos N-metilados, incluyendo DMH, originan hipotensión arterial inmediata y fugaz (Vartiainen, 1935; Bertaccini y Vitali, 1964). Por consiguiente, la DMH y la MMH parece que participan en la primera fase de la

hipotensión intensa e inmediata producida por el EMeOH completo, pero aparentemente no son las sustancias responsables de la hipotensión arterial que se mantiene en la rata durante 12 min, lo que permite considerar que otros componentes del extracto sean los desencadenantes de dicho efecto, posibilidad que habíamos sugerido en estudios previos (Magos y Vidrio, 1994).

En los primeros experimentos que realizamos en ratas anestesiadas, se encontró que el efecto hipotensor de la H, se bloquea parcialmente con difenhidramina y cimetidina, antagonistas relativamente selectivos de los receptores H_1 y H_2 respectivamente (Figura 6). La participación de ambos receptores en la hipotensión de origen histaminérgico, coinciden con los estudios realizados en el modelo de registro directo de la presión arterial de la rata íntegra (Levin y col., 1991), del gato y del perro (Black y col., 1975). Sin embargo en estudios recientes realizados en ratas con valores iniciales de PAM y de FC homogéneos (Tabla IX), encontramos que sólo la loratadina, antagonista histaminérgico selectivo del receptor H_1 , bloquea parcialmente la acción hipotensora de la H. Semejante bloqueo, también lo observamos en la hipotensión producida por MMH o DMH, lo cual indica que en la rata anestesiada, la estimulación del receptor H_1 origina la hipotensión arterial transitoria producida por estas sustancias imidazólicas (Figura 8). En vista de que la loratadina no penetra en el Sistema Nervioso Central (Simons y Simons, 1994), se excluye la participación de los receptores H_1 centrales en el efecto hipotensor y se deduce que la estimulación de estos receptores localizados probablemente en los vasos sanguíneos de resistencia periféricos, ocasionen dicho efecto.

En el efecto vasodepresor de la MMH y de la DMH se observó que la participación del receptor histaminérgico H_2 fue nula, e incluso al bloquearlo con cimetidina, la PAM disminuyó discretamente. Este resultado, es contrario a lo esperado, ya que la estimulación del receptor H_2

localizado en la membrana celular del músculo liso vascular, teóricamente produciría un efecto vasodilatador que al bloquearse con cimetidina probablemente incrementaría el tono vascular.

Por otra parte el efecto taquicardizante producido por MMH y DMH, por el momento no puede explicarse ya que carecemos de datos experimentales pertinentes. Sin embargo, esta respuesta aparentemente no es mediada por los receptores H_1 ya que no se bloquea con el correspondiente antagonista, como tampoco se tiene la evidencia concluyente de que participe el receptor H_2 . No obstante que en el cobayo, mono, perro y humano existen evidencias de que la H produce cronotropismo positivo a través de la estimulación del receptor H_2 localizado en la membrana celular de las células del nódulo sinusal (Hill y col., 1997), en la rata, la participación real de esta amina sobre la FC, aún no se ha establecido. Los estudios consultados al respecto, muestran resultados contradictorios, que van desde la carencia de efectos cronotrópicos en la rata íntegra (Levi y col., 1982), hasta efectos bifásicos de cronotropismo negativo y positivo en aurículas aisladas latiendo espontáneamente (Cakici y col., 1992).

Entre las explicaciones posibles sobre el mecanismo taquicardizante de la MMH y DMH se encuentran: a) estimulación de los receptores β adrenérgicos localizados en el corazón, mecanismo que ha sido descrito tanto para la acción de la H sobre el tejido auricular aislado de rata (Cakici y col., 1992), como para la acción del agonista sintético del receptor H_3 alfa-metil-histamina en la rata íntegra (Coruzzi y col., 1995). b) Liberación de catecolaminas debida a la estimulación del receptor H_1 localizado en la médula adrenal ó a la descarga de las neuronas adrenérgicas por un mecanismo semejante al de la tiramina. Estos mecanismos han sido descritos en la rata anestesiada tratada con H (Borges, 1994) o con amthamina, agonista selectivo de receptores H_2 , (Coruzzi, y col., 1996). c) Estimulación de receptores α_1 localizados en el nódulo

sinusal del corazón de rata. Existen evidencias que más de 10 micromoles de H, producen contracción de anillos aislados de aorta de rata, aparentemente por la activación de receptores α_1 (Schoeffter y Godfraind, 1991), mecanismo que podría extrapolarse al tejido cardíaco aunque en este sitio la densidad de dicho receptor es baja. Como se mencionó anteriormente no realizamos estudios experimentales con MMH y DMH orientados a sustentar alguna de estas hipótesis

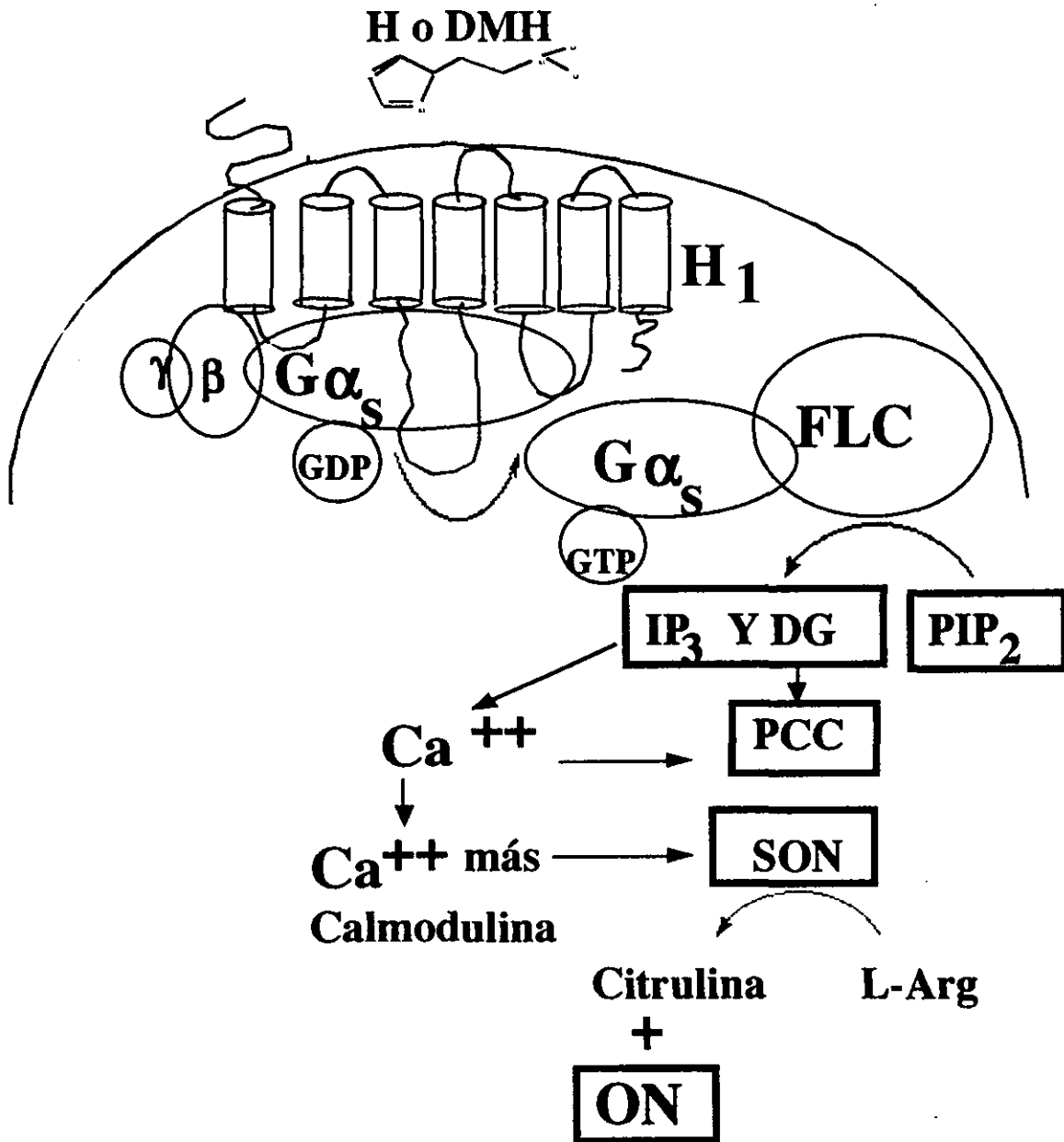
8.2 Hipotensión arterial transitoria producida por H, DMH y MMH.

Participación del ON.

Debido a que la H produce relajación de los anillos de la aorta de rata dependiente del endotelio vascular (Van de Voorde y Leusen, 1983), se exploró el papel del factor relajante endotelial (óxido nítrico) en la hipotensión arterial sistémica producida por H, MMH y DMH. Para tal propósito, las ratas se pretrataron con el inhibidor de la sintasa de óxido nítrico (SON), L-NAME. En los experimentos preliminares, la ministración de una dosis alta de este inhibidor enzimático (30 mg/Kg), contrario a lo que esperábamos, no modificó la respuesta hipotensora de la H (Figura 9), hallazgo que también ha sido señalado por otros investigadores (O'Shaughnessy y col., 1992; Conrad y Whittemore, 1992; Nakahara y col., 1995). Sin embargo, basados en los informes de que un incremento en el tono vascular podría aumentar la liberación de ON (Vargas y col., 1990) y en consecuencia magnificar los efectos de la inhibición de la síntesis de esta sustancia, se decidió realizar otra serie de experimentos en ratas íntegras tratadas con el vasoconstrictor α adrenérgico fenilefrina (Tabla XII). Los resultados son interesantes, pues por una parte el L-NAME en presencia de la sustancia vasoconstrictora, logra bloquear el efecto hipotensor de la H, pero por otra parte, es sorprendente que sólo la hipotensión inducida por

DMH y no por MMH, se antagoniza por el inhibidor enzimático (Figura 10 y Tabla XIII). En concordancia con estos hallazgos, los resultados preliminares obtenidos en anillos de aorta de rata, indican que al remover el endotelio se previene la relajación producida por H y DMH, pero no por MMH (Magos y col., 1997). Ambos estudios realizados en el animal íntegro y en el tejido vascular aislado de la rata, sugieren que la acción vasodilatadora de la H y la DMH, depende del ON que se libera al estimular los receptores H_1 del endotelio vascular (Van de Voorde y Leusen, 1983) y que la acción vasodilatadora de la MMH, no parece estar mediada por este agente químico.

La Figura 15 ilustra la relación entre el receptor histaminérgico H_1 y la producción de ON en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de resistencia. La estimulación de dicho receptor con H o DMH, desencadena la activación de la fosfolipasa C (FLC) por la subunidad α de la proteína G estimulante ($G\alpha_s$). La FLC en la membrana celular cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP_2) produciéndose los segundos mensajeros diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). El ON se sintetiza a partir de la L-arginina (L-Arg) y del oxígeno molecular por acción de la SON la cual se activa por incrementos del calcio celular mediados por el segundo mensajero IP_3 (Hill y col., 1997).



Endotelio de vasos sanguíneos

Fig 15. Mecanismo de acción desencadenado al estimular el receptor H₁ localizado en las células endoteliales de los vasos de resistencia.

El ON se difunde con facilidad hacia el músculo liso subyacente e induce relajación del músculo liso vascular al activar a la guanilato ciclasa (GC), que incrementa las concentraciones de guanosin monofosfato cíclico (3',5'-GMPc) a partir de guanosin trifosfato (GTP). El 3',5'-GMPc activa la proteincinasa C (PCC) dependiente de dicho mensajero, la cual inhibe la cinasa de cadenas de ligeras de miosina (CCLM) por lo que al no fosforilarse la miosina, la contracción del músculo liso vascular no se lleva a cabo (Leurs y col., 1995) (Figura 16).

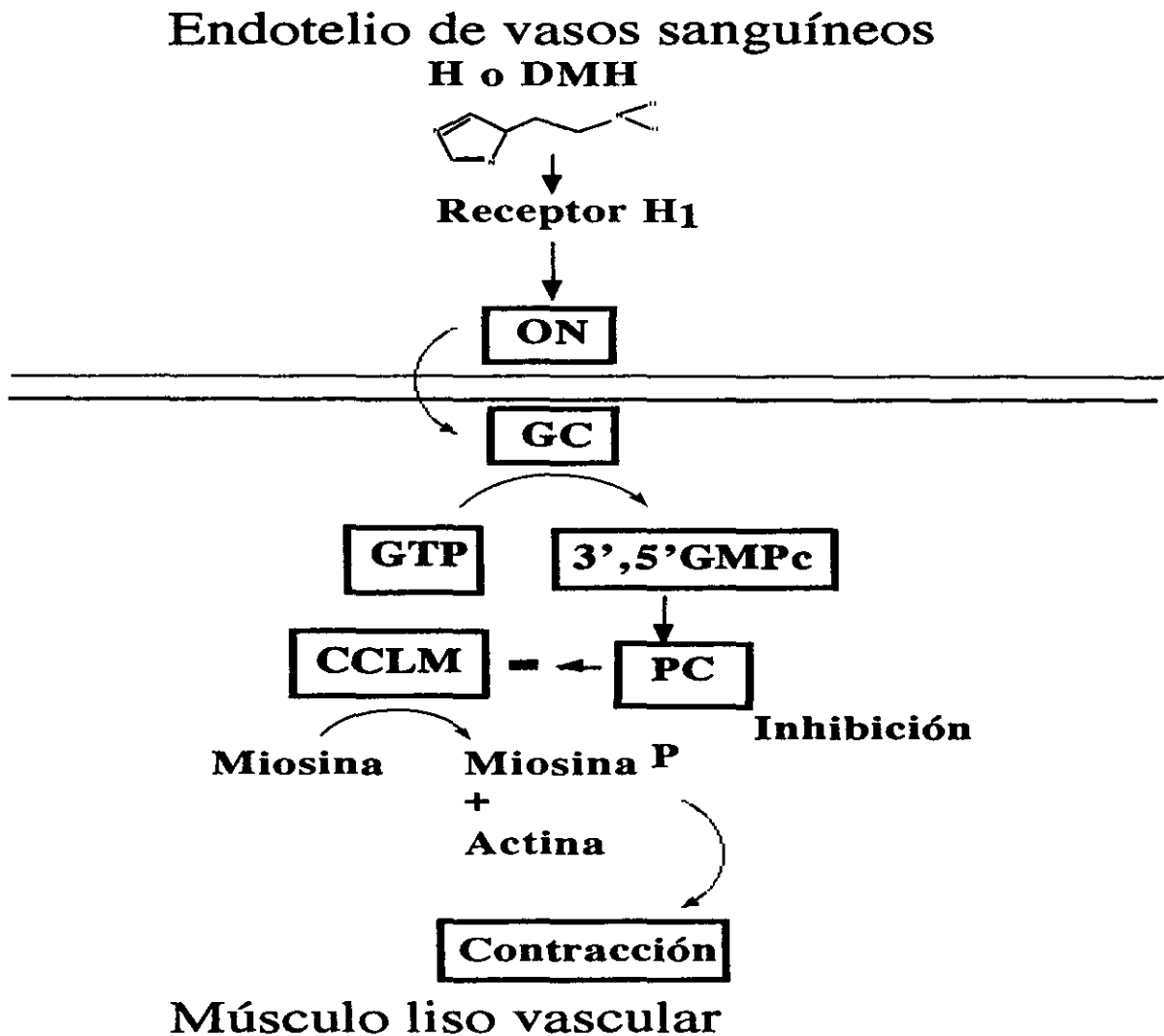


Fig. 16. Mecanismo de acción desencadenado al activar la guanilato ciclasa con el óxido nítrico (ON) liberado de las células endoteliales que revisten los vasos de resistencia.

Debido a que el efecto hipotensor de la MMH es bloqueado por la loratadina antagonista selectivo del receptor H_1 , cualquier explicación tentativa sobre su mecanismo de acción hipotensor, tendrá que considerar la participación de este receptor, así como también el tejido vascular, como su probable sitio de acción. Existen informes que la estimulación del receptor H_1 de las arterias mesentérica y gastroepiploica del perro, produce relajación debida a la liberación de prostaglandina I_2 y no a la liberación de ON (Toda y col., 1982). También se ha señalado, que la H produce vasodilatación de la arteria femoral de la rata, cuando se estimulan los receptores H_2 localizados en el músculo liso vascular (Krstic y col., 1991). Estas evidencias, concuerdan con las bases moleculares descritas para explicar la internalización de las señales histaminérgicas causantes de la relajación vascular que no dependen del endotelio (Oliva y Nicosia, 1987; Coleman y col., 1994; Göthert y col., 1995; Hill y col., 1997), pero desafortunadamente no fueron confirmadas en la presente investigación. Nuestros resultados indican que la remoción del endotelio vascular productor de prostaglandinas, no modifica la relajación de la aorta aislada de la rata producida por MMH. Además, la hipotensión de la MMH, se encuentra parcialmente modificada al pretratar los animales con cimetidina, antagonista selectivo de los receptores H_2 . Con nuestros resultados experimentales, actualmente no es posible establecer el mecanismo de acción del efecto hipotensor de la MMH, sin embargo, las diferencias encontradas entre las D_{30} 's hipotensoras (Tabla X) de la H (2.78 mcg/kg), MMH (21.3 mcg/kg) y DMH (50.7 mcg/kg) indican que el incremento en el número de metilos disminuye la potencia del fármaco y aparentemente establece las diferencias en el mecanismo de acción del efecto hipotensor producido por los derivados imidazólicos. Mientras que la DMH con dos grupos metilos involucra un mecanismo dependiente de ON, la MMH que sólo posee un grupo metilo no

depende de este mecanismo. Sin embargo, la ausencia del grupo metilo no impide que la H produzca hipotensión arterial por el mismo mecanismo de acción desencadenado por la DMH. En el mismo sentido, la presencia del grupo metilo en la MMH y en la DMH parece conferirles actividad taquicardizante (Tabla X). La siguiente Figura 17 resume las estructuras y las D₃₀'s de cada una de las sustancias imidazólicas aquí estudiadas.

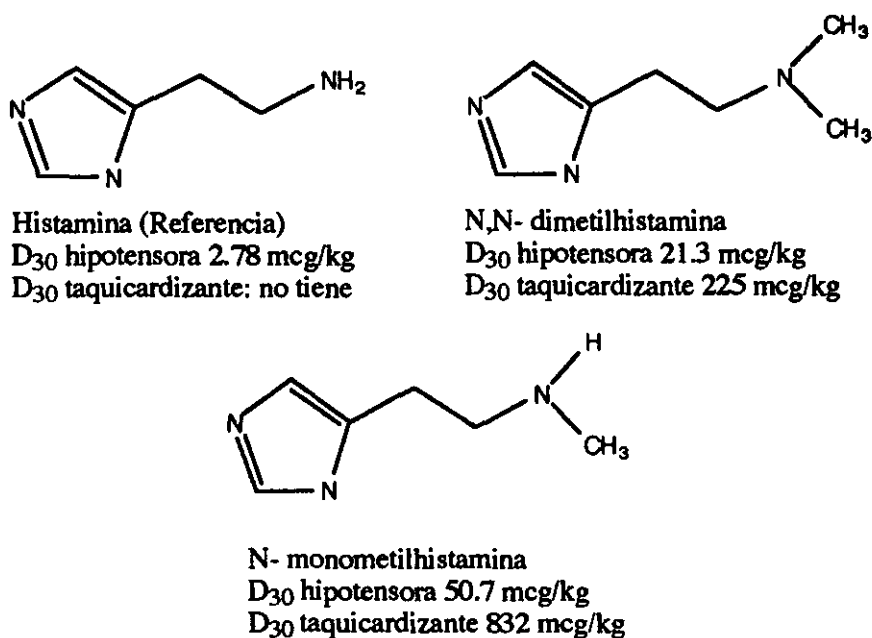


Fig. 17. Estructuras moleculares y D₃₀'s hipotensoras y taquicardizantes de la histamina y de sus análogos aislados de la semilla de *C. edulis*.

8.3 Taquicardia producida por DMH y MMH. Participación del ON

Como puede verse en la figura 10 solo el efecto taquicardizante producido por la DMH es bloqueado significativamente con el inhibidor de la sintasa de ON, L-NAME, lo cual parece indicar que el ON participa en dicho efecto. Este hallazgo podría explicarse, si se considera la

posibilidad de que la DMH tenga acciones β adrenérgicas. Hay evidencias que el L-NAME, bloquea la respuesta cronotrópica positiva debida a la estimulación de los receptores β -adrenérgicos (Reid y col., 1994) y antagoniza la liberación de norepinefrina de las terminaciones nerviosas simpáticas, cuando la liberación es facilitada por angiotensina (Gironacci y col., 1997). A pesar de estos mecanismos, con nuestros resultados no es posible establecer una explicación comprensible sobre la participación del ON en la taquicardia producida por DMH. Si bien es cierto que este efecto podría deberse a una estimulación β -adrenérgica, resulta difícil entender el porqué la taquicardia producida por MMH, no es también antagonizada por el mismo inhibidor enzimático.

8.4 Influencia del AS, en los efectos de hipertensión y taquicardia producidos por el EMeOH.

En estudios previos realizados en ratas íntegras anestesiadas con pentobarbital (Magos y Vidrio, 1991) y en preparaciones de anillos aislados de la aorta de rata (Magos y col., 1995), se observó que la ministración del EMeOH total obtenido por maceración del polvo de la semilla de *C. edulis*, produjo acciones adrenérgicas relacionadas con la estimulación de los receptores alfa y beta. Los recientes resultados farmacológicos obtenidos con el AS (Figura 11), permiten confirmar y explicar la participación del sistema adrenérgico en la hipertensión y taquicardia producidos por el EMeOH. Es importante mencionar que el AS utilizado para la presente investigación, se aisló del EMeOH obtenido por extracción rápida.

Nuestros resultados demuestran que el AS produce en la rata íntegra, incremento transitorio de la PAM y de la FC. Estos efectos, son idénticos a los producidos por el compuesto de

referencia llamado S, el cual ha sido descrito en la literatura como un agonista adrenérgico, con mayor afinidad por los receptores α_1 que por los receptores β_1 (Jordan y col., 1987; Brown y col., 1988). En este sentido, el AS parece compartir con la S acciones estimulantes sobre los receptores α_1 y β , como quedó claramente demostrado al bloquear el efecto hipertensor de ambas aminas, con la ministración de prazosina, antagonista selectivo del receptor α_1 y también al bloquear el efecto taquicardizante con la prazosina y el propranolol, antagonistas selectivos de los receptores α_1 y β respectivamente (Figura 12). La participación de la estimulación de los receptores alfa₁ en el efecto cronotrópico positivo del AS y de la S, concuerda con lo informado para el isómero de S la m-OH fenilefrina (Tung y col., 1985; Gong y col., 1993) y para otros agonistas adrenérgicos como la adrenalina y noradrenalina (Tung y col., 1985). El receptor alfa involucrado en los efectos taquicardizantes de estas sustancias, aparentemente es del subtipo α_{1a} (Williamson y col., 1994). Cabe mencionar que el AS podría sintetizarse en la *C. edulis* a partir de una sustancia metilada proveniente de la S. Aunque esta sustancia intermediaria y la misma S, no se identificaron en los residuos activos, existe la posibilidad que dicha síntesis se realice en alguna parte de la planta diferente a la semilla. Por otra parte, llama la atención que la metilación y la ciclización de la cadena etanol metilamina para formar el AS, aparentemente no modificó la actividad adrenérgica de la S. Esta similitud de efectos cardiovasculares adrenérgicos entre dos compuestos con notorias diferencias estructurales como se muestran en la siguiente Figura 18, contrasta con lo informado para otras aminas simpaticomiméticas que al experimentar pequeños cambios estructurales, modifican su potencia y/o eficacia (Hoffman, y Lefkowitz, 1995).

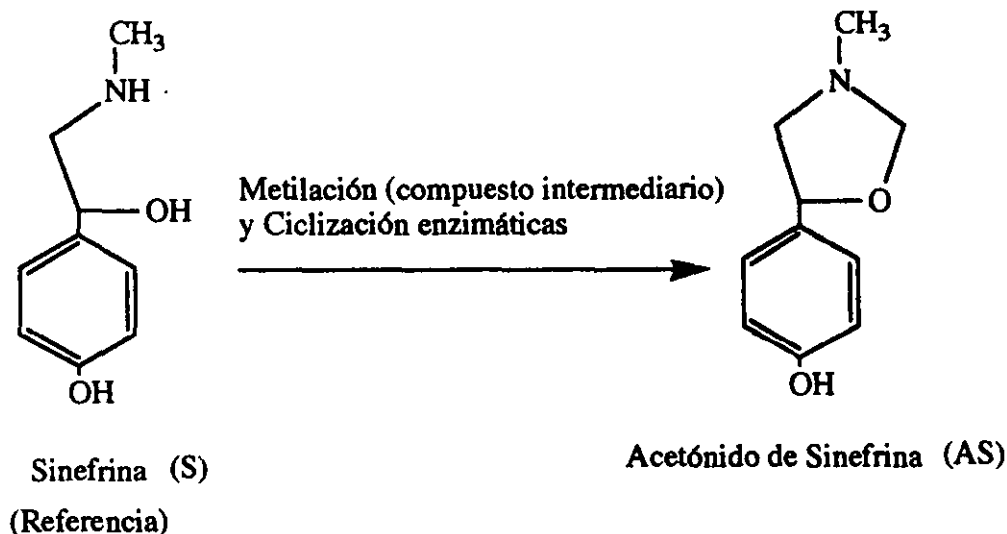


Fig. 18. Síntesis del acetónido de sinefrina a partir de sinefrina en la *C. edulis*. Reacción hipotética.

Puesto que las acciones adrenérgicas precitadas son producidas por uno de los residuos estudiados y en él se pudo identificar únicamente el AS, parece lógico inferir que esta sustancia sea per se, la responsable de los incrementos de la PAM y de la FC cuando se ha utilizado el EMeOH en ratas pretratadas con el antihistamínico H₁ difenhidramina. Sin embargo, estudios químicos realizados con antelación al desarrollo de la presente tesis, nos indican que dichos efectos pueden originarse por la presencia de benzoiltiramina, sustancia también identificada en la semilla de la *Casimiroa* (Kincl y col., 1961), a pesar de que no fue detectada en ninguno de los residuos que mostraron actividad en el aparato cardiovascular. La ausencia de benzoiltiramina en nuestras fracciones activas, tal vez pueda explicarse por el hecho de que no se emplearon para la extracción de los residuos, soluciones ácidas de benceno tal como lo hicieron Kline y col., o quizás no se observó actividad porque su concentración en la semilla es muy pequeña (0.0015 %) o bien

porque utilizamos diferentes árboles. Por otra parte, no sólo el AS tiene efecto taquicardizante, pues la MMH, la DMH y la CAS están también presentes en el extracto, produciendo cronotropismo positivo por un mecanismo aún no conocido.

8.5 Influencia del AS en la hipotensión producida por el EMeOH

El efecto hipotensor producido en la rata anestesiada por la ministración i.v. del EMeOH, es de menor duración que el efecto hipotensor observado por la ministración de un extracto similar en el perro (De Lille, 1934; Ramírez y Rivero, 1935) o en el gato (Lozoya y col., 1977). Esta diferencia, podría explicarse por las acciones adrenérgicas ocasionadas por el AS, las cuales varían de intensidad según la especie. En la rata, los efectos adrenérgicos del AS son de tal magnitud que permiten recuperar los valores basales de la PAM y de la FC 12 min después de haber ministrado el EMeOH completo. En cambio, en el perro y en el gato, los efectos producidos por el AS, no son de suficiente intensidad para antagonizar los mecanismos que mantienen durante horas la hipotensión arterial producida por éste extracto. En apoyo a esta explicación, se encuentran la hipotensión sostenida que observamos en la rata adulta con la ministración de fracciones provenientes del EMeOH que carecen del AS, y la hipertensión producida por el mismo extracto en ratas previamente tratadas con difenhidramina. Este último argumento es menos sólido, ya que el efecto hipertensivo también se observa con la misma intensidad en el perro anestesiado pretratado con dicho antihistamínico (Vidrio y Magos, 1991).

Es interesante haber encontrado en el EMeOH compuestos que producen efectos opuestos sobre la PAM. Por tal hallazgo, es necesario considerar en la intensidad del efecto hipotensor, la participación antagónica del AS, la cual al menos podría prevenir una respuesta hipotensora

excesiva producida por el extracto completo. Nuestros resultados constituyen otro ejemplo de acciones opuestas desencadenadas por componentes de la misma planta (Izaddosst y Robinson, 1991). Siguiendo la misma línea de pensamiento, también es posible sugerir que el consumo de la semilla probablemente ocasione el efecto contrario al esperado y exacerbe el problema hipertensivo en humanos que están bajo tratamiento con antihistamínicos H_1 . Efecto no deseado cuya presentación e intensidad podría estar determinada por las posibles fluctuaciones en las concentraciones naturales de los diferentes compuestos activos.

8.6 Influencia de MP, P y GABA en la hipotensión sostenida producida por el EMeOH

En los presentes experimentos, es interesante que la zona cromatográfica que contiene la mezcla de MP, P y GABA, produce en la rata anestesiada, disminución intensa y sostenida de la PAM (Figura 13). Este efecto, contrasta con la hipotensión arterial transitoria producida por los análogos de la H y es semejante a la hipotensión persistente observada en el perro al ministrar extractos crudos totales obtenidos de la semilla de *Casimiroa* (Vidrio y Magos, 1991). Todo parece indicar que la fracción que contiene las sustancias antes mencionadas, es probablemente la responsable del efecto hipotensor sostenido. Sin embargo, en los experimentos farmacológicos preliminares realizados con cada una de las sustancias mencionadas, no fue posible obtener algún efecto hipotensor como el producido por dicha fracción. Los componentes más abundantes MP (70%), P (18%) y GABA (11 %), como productos purificados grado reactivo, cuando se ministran solos o combinados en una mezcla artificial, carecen de acciones sobre el sistema cardiovascular de la rata. Asimismo se ha referido que la ministración i.v. de GABA en la rata,

produce hipotensión arterial transitoria (Billingsley y Suria, 1982), la que no explica el efecto prolongado que produce la fracción natural sobre la PAM. Debe mencionarse que el descubrimiento de GABA en la planta reviste gran interés, puesto que se sabe que este aminoácido es un neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central, capaz de producir hipotensión arterial sistémica cuando se ministra directamente en este sistema (Takenaka y col., 1996). Por otra parte, cabe la posibilidad de que en el 1% del total de la fracción cromatográfica cuyos componentes no fueron identificados, se encuentre alguna sustancia activa con gran potencia y eficacia. Aunque esta posibilidad no se puede descartar, aparentemente se requiere la mezcla natural con todos los aminoácidos antes mencionados para producir el efecto hipotensor duradero, por lo tanto es posible que los aminoácidos identificados, son residuos de un péptido responsable de la hipotensión sostenida. En relación a esta idea, debe mencionarse que la molécula de P forma parte de los potentes vasodilatadores kalidina y bradicinina (Trifilieff y col., 1993). Además, este aminoácido también forma parte de la estructura molecular del captropil y de otros inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (Giugliano y col., 1996), sustancias que son utilizadas en el tratamiento de la hipertensión arterial.

8.7 Hipotensión sostenida producida en el cobayo por la CAS

Como se mencionó anteriormente, no hay antecedentes en la literatura sobre propiedades cardiovasculares de la CAS, solo existe un informe preliminar relacionado con el efecto citostático sobre células cancerosas (Panzica y Townsend, 1974). La falta de estudios farmacológicos, posiblemente se deba a la insolubilidad de esta sustancia en el agua, lo que dificulta su ministración en diferentes modelos y especies experimentales. Para superar dicho problema y

poder administrar la CAS por vía i.v., se realizaron resuspensiones de este imidazol en soluciones de agua y MeOH, el cual se eliminaba utilizando vacío a presión reducida y temperatura de 60 °C (Enríquez y col., 1996). En estas condiciones la CAS produce hipotensión arterial sostenida y duradera en el cobayo (Figura 14) y carece de acciones sobre el sistema cardiovascular de la rata. Tales hallazgos indican que la CAS no parece ser responsable de la hipotensión sostenida producida por el extracto metanólico completo. Debido a la naturaleza imidazólica de la CAS, la selectividad de especie, podría explicarse por una alta afinidad de la CAS sobre receptores histaminérgicos tipo H₃, aunque por el momento no disponemos de evidencias experimentales. Sin embargo, se sabe que agonistas selectivos a estos receptores, como la R-alfa-metilhistamina, disminuyen significativamente la presión arterial del cobayo y del conejo y no modifican los valores basales de PAM y de FC en ratas (McLeod y col., 1993, 1994). También desconocemos si al agregar el grupo cinamato a la molécula MMH, como se ilustra en la Figura 19, se pierde la eficacia sobre los receptores H₁ y H₂ y se adquiere eficacia sobre los receptores H₃.

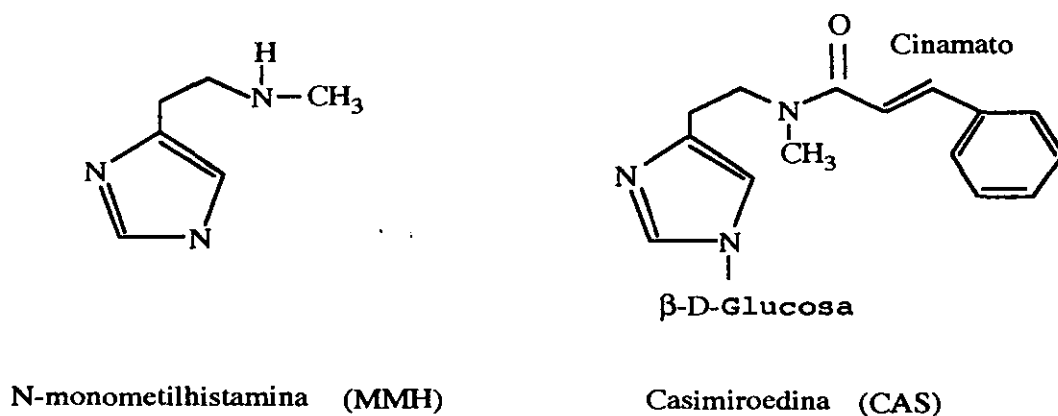


Fig. 19. Diferencias estructurales entre monometilhistamina y casimiroedina. Dos sustancias con núcleo imidazólico aisladas de la semilla de *C. edulis*.

8.8 Perspectivas en la investigación de la semilla de la *C. edulis*

Considerando el uso antihipertensivo etnomédico de la *C. edulis* y la aparente relación entre la zona cromatográfica que contiene la mezcla de MP, P y GABA con el efecto hipotensor sostenido del EMeOH, se sugiere que futuros estudios sobre este tema, deberán ser orientados para confirmar o descartar la posibilidad de que la sustancia activa responsable del efecto hipotensor sostenido, sea un péptido. Para tal propósito, se debe analizar dicha zona cromatográfica con la metodología adecuada para tales sustancias y probablemente sintetizar pequeños péptidos que contengan al menos diferentes secuencias de P, MP y GABA. Además, también deben de caracterizarse de dicha zona, los componentes que constituyen el 1 % no identificado. Es importante señalar que las sustancias aisladas o sintetizadas deberán evaluarse en los registros de PAM y de FC del animal íntegro. Ya que las hojas de la *C. edulis* se emplean con más frecuencia en la medicina popular con propósitos antihipertensivos, parecería conveniente haber realizado la presente tesis con dicho material. Sin embargo como se mencionó en los antecedentes farmacológicos, la semilla se eligió porque estudios previos señalan que esta parte de la planta posee mayor efecto hipotensor sostenido (Lozoya y Enríquez, 1981). A la luz de nuestros resultados, parece coherente sugerir que la experiencia obtenida en la presente tesis, se utilice para realizar estudios farmacológicos y químicos con las hojas de la *C. edulis*.

9. CONCLUSIONES

- a) La semilla de *Casimiroa edulis* contiene más de una sustancia con actividad cardiovascular.
- b) El análisis espectrométrico y espectroscópico de las sustancias activas, permitió identificarlas como: acetónido de sinefrina, prolina, metilprolina, ácido gama amino butírico, monometilhistamina, dimetilhistamina y casimiroedina.
- c) Las cinco primeras sustancias son aisladas por primera vez de la semilla de esta planta.
- d) Los resultados farmacológicos obtenidos con cada una de las sustancias activas, permiten explicar parte de los efectos cardiovasculares producidos en la rata anestesiada por el extracto metanólico completo.
- e) El efecto hipotensor transitorio producido por el extracto metanólico, puede ser atribuido a la dimetilhistamina y a la monometilhistamina.
- f) El mecanismo de acción de ambas sustancias imidazólicas, involucra la estimulación de los receptores H₁ localizados principalmente en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos de resistencia.
- g) En el caso de la dimetilhistamina, esta estimulación aparentemente incrementa la liberación de óxido nítrico, mientras que para el caso de la monometilhistamina dicho agente no parece incrementarse.
- h) La presencia del grupo metilo en DMH y MMH, además de establecer las diferencias en los mecanismos de acción de estas sustancias, parece conferirles actividad taquicardizante.

- i) Las evidencias disponibles sugieren que el efecto hipotensor sostenido producido en varias especies por el extracto metanólico completo, podría ser atribuido a la combinación de los aminoácidos P, MP y GABA a través de un mecanismo de acción aún desconocido. Sin embargo la mezcla artificial de estas sustancias no produce ningún efecto.
- j) La casimiroedina no modifica la presión arterial media de la rata, en cambio produce intensa hipotensión arterial sostenida en el cobayo.
- k) La ausencia de actividad de la casimiroedina en la rata, no descarta su participación en los efectos hipotensores del extracto completo, y es probable que en otras especies, incluyendo el ser humano, posea actividad cardiovascular.
- l) En la rata, el nuevo compuesto denominado acetónido de sinefrina, produce hipertensión y taquicardia originadas por la estimulación de receptores alfa y alfa-beta respectivamente.
- ll) Los efectos cardiovasculares producidos en la rata por la sinefrina y el acetónido de sinefrina, son semejantes. Por lo tanto, las diferencias estructurales que existen entre ambos compuestos, no parecen modificar su farmacodinamia.
- m) En la rata, la magnitud y la duración del efecto hipotensor producido por el extracto metanólico completo, parecen estar antagonizado por acciones adrenérgicas desencadenadas por el acetónido de sinefrina.

10. REFERENCIAS

- Anónimo (1897): El zapote blanco. *Casimiroa edulis*-Rutaceae. *Anal Inst Méd Nac*, 3: 117.
- Avilés, M. (1985): **Medicina tradicional: plantas empleadas por parteras empíricas del Edo. de Morelos**. Tesis de licenciatura, Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de México, 88 pp.
- Barquín, M.P., Zamora, I. (1991): **Estudio etnobotánico de los municipios de Mineral del Monte y Mineral del Chico, Estado de Hidalgo**. Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, 150 pp.
- Bertaccini, G., Vitali, T. (1964): **Pharmacological properties of some imidazole derivatives occurring in nature**. *J Pharm Pharmacol*, 16: 441-449.
- Billingsley, M.L., Suria, A. (1982): **Effects of peripherally administered GABA and other amino acids on cardiopulmonary responses in anesthetized rats and dogs**. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 255: 131-140.
- Black, J.W., Owen, D.A.A., Parsons, M.E. (1975): **An analysis of the depressor responses to histamine in the cat and dog: involvement of both H₁-and H₂-receptors**. *Br J Pharmacol*, 54: 319-324.
- Bringas, F., Camacho, R. (1988): **"Plantas medicinales de Chiconautla, Ecatepec, Estado de México"**. Memorias del segundo Coloquio de Medicina tradicional. Un saber en recuperación, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 172-175 pp.
- Brown, C.M., McGrath, J.C., Midgley, J.M., Muir, A.G., O'Brien, J.W., Thonoor, C.M., Williams, C.M., Wilson, V.G. (1988): **Activities of octopamine and synephrine stereoisomers on α -adrenoceptors**. *Br J Pharmacol*, 93: 417-429.
- Cakici, I., Abacioglu, N., Kanzink, I., Zengil, H. (1992): **Biphasic effect of histamine on spontaneously beating rat atria**. *Gen Pharmacol*, 23: 705-708.
- Castro, A.E. (1988): **"Conocimiento y rito en la actividad obstétrica de la medicina tradicional indígena"**. Memorias del segundo Coloquio de Medicina Tradicional. Un saber

en recuperación. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 95-100 pp.

- Cedillo, E. (1990): **Plantas útiles del Municipio de Tepozotlán, Morelos**. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 425 pp.
- Coleman, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S. (1994): International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution and structure of the receptors and their subtypes. **Pharmacol Rev**, **46**: 205-229.
- Conrad, K.P., Whittemore, S.L. (1992): N ω -monomethyl-L-arginine and nitro arginine potentiate pressor responsiveness of vasoconstrictors in conscious rats. **Am J Physiol**, **262**: R1137-R1144.
- Coruzzi, G., Gambarelli, E., Bertaccini, G., Timmerman, H. (1995): Cardiovascular effects of selective agonists and antagonists of histamine H₃ receptors in the anaesthetized rat. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, **351**: 569-575.
- Coruzzi, G., Gambarelli, E., Bertaccini, G., Timmerman, H. (1996): Cardiovascular effects of the novel histamine H₂ receptor agonist amthamine: interaction with the adrenergic system. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, **353**: 417-422.
- Cruz y Corro, A. (1939): Tratamiento de la hipertensión arterial por medio del cocimiento de hojas de zapote blanco. **La Farmacia** **9**: 162-167.
- De la Llave, P., Martínez-Lexarza, J. (1825): **Novorum Vegetabilium Discriptiones**, México, 9 pp.
- De Lille, J. (1934): Nota acerca de la acción del zapote blanco sobre la tensión arterial. **Anal Inst Biol**, **5**: 45-47.
- Díaz, J.L. (1977): Usos de las plantas medicinales de México. Instituto Mexicano para el Estudio de Plantas Medicinales (IMEPLAM), México.
- Dick, J.G. (1979): **Química Analítica**. Editorial el Manual Moderno, México, 547 pp.
- Dirección General de Estadística e Informática de la Secretaría de Salud (1997): Principales resultados de la estadística sobre mortalidad en México. **Salud Publica Mex**, **39**: 490.

- Djerassi, C., Bankiewicz, C., Kapoor, A.L., Riniker, B. (1958): Alkaloid studies XXI partial structure of casimiroedine. **Tetrahedron**, **2**: 168a-172.
- Douglas, A.S., Donald, M.W., Holler, F.J. (1993): **Analytical Chemistry An Introduction**. 6a. ed., Saunders College Publishing, U.S.A., 612 pp.
- Dreyer, D.L., Bertelli, D.J. (1967): The structure of zapotin. **Tetrahedron**, **23**: 4607-4612.
- Dreyer, D.L. (1968): Citrus Bitter Principles. IX. Extractives of *Casimiroa edulis* Llave et. Lex. The structure of zapoterin. **J Org Chem**, **33**: 3577-3582.
- Engler, A. (1931): Rutaceae. En: Engler A. and Harms H. (Eds), **Die natuerlichen Pflanzenfamilien**. 2a. ed., Band, 187-359 pp.
- Enríquez, R.G., Romero, M.L., Escobar, L.I., Joseph-Nathan, P., Reynolds, W.F. (1984): High-performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis* II Determination of Furocoumarins. **J Chromatogr**, **287**: 209-215.
- Ferrigni, N.R., Meyer, B.N., McLughlin, J.L. (1984): Cactus alkaloids. LVI. ^{13}C and ^1H NMR of the imidazoles, N^α , N^α -dimethylhistamine and dolichotheline. **Rev Lat Amer Quim**, **14**: 131-133.
- Flores, R.E. (1987): **Plantas medicinales de la localidad de Cerrito de Cotijarán Municipio de Villamar, Michoacán (México)**. Tesis de licenciatura, Escuela de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, 150 pp.
- Flores-Montalvo, R. (1936): **La solución acuosa glicerinada de *Casimiroa edulis* (zapote blanco) como hipotensor en el hombre**. Tesis de licenciatura, Escuela de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México,
- Farnsworth, N.R. (1993): Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. **J Ethnopharmacol**, **38**: 145-152.
- García-Carmona, S. (1933): "**Contribución al estudio del zapote blanco (*Casimiroa edulis*)**". Tesis de licenciatura, Escuela de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México,
- German, V.F. (1971): N, N-dimethylhistamine, the hypotensive principle of the *Sponge lanthella* sp. **J Pharm Sci**, **60**: 495-496.

- Ghisalberti, E.L. (1993): Detection and Isolation of Bioactive Natural Products. **Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination**. CRC Press. Inc., New York, U.S.A., 9-58 pp.
- Gironacci, M.M., Lorenzo, P.S., Adler-Graschinsky, E. (1997): Possible participation of nitric oxide in the increase of norepinephrine release caused by angiotensin peptides in rat atria. **Hypertension**, **29**: 1344-1350.
- Giugliano, G., Grieco, P., Talenti, A., Mottola, M., Perissutti, E., Santagada, V. (1996): Synthesis and biological evaluation of proline derivatives as potential angiotensin converting enzyme inhibitor. **Boll Soc Ital Biol Sper**, **72**: 29-36.
- Hoffman, B.B., Lefkowitz, R.J. (1996): Catecolaminas, fármacos simpaticomiméticos y antagonistas de los receptores adrenérgicos. En: Hardman, J.G., Limbard, L.E. Molinoff, P.B., Raymond, W.R., Goodman-Gilman, A. (Eds.). **Las bases farmacológicas de la terapéutica**. 9a ed., McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., México, 211-264 pp.
- Gong, J., Wang, X.L., Zheng Y.F., Wang, X.F. (1993): Alpha-adrenoreceptor stimulation mediated positive chronotropic effect in isolated right heart atria of normotensive and SHRsp rats. **Chung-Kuo Yao Li Hsueh Pao (China)**, **14**: 179-182.
- Gothert, M., Garbarg, M., Hey, J.A., Schlicker, E., Schwartz, J.C., Levi, R. (1994): New aspects of the role of histamine in cardiovascular function: identification, characterization, and potential pathophysiological importance of H₃ receptors. **Can J Physiol Pharmacol**, **73**: 558-564.
- Gutierrez, M.A. (1985): **Plantas medicinales de San Lucas el Grande, Estado de Puebla**. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 120 pp.
- Hamburger, M., Hostettman K. (1991): Bioactivity in plants: the link between Phytochemistry and Medicine. **Phytochemistry**, **30**: 3864-3874.
- Hill, S.J., Ganellin, C.R., Timmerman, H., Schwartz, J.C, Shankley, N.P., Young, J.M., Schunack, W., Levi, H., Hass, H.L., (1997): International Union of Pharmacology. XIII. Classification of Histamine Receptors. **Pharmacol Rev**, **49**: 253-278.

- Instituto Nacional Indigenista (1994): Introducción. En: Argueta, A., Cano, L.M., Rodarte M.E. (Eds.). **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana**. México, 15-34 pp.
- Izaddosst, M., Robinson, T. (1991): Synergism and antagonism in the pharmacology of alkaloidal plants. In: Craker, L.E., Simons J.E. (Eds.), **Herbs, Spices and Medicinal Plants**, Vol. 2. Haworth Press, Binghamton, New York.
- Jones, G.P., Naidu, B.P., Leslie, G., Paleg, L.G., Tiekink, E.R.T., Snow, M.R. (1987): -4-hidroxy-N-methylproline analogues in *Melaleuca spp.* **Phytochemistry**, 26: 3343-3344.
- Jones, G.P., Paleg, L.G., Waisel, Y., Solomon, A., Beer, S., Tiekink, E.R.T. (1995): Trans-3-hidroxy-N-methyl-l-proline hydrochloride. **Acta Cryst**, C51: 287-289.
- Jordan, R., Midgley, J.M., Thonnor, C.M., Williams, C.M. (1987): Beta-adrenergic activities of octopamine and synephrine stereoisomers on guinea-pig atria and trachea. **J Pharm Pharmacol**, 39: 752-754.
- Kincl, F.A., Romo, J., Rosenkranz, G., Sondheimer, F. (1956): The constituents of *Casimiroa edulis* Llave et Lex. Part I. The seed. **J Chem Soc**, 76: 4163-4169.
- Krstic M.K., Stepanovic, R.M., Vuckovic, S.M., Krstic, S.K. (1991): Endothelium-independent relaxation of the rat femoral artery caused by activation of histamine H₂-receptors. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 313: 15-23.
- Levi, R., Owen, D.A.A., Treciakowski, J. (1982) Actions of histamine on the heart and vasculature. En: Ganellin C.R., Parsons, M.E. (Eds), **Pharmacology of Histamine Receptors**, Wright PSG, Bristol, pp.
- Leurs, R., Smit, M.J., Timmerman, H. (1995): Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. **Pharmacol Ther**, 66: 413-463.
- Linares, M. (1991): **Flora útil de dos localidades del Municipio de Tecali de Herrera, Puebla**. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 186 pp.
- Ling, J.S.L., P'an, S.Y., Hochstein, F.A. (1958): Some pharmacological properties of N-substituted analogs of histamine. **J Pharmacol Exp Ther**, 122: 44A.

- Lozoya, X. (1994): **Plantas, Medicina y Poder (Breve Historia de la Herbolaria Mexicana)**. Editorial Pax, México. 175 pp.
- Lozoya, X., Enríquez, R.G. (1981): **El zapote Blanco (investigación sobre una planta medicinal mexicana)**. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México, 134 pp.
- Lozoya, X., Rodríguez, D., Ortega, M., Enríquez, R.G. (1978): Aislamiento de una sustancia hipotensora de la semilla de *Casimiroa edulis*. **Arch Invest Med**, **9**: 565-573.
- Lozoya, X., Romero, G., Olmedo, M., Bondani, A. (1977): Farmacodinamia de los extractos alcohólicos y acuosos de la semilla de *Casimiroa edulis*. **Arch Invest Med**, **8**: 145-154.
- Maat L. , Beyerman, H.C. (1983): The Imidazole Alkaloids. En: Brossi, A., Manske, R.H.F. (Eds.). **The Alkaloids Chemistry and Pharmacology**, Academic Press, New York, London, 282-333 pp.
- Major, R.T., Dürsch, F. (1958): $N\alpha$, $N\alpha$ -dimethylhistamine, a hypotensive principle in *Casimiroa edulis* Llave et lex. **J Org Chem**, **23**: 1564-1565.
- Magos, G.A., Fernández, G., Vidrio, H., Reynolds, W.F., Enríquez, R.G.: **Hypotensive and vascular smooth muscle relaxant effects of histamine analogs from *Casimiroa edulis*. Relation to nitric oxide**. International Joints Symposium Chemistry, Biological and Pharmacological Properties of Medical plants from the Americas. Panamá, República de Panamá. Del 23 al 26 de febrero de 1997. Sección B 11.
- Magos, G.A., Vidrio, H. (1991): Pharmacology of *Casimiroa edulis*. Part I. Blood pressure and heart rate effects in the anesthetized rat. **Planta Med**, **57**: 20-24.
- Magos, G.A., Vidrio, H., Enríquez, R.G. (1995): Pharmacology of *Casimiroa edulis*. Part III. Relaxant and contractile effects in rat aortic rings. **J Ethnopharmacol**, **47**: 1-8.
- Magos, G.A., Vidrio, H., Reynolds, W.F., Enríquez, R.G. (1999): Pharmacology of *Casimiroa edulis* IV. Hypotensive effects of compounds isolated from methanolic extracts in rats and guinea pigs. **J Ethnopharmacol**, **64**: 35-44.
- Maldonado, A.B., Heras, M.A. (1990): **Estudio florístico de los huertos familiares en 5 comunidades del Estado de Morelos**. Memorias del IV Congreso Internacional de Medicina Tradicional y Folklórica, San Cristobal de las Casas Chiapas, México.

- Mann, J. (1992): **Secondary Metabolism**. 2a. ed., Oxford Science Publications, Great Britain, 374 pp.
- Martínez, M. (1959): **Las Plantas Medicinales de México**. 4a. ed., Ediciones Botas, México, 656 pp.
- Martínez, M. (1951): Las Casimiroas de México y Centroamérica. **Anal Inst Biol**, **22**: 25-81.
- Matosic, R.L. (1991): **Conocimiento y uso tradicional de la flora de Nepopualco Municipio de Totolapan, Morelos**. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de México, 70 pp.
- McLeod, R.L., Gertner, S.B., Hey, J.A. (1993): Production by R- α -methylhistamine of a histamine H₃ receptor-mediated decrease in basal vascular resistance in guinea-pigs. **Brit J Pharmacol**, **110**: 553-558.
- McLeod, R.L., Gertner, S.B., Hey, J.A. (1994): Species differences in the cardiovascular responses to histamine H₃ receptor activation. **Eur J Pharmacol**, **259**: 211-214.
- Mechoulam, R., Sondheimer, F., Melera, A., Kincl, F.A. (1961): The structure of zapotidine. **J Am Chem Soc**, **83**: 2022.
- Molyneux, R.J. (1993): Water Soluble Alkaloids. En: Colegate, S.M. y Molyneux, R.J. (Eds.). **Bioactive Natural Products Detection, Isolation, and Structural Determination**. CRC Press. Inc., New York, U.S.A., 59-74 pp.
- Morton, J. (1962): Drug aspects of the white sapote. **Econ Bot**, **16**: 288-294.
- Nakahara, T., Ishii, K., Iwamoto, K., Nakayama, K. (1995): Differential significance of nitric oxide in hypotensive mechanisms of acetylcholine and histamine in dogs. **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**, **89**: 77-84.
- Nakanishi, K. (1969): **Infrared Absorption Spectroscopy –Practical-** 5a Reimp., En: Holden-Day, Inc., San Francisco y Nankodo Company Limited, Tokyo. Japón, 233 pp.
- Ochse, J.J., Soule, M.J., Dijkman, M.J., Wehlburg, C. (1965): **Tropical and Subtropical Agriculture**. The Macmillan Company, New York. 508-510 pp.
- Oliva, D., Nicosia, S. (1987): PGI₂-receptors and molecular mechanisms in platelets and vasculature: state of the art. **Pharmacol Res Commun**, **19**: 735-765.

- O'Shaughnessy, K.M., Newman, C.M., Warren, J.B. (1992): Inhibition in the rat of nitric oxide synthesis in vivo does not attenuate the hypotensive action of acetylcholine, ATP or bradykinin. **Exp Physiol**, 77: 285-292.
- Panzica, R.P., Townsed, L.B. (1973) The total synthesis of the alkaloid casimiroedine, an imidazole nucleoside. **J Am Chem Soc**, 95: 8737-8740.
- Popenae, W. (1920): **Manual of tropical and subtropical fruits**. Hafner Press, Collier, New York. 474 pp.
- Power, F.B., Callan, T. (1911): The constituents of the seeds of *Casimiroa edulis*. **J Chem Soc**, 99: 1993-2010.
- Ramírez, E., Rivero, M.D. (1935): Contribución al estudio de la acción farmacodinámica, cardio-circulatoria del zapote blanco. **Arch Lat Am Cardiol Hematol**, 5: 44-57.
- Reid, I.A., Bui, H. , Chou, L. (1994): Role of nitric oxide in the renin and heart rate responses to β -adrenergic stimulation. **Hypertension**, 23 (Suppl. 1): I49-I53.
- Reyes, M.G. (1989): **Contribución al conocimiento de las plantas medicinales del Valle de Tarámbaro, Michoacán (México)**. Tesis de licenciatura, Escuela de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo, 136 pp.
- Ribeiro, A.B. (1993): Hypertension in Latin America: importance and approaches to control. **Clin Exp Hypertens**, 15: 1005-1013.
- Rizvi, S.H., Kapil, R.S., Shoeb, A. (1985): Alkaloids and coumarins of *Casimiroa edulis*. **J Nat Prod**, 48: 146.
- Romero, M. L., Escobar, L.I., Lozoya, X., Enríquez, R.G. (1983): High-performance liquid chromatographic study of *Casimiroa edulis*. I. Determination of imidazole derivatives and rutin in aqueous and organic extracts. **J Chromatogr**, 231: 245-251.
- Sánchez, J. (1893): **Breve estudio sobre la almendra del fruto del zapote blanco**. Tesis de licenciatura, Escuela Nacional de Medicina, México,
- Schoeffter, P., Godfraind, T. (1991): Characterization of histamine-induced contraction in rat isolated aorta. **Eur J Pharmacol**, 197: 193-200.

- Simons, F.E., Simons, K.J. (1994): The pharmacology and use of H₁-receptor antagonist drugs. **N Engl J Med**, **330**: 1663-1670.
- Solomon, A., Beer, S., , Waisel, Y., Jones, G.P., Paleg, L.G. (1994): Effects of NaCl on the carboxylating activity of ruvisco from *Tomaris jordanis* in the presence and absence of proline-related compatible solutes. **Physiol Plant**, **90**: 198-204.
- Sondheimer, F., Meisels, A., Kincl, F.A. (1959): Constituents of *Casimiroa edulis* Llave et Lex. V. Identity of Casimiroolid and Obacunone. **J Org Chem**, **24**: 870.
- Suarez, C. (1990): **Manual de plantas medicinales del lago de Pátzcuaro, Michoacán**. CESE. 81 pp.
- Takenaka, K., Sasaki, S., Uchida, A., Fujita, H., Nakamura, K., Ichida, T., Itoh, M., Nakata, T., Takeda, K., Nakagagawa, M. (1996): GABA_B-ergic stimulation in hypothalamic pressor area induces larger sympathetic and cardiovascular depression in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**, **9**: 964-972.
- Toda, N., Konishi, M., Miyazaki, M. (1982): Involvement of endogenous prostaglandin I₂ in the vascular action of histamine in dogs. **J Pharmacol Exp Ther** **223**: 257-262.
- Toscano, R.A., Enríquez, R.G., Reynolds, W.F., Magos, G.A., Gneco, D. (1997): L-1-Methylproline monohydrate. **Acta Cryst**, **C53**: 1690-1692.
- Toubé, T.P., Murphy, J.W., Cross, A.D. (1967): The structures of edulitine and edulinine-XXIV. **Tetrahedron**, **23**: 2061-2065.
- Trifilieff, A., Da Silva, A., Gies, J.P. (1993): Kinins and respiratory tract diseases. **Eur Respir J**, **6**: 576-587.
- Tung, L.H., Rand, M.J., Louis, W.J. (1985): Cardiac alpha-adrenoreceptors involving positive chronotropic responses. **J Cardiovasc Pharmacol**, **7 (Suppl. 6)**: S121-S126.
- Van de Voorde, J., Leusen, I. (1983). Role of the endothelium in the vasodilator response of rat thoracic aorta to histamine. **Eur J Pharmacol**, **87**: 113-120.
- Vargas, H.M., Ignarro, L.J., Chaudhuri, G. (1990): Physiological release of nitric oxide is dependent on the level of vascular tone. **Eur J Pharmacol**, **190**: 393-397.

- Vartiainen, A. (1935): The action of certain new histamine derivatives. **J Pharmacol Exp Ther**, **54**: 265-282.
- Vidrio, H., Magos, G.A. (1991): Pharmacology of *Casimiroa edulis*; Part II. Cardiovascular effects in the anesthetized dog. **Planta Med**, **57**: 217-220.
- Wagner, H., Grevel, J. (1982): Cardioactive drugs III. Cardioactive amines from *Echinocereus blanckii*. **Planta Med**, **45**: 95-97.
- Williamson, A.P., Seifen, E., Lindemann, J.P., Kennedy, R.H. (1994) α_{1A} -adrenergic receptor mediated positive chronotropic effect in right atria isolated from rats. **Can J Physiol Pharmacol**, **72**: 1574-1579.
- Zavaleta, A.H. (1989): Anatomía del Fruto y Semilla de *Casimiroa edulis* (Rutaceae) "Zapote Blanco" Durante el Desarrollo. Tesis de Maestría (Especialidad en Botánica). Colegio de Postgraduados, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas Centro de Botánica, Montecillo, México, 101 pp.