

R.2647

T.58

ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA
ACCION DEL CANNABIS SOBRE
LA INDUCCION ENZIMATICA

M^a del Patrocinio Villar Lopez. (1.981)

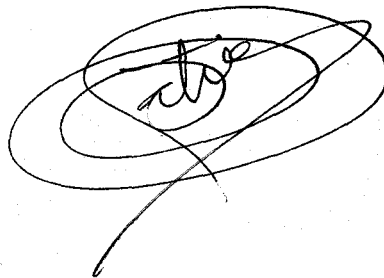
UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA-FACULTAD DE FARMACIA.

DEPARTAMENTO DE ANALISIS QUIMICO, BROMATOLOGIA/

Y TOXICOLOGIA.

Trabajo presentado por M^a. del
Patrocinio Villar López para -
optar al grado de Licenciada -
en Farmacia.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long tail stroke extending downwards and to the left.

Sevilla, Septiembre 1.981.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA-FACULTAD DE FARMACIA.

DEPARTAMENTO DE ANALISIS QUÍMICO, BROMATOLOGIA
Y TOXICOLOGIA.

Vº Bº

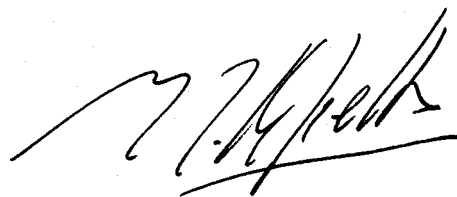
EL JEFE DEL
DEPARTAMENTO.

A complex, cursive handwritten signature in black ink, likely belonging to Dr. J.M. Trillo de Leyva. The signature is highly stylized with many loops and overlapping lines.

Fdo.: Dr. J.M^a Trillo de Leyva
Catedrático Química Inorgánica.

Vº Bº

EL DIRECTOR.

A cursive handwritten signature in black ink, likely belonging to Dr. Manuel Repetto. The signature is more fluid and less complex than the one on the left.

Fdo: Dr. Manuel
Repetto.
Prof.de Toxicología.

A Patricia.

Mi sincero agradecimiento al Doctor D. Manuel Repetto Jiménez, Director del Instituto Nacional de Toxicología y director del presente trabajo por su gran interés y las facilidades que me ha proporcionado para la realización del mismo.

A la Doctora D^a Pilar Sanz Nicolas, codirectora de esta tesina, mi más profundo agradecimiento por su inestimable estímulo y constante colaboración gracias a las cuales se ha podido realizar el trabajo.

Mi reconocimiento a la Doctora M^a Angeles Rodriguez Consuegra por la ayuda prestada en todo momento.

Mi gratitud a todo el personal del Instituto Nacional de Toxicología por la colaboración anónima que siempre me han prestado para el desarrollo de este trabajo.

Erratas advertidas

Pág.	Línea	Dice	Debe decir
12	Fórmula del cannabigerol	- C ₅ H	- C ₅ H ₁₁
17	última	(Agurell, 1970)	Nada.
19	12	(Nahas, 1973)	(Nahas y col., 1973)
28, 30	4, 14	(P/V)	(p/v)
30	7, 9, 14	homogenización	homogeneización.
32	8	Litwath	Litwatch.
40	4	H	M
72	10	Formeyer	Fortmeyer.
72	25	con animales	nada.
73	8	56, 27	56, 23.
80	7	simpsium	simposium.

I N D I C E

=====

INDICE

INTRODUCCION	2
PARTE TEORICA	
- Botánica	5
- Química	9
- Farmacología	15
- Toxicocinética	
- Toxicodinámica	
PARTE EXPERIMENTAL	
- Plan de Trabajo	25
- Material y Métodos	
- Animales	28
- Productos empleados para los trata- mientos	28
- Tratamientos	29
- Preparación del extracto hepático .	30
- Métodos analíticos	32
- Resultados	42
DISCUSION	72
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFIA	78

I N T R O D U C C I O N

=====

Recientemente se han realizado importantes avances en el conocimiento de la naturaleza y de la estructura química de los compuestos cannabinoides, aunque queda mucho por conocer de los aspectos farmacológicos y fisiopatológicos.

Hoy se considera que tanto el consumo del cannabis como el del alcohol, son las toxicofilias más importantes de nuestro tiempo, aumentando el número de consumidores de cannabis quizás debido al bajo coste de la planta en relación con otras drogas.

Hay que resaltar que el término Cannabis, escrito con mayúsculas y subrayado, se aplica a la planta, mientras que cannabis con minúsculas alude a la resina y sus productos activos en general.

Los compuestos cannábicos, presentes en la resina de la planta Cannabis sativa, no son todos psicoactivos y, entre éstos, existen grandes diferencias farmacodinámicas tanto cualitativas como cuantitativas. Este hecho junto a la posible influencia de los cannabinoides biológicamente activos, hace que la farmacología de estas sustancias y que los datos que existen son frecuentemente -- contradictorios, ya que unos autores encuentran que los cannabinoides inhiben determinadas actividades metabólicas (Ortega, 1.974; Laurent, 1 974; Chari-Bitron, 1.976), mientras que otros las estiman activadas (Poddar y Ghosh, 1.972; Ghosh y col. 1.977).

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto del cannabis sobre los mecanismos responsables del metabolismo de las drogas en el hígado. Pretendemos aclarar si los cannabinoides son inductores o inhibidores enzimáticos.

Para ello hemos estudiado aquí las actividades/

de las oxidasas microsómicas totales, medidas como consumo de TPNH, y la de la aril-hidrocarburo-hidroxilasa(AHH), en la fracción post-mitocondrial de extractos hepáticos - de ratas sometidas a tratamientos agudos y crónicos de -- distinta intensidad y duración con extracto de cannabis.

Paralelamente se estudiaron grupos control de - animales que no recibieron tratamiento alguno.

== PARTE TEORICA ==

BOTANICA

El género *Cannabis* está constituido por una única especie, *Cannabis sativa* L; es una planta perteneciente a la clase de las Dicotiledóneas, orden Urticales y la familia Cannabinaceae (Straburger y col. 1.968).

Es una planta herbácea anual que si la tierra y el agua le son propicias puede levantar su tallo hasta 3/4 m de altura; es simple si vive en masas y ramificada si lo hace en solitario. Las hojas son opuestas, pecioladas, de nervaduras palmeadas y divididas en 5, 7 ó 9 foliolos, con bordes aserrados y cubiertas de unos pelos característicos, unos cistolíticos, otros unicelulares y otros pluricelulares secretores de resinas ricas en principios activos; son ásperas al tacto y de color verde oscuro (Pelt 1.971).

La planta es dióica: el pie masculino que es de menor tamaño que el pie femenino y más delgado se seca y marchita después de la floración, fragilidad que dio lugar a que le asignara en un tiempo la calidad femenina, - confusión que encontramos en Lemeny (Traité Universal des Drogues Simples, 1.733) y otros autores. Las flores masculinas están agrupadas en panículos y son de menor tamaño/ que las femeninas de color amarill verdoso.

El fruto es un aquenio, la semilla. el cañamón, es rica en aceites.

En el pie femenino las inflorescencias forman racimos muy contraídos, de cimas interpuestas con brácteas foliáceas, dándole al pie apariencia muy compacta. Los pelos glandulares muy abundantes en el extremo floral en --

floración segregan la resina rica en principios psicoactivos y tóxicos (Verdejo, 1.973).

Es originaria del centro de Asia y cultivada en Extremo Oriente desde tiempos remotos. Se extendió su cultivo a todo Occidente, probablemente a causa del empleo de las sumidades de la planta como estupefaciente por la resina que segregan sus inflorescencias femeninas (Gola y col. 1.961).

Esta gran extensión geográfica da lugar a numerosas formas ecológicas y variedades: índica, chinensis, americana etc. que difieren en la calidad de la fibra, la cantidad de resina producida y en el contenido de ésta en sustancias psicoactivas, influyendo también las variaciones climatológicas, orografía, factores ecológicos que inciden en el cultivo de la planta y recolección. Existen dos formas o variedades extremas: productoras de fibra de buena calidad y poca resina (cáñamo común) y productoras/ de fibras de mala calidad y mucha resina (variedad índica) con numerosas formas intermedias (Davis y Col. 1.963; Lerner y Zeffert, 1.968; Joyce y Curri, 1.970; Repetto y Méndez, 1.972).

El cáñamo cultivado en regiones frías o templadas con abundantes lluvias, las fibras son blandas y útiles para comercio, pero pobres en resina, mientras que en climas cálidos o secos con falta de agua, las fibras segregan abundante resina, pero son duras, cortas y quebradizas.

El área total del cultivo del cáñamo es desconocido tanto a nivel mundial como internacional, aunque la superficie de explotación disminuye progresivamente al introducir las fibras de síntesis que han desplazado su uso

como fibra de saquerío, etc. El cultivo ilícito del Canna
bis varía según con el fin que se quiera elaborar; por --
ejemplo en la India, en el cultivo para preparar Ganja cu
yo objeto es obtener plantas ricas en resina, eliminan --
los pies masculinos de la planta (Verdejo, 1.973).

Las sustancias obtenidas de la planta se pueden
preparar de distintas maneras con fines para el consumo -
humano, con distintos nombres que difieren de unos países
a otros.

- Hierba: hojas y sumidades floridas picadas co
mo tabaco que se preparan como ciga--
rrillos para fumarlos. En ellos se en
cuentran semillas (cañamones). Reci--
ben distintos nombres según los pai--
ses:

- . Grifa: (España y Marruecos).
- . Dagga: (Sudáfrica).
- . Hemp: (Gran Bretaña).
- . Marihuana: (E.E.U.U.).
- . Marijuana: (México).
- . Kiff o Kiffi: (Marruecos).
- . Maconha: (Brasil).
- . Polvo: rapé de Kiffi.
- . Polvo prensado.
- . Ganja (India): picaduras de sumida--
des floridas manipuladas y comprimi--
das para darle forma aplastada o de
bolas.
- . Bang, bhang, patti (India) picadura
de hojas secas en maceración acuosa
o alcohólica con o sin adición de -
otros tóxicos (opio, Datura, etc.).

- Resina: producto exudado espontáneamente en gotitas por la planta; se separa sacudiendo la planta seca o frotándola -- con la mano, lienzos, delantales ó extrayéndola con disolventes orgánicos. Se consume fumándola en cazoletas mezclada con tabaco o preparando infusiones con las que se hacen dulces. Se denomina:

. Charas (India), Chiras (Africa del/Norte): Se obtiene como el hachis.

. Haschis, hash: en principio se designa a la resina del Cannabis, aunque como consecuencia de la adulteración se le aplica a la mezcla resina y polvo de vegeta. Se consume en comprimidos, barras, conocido como "chocolate".

- Aceite, aceite rojo: Se extrae de la planta con un disolvente orgánico en caliente y posterior evaporación del disolvente (Repetto y col. 1.981).

QUIMICA

El conocimiento de la química del Cannabis sativa, no ha sido satisfactorio hasta mitad del siglo XX, pero es necesario conocer con exactitud la química de una sustancia y confirmarla con los métodos analíticos y de síntesis para comprender sus funciones biológicas, actividades farmacológicas, efectos toxicológicos.

Desde la década de los 60 y en estos últimos años, el estudio de la química del cannabis ha avanzado de forma muy significativa. El conocimiento de sus componentes ha permitido aislar y purificar sus estructuras químicas (Verdejo Vivas, 1.973).

A finales del siglo XIX estaba esclarecido que el cannabis era diferente a drogas perfectamente estudiadas, también de origen vegetal tales como la hoja de coca y opio con sus alcaloides cocaína y morfina.

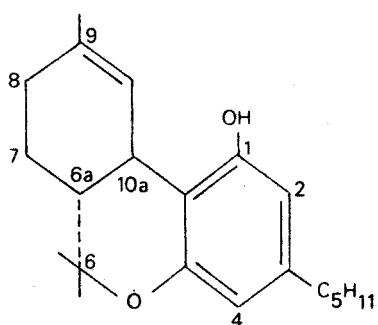
El análisis de un aceite rojo extraído de la planta dio a conocer que las moléculas de sus constituyentes activos no contenían nitrógeno y por tanto no eran de naturaleza alcaloídica (Wood, 1.896, Adams, 1.940, 1.942, Mechoulam, 1.976).

Mechoulam y Gaoni en 1.967 y Mechoulam en 1.970 definieron el término "cannabinoides" como el "grupo del compuesto C_{21} , presentes en Cannabis sativa, sus ácidos / carboxílicos y productos de su transformación".

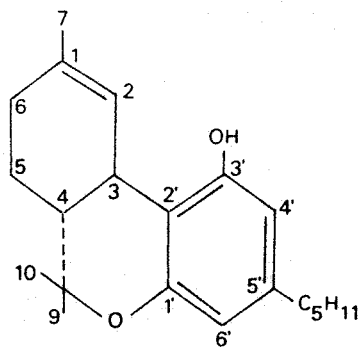
Por su estructura química pertenecen al grupo de los terpenos fenoles.

En los cannabinoides han sido utilizados dos --

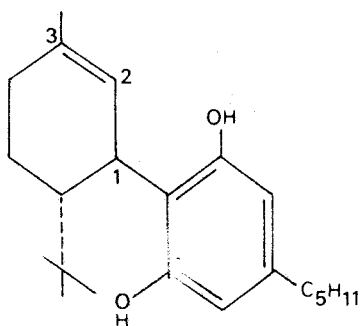
sistemas de numeración: En una se sigue la regla química formal, para la numeración de tipo pirano que va bien -- con los tetrahidrocannabinoides, pero que no se puede -- aplicar a los cannabinoides que no son piranos, la 2ª. -- numeración escoge una base bioquímica, considerando a -- los cannabinoides, como monoterpenoides sustituidos, la/ cual tiene la ventaja de que se puede usar para todos los cannabinoides y el número del carbono en la molécula per manece en las transformaciones químicas (Mechoulam, y -- . Gaoni, 1.967).



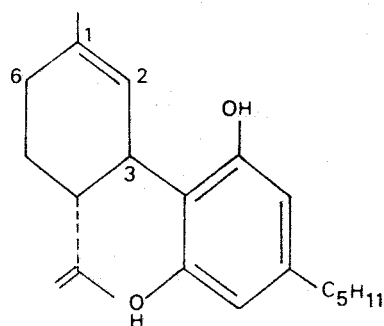
Δ^9 -THC



Δ^1 -THC



Numeración formal



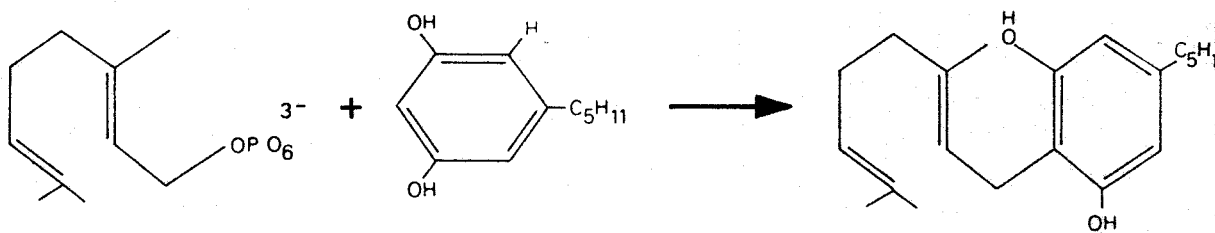
Numeración monoterpenoide

En nuestro trabajo, seguiremos la nomenclatura terpénica, empleada normalmente por nuestro grupo (Repetto y Menéndez, 1.972).

Los principales compuestos presentes en la planta pertenecen a varios grupos:

- Compuestos cannabinoides: a este grupo corresponde una serie de derivados del tetrahydrocannabinol (THC), Δ^1 -THC, Δ^8 -THC, cannabinol, cannabidiol, cannabigerol, cannabinocromeno, cannabicitrol, ácido cannabidiólico, ácido cannabinólico, etc.
- Alcaloides: Los más interesantes son las cannabaminas A, B, C y D; las más abundantes son las A y B. En la planta existen otros alcaloides como la muscarina y atropina etc (Verdejo, 1.973).
- Ceras: el más importante es el n-nonacosano (Wood y col., 1.896).
- Aceites esenciales: entre ellos el carofileno, α -selineno, β -farneseno etc. (Mechoulam, 1.973).

En la planta los cannabinoides se forman por --
 condensación del olivetol con fosfato de geraniol (precur-
 sor de terpenoides). El primer compuesto de la cadena bio-
 sintética es el cannabigerol a partir del cual se forman/
 todos los demás (Mechoulam, 1.970).

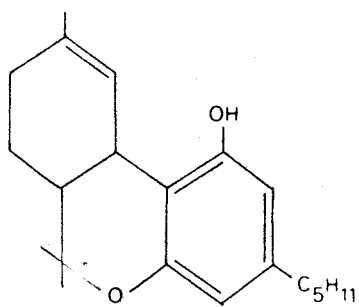
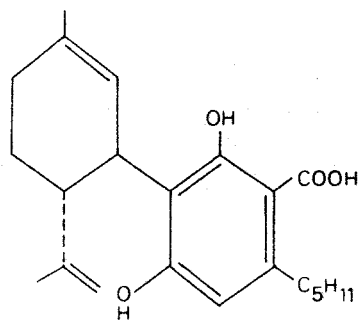


Fosfato de geraniol

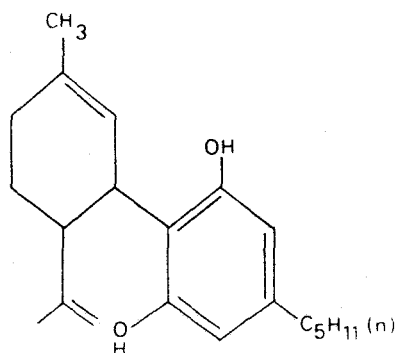
Olivetol

Cannabigerol

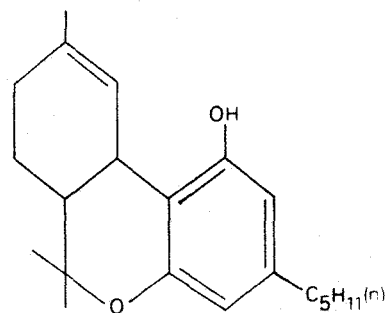
Los cannabinoides más importantes además del -
 Δ^1 -THC son: ácido cannabidiólico, cannabidiol, cannabinol,
 cannabigerol, cannabidivarina, cannabicromeno, etc.

 Δ^1 -THC

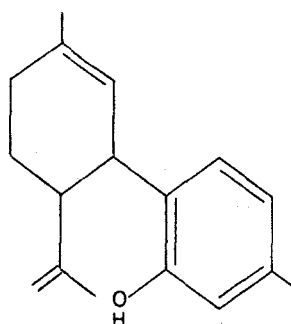
Acido Cannabidiolico (ACBD)



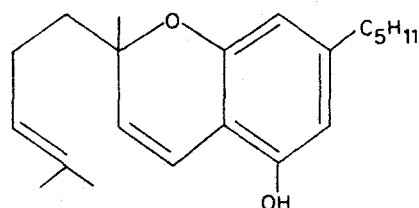
Cannabidiol (CBD)



Cannabinol (CBN)

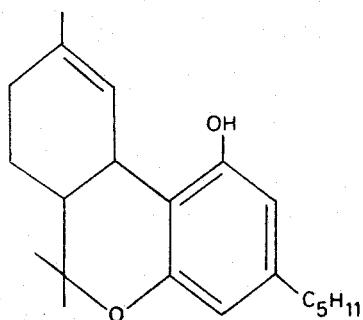
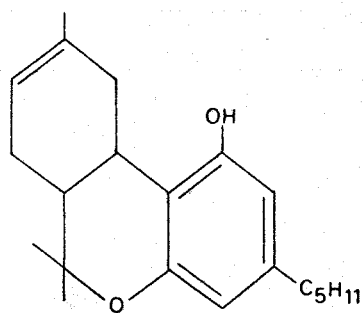


Cannabidivarina



Cannabicromeno

Se ha comprobado una isomería de posición debido a la localización de un doble enlace y aunque son posibles seis isómeros del tetrahidrocannabinol, sólo se han aislado de la planta el Δ^1 -THC y el Δ^8 -THC, siendo el más activo el Δ^1 -THC, existen además unas diferencias en cuanto a efectos psicotomiméticos entre las formas levógiras/ y dextrógiras; el (+)- Δ^1 trans THC tiene una actividad menor que el (-)- Δ^1 - trans THC, debido a la isomería cis-trans (Verdejo Vivas, 1.973).

 Δ^1 -THC Δ^6 -THC

En los distintos preparados de cannabis, el contenido de Δ^1 -THC varía ampliamente, pero se puede establecer una escala con los datos recogidos de la bibliografía y considerar que el hachis, la marihuana, la ganja contiene por término medio un 5%, 1% y 3% de Δ^1 -THC en peso respectivamente (O.M.S. 1.971). Del estudio comparativo de varias muestras de grifa procedentes de aprehensiones policiales en nuestro territorio, realizado por Repetto y col. (1.976) se encuentran los siguientes promedios: 18,72% de resina, 20,15% THC, 1,91% CBN, 19,40% CBD, aunque hay grandes oscilaciones de una muestra a otra (Repetto y col. 1.976).

FARMACOLOGIA.- TOXICOCINETICA

El estudio de la distribución de los cannabinoides en los tejidos se ha hecho con compuestos marcados y teniendo en cuenta la vía de administración.

Sometiendo a ratas a humo de cigarro con $^3\text{H}-\Delta^1$ -THC (vía inhalatoria) y decapitándolas a distintos tiempos, se vió que a los 20 minutos había una gran concentración en pulmón, glándulas salivares, riñón, hígado, alcanzando a las 24 horas el máximo en el pulmón, a las 8 horas hay un aumento del 50% en el hígado y disminuye en cerebro y riñón, a las 72 horas permanece constante en cerebro, hígado y riñón (Ho y col. 1.970).

Si la vía de administración es i.v. no se ha podido detectar en sangre a los 15 minutos ni el Δ^1 -THC ni el Δ^8 -THC (Klausner y col. 1.970).

La distribución después de la administración oral de 10 mg/kg de $^3\text{H}-\Delta^1$ -THC a las 2 horas es mayor en el hígado que en el riñón, corazón, pulmón, grasa, bazo, plasma y cerebro sucesivamente.

Se observó que entre las 2 y 4 horas después del tratamiento se acumulaba Δ^1 -THC, elevándose los niveles en el plasma, mientras que a las 8 horas disminuyen. La magnitud del efecto es mayor en el cerebro que en el plasma, aunque los niveles elevados persistan más de 8 horas (Pryor y col. 1.976).

Si la administración se ha hecho por vía i.v. ó vía i.p. con $^{14}\text{C}^8$ -THC o $^{14}\text{C}^1$ -THC, los metabolitos 11-hidroxi Δ^8 -THC y 11-hidroxi Δ^1 -THC conjugados a ácidos/grasos quedan retenidos largo tiempo, son los mismos meta

bolitos detectados anteriormente en hígado, bazo, médula/ósea (Highty y col. 1.976).

La concentración del Δ^1 -THC libre en el plasma es muy baja debido a que más del 60% se une a las lipoproteínas y el resto a la albúmina, esto no ocurre con otros compuestos lipófilos como imipramina, prostaglandina E₂ etc. Parece ser que tanto en la especie humana como en las ratas, la distribución del tetrahidrocannabinol entre las lipoproteínas está más relacionada con el contenido de lípidos totales o lípidos neutros que con proteínas o fosfolípidos, además dicha distribución refleja la diferencia de especie (Klausner y col. 1.975).

Tanto el Δ^1 -THC como su metabolito el 7-hidroxid Δ^1 -THC son farmacológicamente activos (Mechoulam, 1.973).

El metabolismo del Δ^1 -THC se realiza en los microsomas hepáticos, la hidroxilación se lleva a cabo por una monoxigenasa dependiente de NADP y de O₂.

Se ha comprobado que el SKF-525A (acetato de β -dietil amino etil difenil propilo) inhibe la 7-hidroxilación del Δ^1 -THC, así como el CO por interacción con el citocromo P-450, lo cual sugiere que el sistema monoxigenasa incluye al citocromo P-450 en esta hidroxilación (Burstein y col. 1.971).

Los metabolitos del Cannabis no se excretan en su forma libre, sino conjugados con el ácido glucurónico, eliminándose de esta forma el 60% de los metabolitos polares, siendo la mayoría de los metabolitos no conjugados más polares que el 11-hidroxiderivados o bien ácidos carboxílicos. El 7-hidroxid Δ^1 -THC se identificó como un aglucon del ácido glucurónico. Sin embargo el Δ^1 -THC incambia

do y el cannabino Δ^1 , se elimina en pequeñas cantidades por la bilis, entre 0'05-01% (Widman y col. 1.974).

Por vía biliar se elimina un 60% en 3 horas de la dosis de cannabino Δ^1 ingerida, un 5% de los metabolitos excretados está formado por el 7-hidro Δ^1 derivado siendo la mayoría más polares como el 8,11, hidro Δ^1 derivado y ácidos carboxílicos (Siemens y col. 1.975).

El resto de los metabolitos se eliminan por orina (Lemberger y col. 1.970, 1.971; Kanter y col. 1.972, - 1.975; Kelley y col. 1.976). Cuando la vía biliar se satura y se aumentan las dosis administradas, la excreción -- urinaria de los metabolitos muy polares es mayor (Siemens y Kalant, 1.975).

Estudios publicados por Agurell y col. (1.970) - sobre la eliminación del $^3\text{H}-\Delta^1$ -THC administrados a conejos vía i.v. y comparando los datos con los obtenidos con ratas muestran que la mayor parte de la radioactividad se excreta en la orina, eliminándose por ésta un 30% y por heces un 10% (Agurell, 1.970).

EFFECTOS.-TOXICODINAMICA

La acción farmacológica del cannabis produce numerosos efectos en el organismo a muy distintos niveles debido a que se trata de un fármaco de acción muy compleja por la gran cantidad de sustancias activas presentes en la resina, tales como el Δ^1 - THC, Δ^8 - THC, CBN, CBD, etc., todos ellos psicoactivos y con actividades a veces contradictorias, así como a la actividad de sus principales metabolitos hidroxiderivados, pudiéndose sumar o interferir los efectos producidos.

Actualmente se encuentran en la bibliografía muchas afirmaciones y resultados de investigación muy contradictorios, debido a que a veces se emplea en los estudios extracto total de cannabis y otras los diferentes cannabinoides por separado, pues se ha visto que algunos de éstos poseen acciones antagónicas en cierto grado (Repetto, 1.974)

Debido a esta farmacodinamia compleja, y pese a todos los trabajos realizados sobre los efectos del cannabis a distintos niveles, el mecanismo de acción no ha quedado todavía establecido.

Por estas razones, en la presente revisión bibliográfica, nos limitaremos a recoger las referencias sobre los estudios relativos a los efectos bioquímicos del cannabis, como antecedentes de nuestros trabajos encaminados a avanzar en el conocimiento del mecanismo de acción de estos productos.

Parece ser que el fenómeno más importante y más claramente establecido a nivel celular es una inhibición inespecífica de la síntesis de macromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas, observadas en cultivos de linfocitos (Nahas

y col., 1.976), pero desconociéndose hasta el momento a qué nivel tiene lugar este efecto. Algunos autores piensan que ocurre por alteración de la membrana plasmática, debido a la afinidad de los cannabinoides por la fracción lipídica; como consecuencia quedaría afectado el transporte de precursores/ (Luthra y Rosenkrantz, 1.974; Laurent y Roy, 1.975; Blevins, Regan, 1.976; Jakubovic, McGeer, 1.976; Nahas, Desoize, Hsu/ y Morishima, 1.976; Zimmerman y Zimmerman, 1.976).

En los fumadores de cannabis, se ha encontrado -- sensiblemente inhibida la respuesta inmunitaria a nivel celular, lo que puede estar relacionado con una disminución de la síntesis de ADN (Nahas, 1.973).

Algunos autores incluso llegan a decir que hay alteraciones en el número y estructura de los cromosomas, con irregularidades en la división celular. Las anomalías cromosómicas observadas no parecían debidas a causas tales como virus, irradiaciones, etc., por lo que pensaron que se podían producir por el consumo del cannabis (Morishima y col., 1.976; Miras y col., 1.978).

Trabajos realizados por Persand y Ellington (1.967) demostraron que la administración de cannabinoides (4,2 mg/kg) produjo efectos teratogénicos en ratas tratadas en los -- seis primeros días de gestación. Observaron una alta incidencia de fetos mal formados, un incremento de la reabsorción fetal, un decremento en el peso y tamaño del feto y una gran incidencia de anormalidades: focomelia, encefalocele, etc.

Pace, Davis y Borgen (1.971) no encontraron efectos teratogénicos en ratas o cobayos tratados con THC.

Estudios realizados por NIDA (Instituto Nacional/ de USA para el estudio de abuso de drogas), señalan que la -

marihuana no parece ejercer efectos mortales importantes durante la gestación sobre el feto o la madre, o, después del nacimiento en las crías.

Con dosis más altas de cannabinoides que las de consumo casual humano, no se produjeron efectos tóxicos detectables, confirmando la baja toxicidad somática de los productos cannábicos (Fournier y col, 1.976).

Rosenkrantz y Braude (1.975) reafirmaron en general que no hay efectos teratogénicos con dosis elevadas - efectivas.

En resumen, actualmente no está generalmente -- aceptado que se produzcan trastornos teratógenos, sino ligera disminución del número de los constituyentes de la camada y del peso de los recién nacidos y que el incremento de las anomalías fetales en los hijos de animales tratados con cannabis, es muy pequeño en relación con las que se presentan en los animales control.

La administración por vía i.p. de dosis bajas - de Δ^1 - THC produce un aumento del AMPc, mientras que a dosis altas produce una disminución del AMPc, tanto en cerebro total como en cortex, cerebelo y médula. Este efecto bifásico concuerda con cambios encontrados en las conccentraciones de aminas biógenas, regulación de la temperatura (Dolby y Kleinsmith, 1.974), comportamiento, procesos de aprendizaje, pérdida en la memoria temporal (Sanz y col. 1.979). Se - sabe que el AMPc es un intermediario en la sinapsis de la - acción de algunos neurotransmisores (Libet y Tosaka, 1.970; Kebebian y Greengard, 1.971; Nathanson y Greengard, 1.977).

De igual forma, el THC produce a dosis bajas un aumento de la actividad de la ATPasa, la cual se inhibe cuando la dosis es alta, ya que se alteraría el estado de los lípidos necesarios para la actividad de esta enzima (Chari-Bitron y Bino, 1.970; Schawartz y col., 1.975). La ATPasa se encarga del transporte activo de cationes a través de la membrana celular, preferentemente en el Sistema Nervioso Central.

En trabajos anteriores realizados en nuestros laboratorios, se ha comprobado una inhibición de la ATPasa en hígado y en cerebro en tratamientos crónicos y agudos con cannabis (Repetto y col., 1.979).

Existen pocos datos, y estos son a veces contradictorios, del efecto de los componentes del cannabis sobre los sistemas enzimáticos en general. El Δ^1 - THC inhibe las oxidasas de la piridoxina, y, posiblemente, también la fosfoquinasa del piridoxal, cerebrales. El extracto de cannabis y el THC producen elevación notable de la actividad de algunas enzimas hepáticas, triptófanopirrolasa y tirosina α -cetoglutarato-transaminasa, (Poddar y Gosh, 1.973), mientras que el LSD no produce elevación alguna de estas enzimas (Poddar y Ghosh, 1.972).

Se ha demostrado que de los componentes del cannabis el Δ^1 - THC y el Δ^8 - THC son los que poseen la mayor actividad psicomimética. La mayoría de los autores han encontrado que ellos producen un incremento en el metabolismo de la norepinefrina (N.E.); sin embargo, los niveles de la 5-hidroxitriptamina (5-TH), así como la actividad de la monoaminoxidasa (MAO), permanecen sin cambio, lo que sugiere que no está alterada la vía de degradación de la serotonina; hay un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y liberación de enzimas de la matriz mitocondrial (Ortega, 1.974).

Otros autores han observado que existe una estimulación transitoria de la MAO y una inhibición de la triptofano hidroxilasa (Ouellet y col., 1.973).

En el tratamiento crónico con Δ^1 - THC se observa un incremento en las proteínas, RNA, fosfolípidos, colesterol, glucosa-6-fosfatasa y Mg^{2+} ATPasa en la fracción microsómica; en cambio, hay una disminución de la peroxidación de lípidos microsómicos, quedando los niveles de las transaminasas GOT y GPT de hígado y suero sin alterar, así como los triglicéridos hepáticos.

Con una dosis única, no se produce alteración alguna, excepto un incremento de la ATPasa y un decremento en la peroxidación (Ghosh y col., 1.977), lo cual parece indicar que no hay daño hepático.

En cuanto a los sistemas enzimáticos metabolizados de drogas, los resultados son confusos. Según Bartova y Birmingham (1.976), el Δ^1 - THC produce una fuerte disminución in vitro de la NADH oxidasa de las mitocondrias de cerebro y corazón. En el cerebro es distinta, según la región, ya sea en el hipotálamo, cerebelo, corteza, etc.

Fernandes y col. (1.973) encuentran que el Δ^1 - - THC, Δ^8 - THC, el cannabinal y el cannabidiol producen una inhibición de la desmetilación enzimática de la aminopirina/ y de la morfina, con la excepción en esta última del Δ^8 -THC/ y no habría acción sobre la hidroxilación de la anilina. --- Otros autores han observado que con dosis altas de tetrahidrocannabinal después de 6 horas de la administración, se -- produce una disminución de la anilina hidroxilasa, mientras/ que hay poca inhibición con dosis bajas (Mittra y col. 1.976).

A la vista de todo lo expuesto, nuestro objetivo es pretender aclarar si los cannabinoides son inductores o inhibidores enzimáticos, para lo que proponemos el siguiente plan de trabajo.

PARTE EXPERIMENTAL
=====

PLAN DE TRABAJO

ESTUDIO DEL EFECTO DEL CANNABIS EN LA INDUCCION DE DISTINTOS SISTEMAS ENZIMATICOS EN HIGADO DE RATAS.

- 1.- Puesta a punto de los métodos de determinación de - actividades enzimáticas.
 - 1.1.- Determinación de oxidasas microsómicas totales.
 - 1.2.- Determinación de arilhidrocarburohidroxilasa.

- 2.- Estudio de la variación de estas actividades enzimáticas en animales control, no tratados, según el sexo, la edad y la época del año.
 - 2.1.- Influencia de la época del año.
 - 2.2.- Influencia de la edad.
 - 2.3.- Influencia del sexo.

- 3.- Estudio de estos niveles enzimáticos en ratas sometidas a los siguientes tratamientos con cannabis:
 - 3.1.- Tratamiento agudo.
 - Determinación de las actividades enzimáticas a las cuatro horas de la administración.
 - Idem. a las ocho horas.
 - Idem. a las doce horas.
 - Idem. a las dieciseis horas.
 - Idem. a las veinte horas.
 - Idem. a las veinticuatro horas.

 - 3.2.- Tratamiento crónico.
 - Determinación de las actividades enzimáticas

a las tres semanas de iniciado el tratamiento.

- Idem. a las cuatro semanas.
- Idem. a las cinco semanas.
- Idem. a las seis semanas.
- Idem. a las ocho semanas.

MATERIAL Y METODOS

ANIMALES

Se utilizaron 106 ratas albinas, machos, adultas de 150-200 gr de peso, consanguíneas, Wistar, suministradas por Charles River. Se usan adultas por tener la actividad enzimática y metabólica normalizada.

Se agruparon en lotes de tres animales de la misma edad y siempre que fue posible de la misma camada, para cada tratamiento, haciéndose paralelamente un control en lotes de tres individuos normales.

Durante todos los tratamientos, los animales tomaron agua y alimentos ad libitum.

PRODUCTOS EMPLEADOS PARA LOS TRATAMIENTOS.

- Extracto crudo de cannabis, procedente de --grifa de apresión policial o suministrada por el Ministerio de Sanidad, extraída con éter de petróleo en proporción del 25% (P/V), mediante calefacción a reflujo durante 15 minutos, enfriando antes de la filtración. El proceso se repite dos veces, reuniéndose los filtrados. El extracto orgánico se concentra en rotavapor a presión reducida y se pasa sobre el residuo una corriente de aire tangencial, hasta obtener la resina.

Como vehículo del extracto, se utilizó aceite de oliva que no interfiere en los resultados y fué administrado por vía s.c.

Composición del extracto:

De los estudios de composición de estos extraco

tos, obtenidos de la planta realizados por Repetto y Martínez (1.975) por cromatografía gaseosa, se obtuvieron -- los siguientes resultados:

- 17,80% de resina.
- 11,80% de THC.
- 0,46% de CBN.
- 9,52% de CBD.

tiempo de reacción de Duquenois, 40 segundos.

TRATAMIENTOS.

1.- Agudos de distinta duración.

A cada lote de animales se administró -- una dosis de 600 mg/kg de extracto de cannabis por vía -- s.c., sacrificándolos a distintos tiempos: 4, 8, 12, 16, -- 20 y 24 horas.

2.- Crónicos de distinta duración.

Para el experimento se utilizaron, distin-- tos lotes de animales y se sometieron durante 3, 4, 5, 6, 8 semanas en días alternos, a una dosis de 300 mg/kg de -- extracto de cannabis, administrado por vía s.c.

Las administraciones no se prolongaron du-- rante más de 8 semanas a causa del mal estado general de/ los animales provocado por tan largo tratamiento.

En todos los casos, los animales se sacrifi-- can una vez finalizado el tratamiento.

Todos los tratamientos se repitieron al me-- nos tres veces.

Se llevaron a cabo varios experimentos con-- trol, con lotes de tres individuos normales.

PREPARACION DEL EXTRACTO HEPATICO

Los animales se sacrifican por decapitación, me diante una guillotina, para que la muerte sea instantánea y no sufran alteración alguna los niveles enzimáticos. In mediatamente se aísla el hígado de cada rata, transfiriéndolo a una caja Petri a 4°C en cámara fría.

A continuación se lleva a cabo el proceso de ho mogenización y preparación de los extractos, todo ello a/ 4°C en cámara fría.

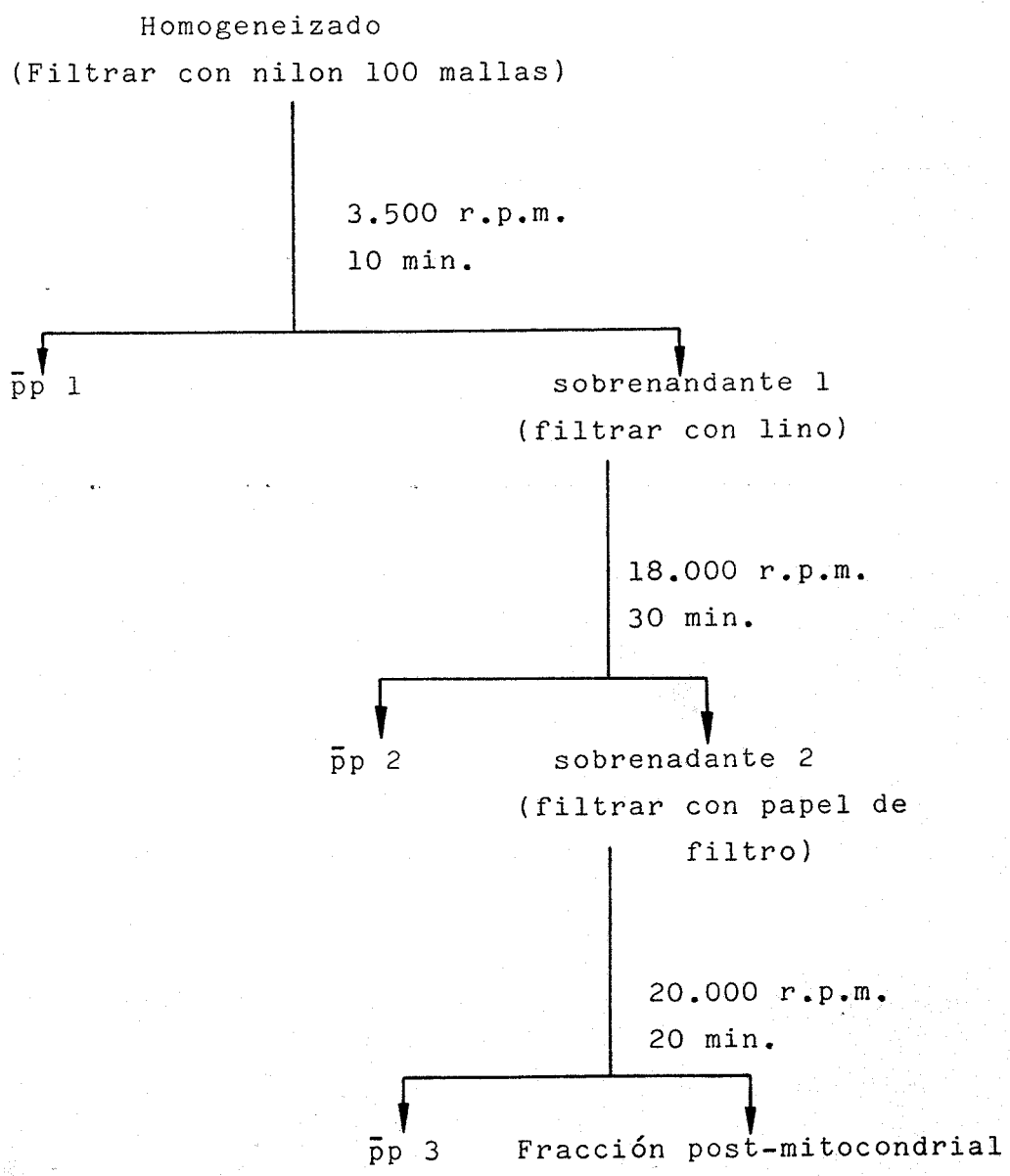
La homogenización (Fleischer y col. 1.974) se / realiza, después de lavar la víscera con sacarosa, 0,25M, secar con papel de filtro y pesar.

La víscera se pica con unas tijeras y se suspen de en 5 volúmenes (P/V) de sacarosa 0,25 M-10 mM HEPES -- pH = 7,5 y se procede a la homogenización en un homogeni-zador de vidrio Potter.

Se filtra con nilon de 100 mallas, se lava el - resíduo con medio de homogenización y se centrifuga en - una centrífuga Beckman J2-21 a 3.500 r.p.m. durante 10 mi nutos a 4°C. El s**obrenadante** se filtra con lino y se cen-trifuga de nuevo a 18.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C.

El sobrenadante se filtra con papel de filtro, - para eliminar grasas y se vuelve a centrifugar a 20.000 - r.p.m. durante 20 minutos, se vuelve a filtrar con papel/ de filtro, obteniéndose la fracción post-mitocondrial(/ f.p.m.).

Fraccionamiento del extracto de hígado



METODOS ANALITICOS

Se ensayaron y se pusieron a punto los distintos métodos de análisis que fueron los siguientes:

1.- PROTEINAS.

En la bibliografía, se encontraron los siguientes métodos para la determinación de proteínas: Método de Kingsley (1.942) basado en la reacción de biuret; método de Kjeldahl (Hiller y col. 1.948); método de Warburg y -- Christian (1.941) y el método de Lowry y col. (1.951) con la modificación de Litwath (1.960).

Se utilizó el método de Lowry por ser el más -- exacto y el que se utiliza normalmente en Bioquímica.

El fundamento de este método, es la formación -- de un complejo cúprico-aminoácido que reducen el molibdato a óxidos de molibdeno de color azul intenso.

Los reactivos utilizados fueron:

Reactivo A: $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ al 2% en NaOH 0'1 N.

Reactivo B $\text{SO}_4 \text{Cu} 5\text{H}_2\text{O}$ al 5% en agua destilada.

Reactivo C: Tartrato sódico potásico al 2% en -- agua destilada.

Reactivo D: 5 ml de reactivo C.

1 ml de reactivo B.

4 ml de agua destilada.

Reactivo E: 50 ml de reactivo A.

1 ml de reactivo D.

Reactivo F: Folin-Ciocalteus Phenolreagenz 1N -- (ácido fosfomolibdotúngstico).

La tabla de protocolo es la siguiente:

	<u>Blanco patrón</u>	<u>Patrones</u>			<u>Blanco problema</u>	<u>Problema</u>
	1	2	3	4	5	6
Albúmina(1 mg/ml)	-	0,05	0,1	0,2	-	-
Problema	-	-	-	-	0,1	0,1
Agua	1,0	0,95	0,9	0,8	0,9	0,9
Reactivo E(Agitar,10')	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Reactivo F(Agitar,30')	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Agua	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,0
D.O. 500 nm						

Los resultados se expresan en mg de proteínas/ml.

Los reactivos D, E y F se preparan en el momento de la determinación. Patrón albúmina: 1 mg/ml.

Para la determinación se preparan tres patrones con 0'05, 0'1 y 0'2 mg de albúmina respectivamente, un -- blanco patrón al que no se le añade extracto y se le agrega/ 1 ml de agua destilada, un blanco para cada problema al -- que se adiciona 0'1 ml de extracto y los tubos problemas a los que se añade a cada uno 0'1 ml de extracto, se completan todos los tubos con agua hasta 1 ml.

Se adiciona a cada tubo 2'5 ml de reactivo E, -- agitando y se esperan 10 minutos, se añade 0'5 ml de reactivo F a todos los tubos, excepto a los blancos de los -- problemas, se agitan y se esperan 30 minutos, se completa cada tubo con agua destilada hasta 5 ml.

Se leyó a 500 nm el color de los patrones de con centración conocida, frente al blanco patrón y del problema frente a su blanco, en un calorímetro Espectrofotómetro Spectronic 20.

2.- ARIL-HIDROCARBURO-HIDROXILASA

Para la determinación de esta enzima se utilizó/ el método de Pelkonen y col. (1.975), basado en la reacción de la hidroxilación del 3,4-benzopireno, catalizada por el/ citocromo P-450 y que requiere oxígeno molecular y NADPH. -- Consiste en la determinación del benzopireno que desaparece cuando se usa como sustrato, y se detiene la reacción con -- una solución alcalina de Tritón x-100, según Dehnen y col.- (1.973), ello evita la extracción del benzopireno de los mé todos usuales y permite su determinación directa por Espectrofotometría de Fluorescencia.

Los reactivos utilizados fueron:

Tampón fosfato 0,1 M pH = 7,4.

NADPH 2,5 mM.

Cl₂ Mg 100 mM.

Cl K 1 M.

Benzopireno 2,5 mM en acetona.

10% Tritón x-100, 1% EDTA en NaOH 1 N.

El NADPH se prepara en el momento de la determinación. La cantidad de proteínas de la muestra repercute/ en los resultados, siendo la cantidad óptima 1 mg/0,5 ml/ de extracto (Dehnen y col. 1.973; Pelkonen y col. 1.975).

Para la determinación se prepara un blanco pro- blema al que no se le añade extracto y se añaden 0,5 ml - de Tampón fosfato, 0,1 ml de NADPH, 0,1 ml de Cl₂ Mg, 0,1- ml de ClK y de tres tubos problemas a los que se añaden - los mismos reactivos, más 0,5 ml de extracto, completando todos los tubos con agua destilada hasta 1,65 ml. Se incuban todos los tubos a 37°C durante 15 minutos en una estufa de incubación P Selecta, se añaden a todos los tubos - Tritón x-100 para detener la reacción. Se centrifuga en - una centrifugadora Orto a 500 r.p.m. durante 5 minutos -- para eliminar las proteínas precipitadas y se diluye el - volumen del sobrenadante 4 veces.

La medida de fluorescencia se hizo en un Espec- trofotómetro de Fluorescencia Perkin-Elmer MPF-3 en las - siguientes condiciones:

Excitación 375 nm	Rendija 4/4
Emisión 405 nm	Sensibilidad 0,1

Se expresa la actividad enzimática en μ moles - de benzopireno desaparecido/mg de proteínas/min.

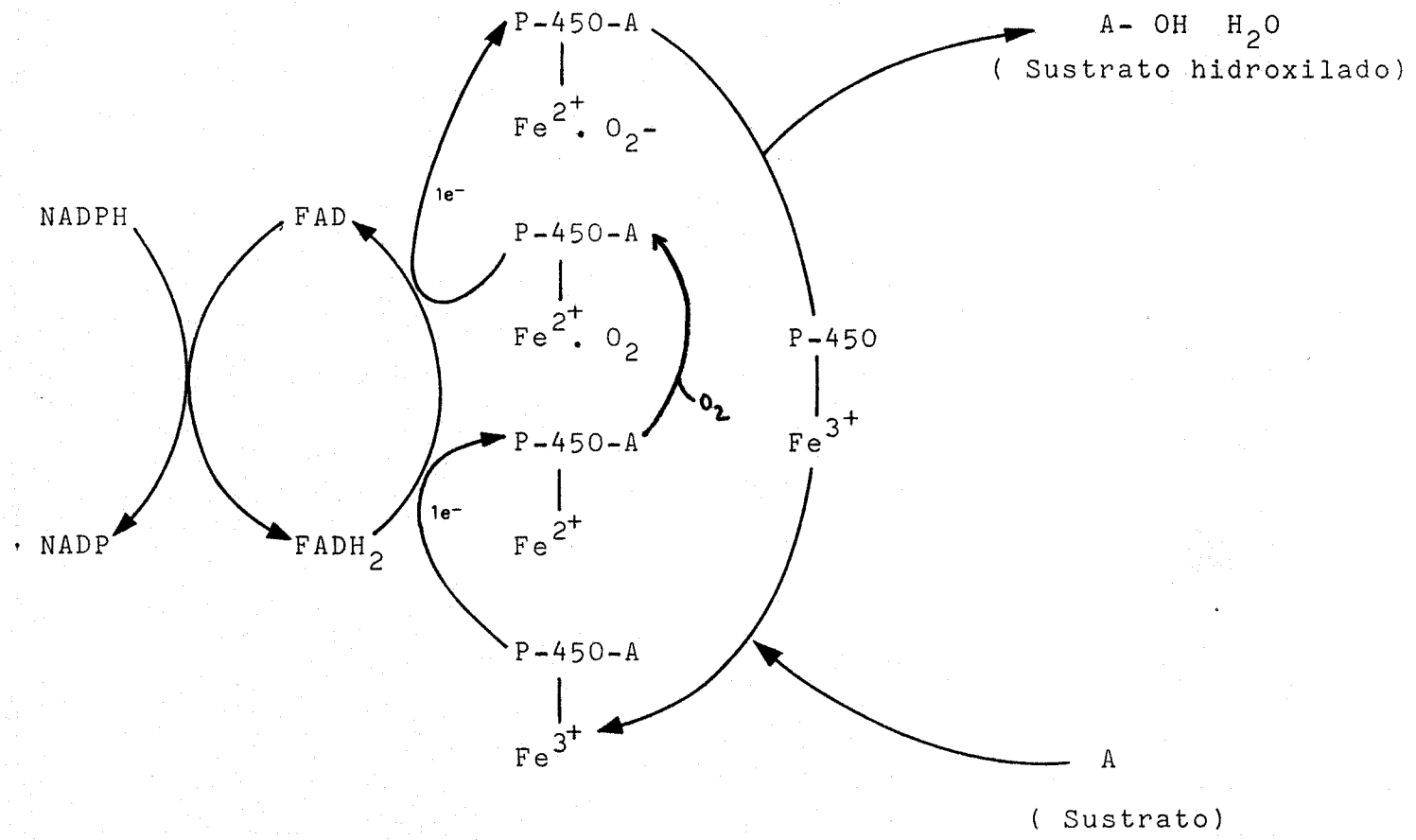
La tabla de protocolo es la siguiente:

	<u>Blanco</u>	<u>Problema</u>
Tampón fosfato (0,1 M pH = 7,4)	0,5	0,5
NADPH 2,5 mM	0,1	0,1
Cl ₂ Mg 100 mM	0,1	0,1
ClK 1M	0,1	0,1
Extracto	---	0,5
Agua	0,85	0,35
Benzopireno 2,5 mM	0,1	0,1
37°C 15 minutos		
10% Tritón x-100 (en 1% EDTA en NaOH1N)	0,1	0,1
Centrifugar		
Dilución		
Medida de Fluorescencia.		

3.- TPNH

Determinación de TPNH como control de las oxid_{as} microsómicas.

Uno de los sistemas microsómicos de transporte/ electrónico en el hígado está constituido por una flavoproteína llamada NADPH-citocromo-P-450-reductasa y un citocromo especializado, el citocromo P-450, según el siguiente - esquema: (Lehninger, 1.978).



El control de las oxidasas microsómicas, se puede realizar de distintas formas:

A.- Por métodos indirectos, basados en determinar la hidroxilación de un sustrato que utilice ese sistema enzimático, como el método de la anilina (Pérez, 1.969).

B.- Método basado en la identificación del citocromo P-450 según el método de Omura y Sato, que se fundamenta en la formación de un compuesto amarillo con un pico de absorción a 450 nm, al burbujear con CO durante 10-20 segundos la muestra reducida con ditionito. La concentración de P-450 se calcula con ayuda de unas tablas (Omura y Sato, 1.967).

En el caso de los microsomas hepáticos, interfiere el citocromo b_5 , pero puede ser solubilizado de forma selectiva y eliminado de las partículas microsómicas por digestión con esteapsina; sin embargo con este tratamiento prácticamente la mitad del citocromo P-450 se transforma en citocromo P-420 que es imposible de eliminar (Jernström, y col. 1.975).

C.- Método que se basa en medir directamente la desaparición de NADPH, en el que el sistema donador de electrones es el par NADPH-NADP y el sistema aceptor de electrones, el par $FADH_2$ - FAD (flavin-adenín dinucleótido) lo hemos sustituido por el 2,6 diclorofenolindofenol, (DPIP) aceptor de electrones artificial de color azul; este colorante experimenta un cambio en su espectro de absorción cuando es reducido por el NADPH (Paneque, 1979).

Dada la fuerte actividad de este coenzima, para cada determinación, es necesario hacer un sondeo previo, para saber cual es la dilución del extracto más conveniente para la medida.

Los reactivos utilizados fueron:

Tampón fosfato 0,01 M pH = 7,8

NADPH 0,2 mM

DCPIP 0,04 mM

Albúmina 0,07% (activador)

El NADPH y el DCPIP se prepararon en el momento de la determinación.

Para la determinación se disponen de varios tubos problemas a los que se añaden 0,6 ml de tampón fosfato, 0,6 ml de NADPH, 0,6 ml de DCPIP y 0,6 ml de albúmina. Se incuban los tubos a 38°C durante 5-8 minutos, en una estufa de incubación P Selecta. A continuación se pasa la mezcla a la cubeta del espectrofotómetro y se añade rápidamente 0,3 ml del extracto enzimático mantenido en hielo.

Se sigue durante 3 minutos la cinética de la -- reacción a 340 nm en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Hi tachi 200.

Cálculos:

$A = a \cdot b \cdot c$.

$a =$ Coeficiente de extinción $6,23 \times 10^3 \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$

$b = 1 \text{ cm}^2$.

$c =$ Concentración molar.

La actividad enzimática se expresa en $\mu\text{moles/ml}$ de TPNH desaparecido/mg de proteínas/minuto.

La tabla de protocolo es la siguiente:

	<u>Problema</u>
Tampón fosfato (0,01 M pH = 7,8)	0,6
NADPH 0,2 mM	0,6
DCPIP 0,04 mM	0,6
Albúmina 0,07%	0,6
38°C 5-8 min	
Pasar a cubeta de espectrofotómetro	
Extracto	0,3
Cinética a 340 nm	3 min.

R E S U L T A D O S

1.- ENSAYOS PREVIOS DE LOS METODOS DE DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

1.1.- DETERMINACION DE OXIDASAS MICROSOMICAS TOTALES.

A. Comparación de dos formas de determinación de la desaparición de Trifosfopiridin nucleótido reducido (TPNH).

a) Determinación directa de TPNH desaparecido, por comparación con un extracto enzimático inactivado.

Protocolo

	<u>Problema</u>	<u>Patrón Inactivo.</u>
Tampón fosfato (0,01 M ph = 7,8)	0,6	0,6
NADPH 0,2 mM	0,6	0,6
DCPIP 0,04 mM	0,6	0,6
Albúmina 0,07%	0,6	0,6
Extracto enzimático	0,3	-
Extracto enzimático inactivo	-	0,3
5-8 min 35°C		
D 0 340 nm		

b) Cinética

Protocolo (Ver Material y métodos pag. 40)

Los resultados obtenidos con ambos métodos aparecen en la tabla 1.

TABLA 1.- Valores medios obtenidos con dos métodos de determinación de la desaparición de TPNH.

<u>TRATAMIENTO</u>	<u>Método Directo</u>		<u>Método Cinético</u>	
	<u>T P N H</u>	<u>Nº Animales</u>	<u>T P N H</u>	<u>Nº Animales</u>
	(µmol/mg/min)		(µmol/mg/min)	
CONTROL	2,55 \pm 1,44	12	34,13 \pm 15,23	21
AGUDO 24 h (600 mg/Kg)	2,45 \pm 1,58	7	28,17 \pm 3,42	9
CRONICO (300 mg/Kg)				
4 Semana	0,86 \pm 0,40	3	3,53 \pm 0,40	6
5 Semanas	2,06 \pm 0,95	3	1,96 \pm 0,17	6

De la consideración de los resultados que se obtienen por ambos métodos, entendemos que el cinético es mucho más fiable porque permite seguir el curso de la reacción en un caso como éste en el que no es posible detener la reacción sin que se altere el propio TPNH.

B.- Puesta a punto de la determinación de desaparición de TPNH mediante cinética enzimática.

Debido a que las oxidasas microsómicas totales -- constituyen un sistema enzimático muy activo y muy sensible/ a las alteraciones, su determinación requiere en cada caso - un sondeo previo para fijar la dilución de enzima más adecuada.

En la tabla 2 exponemos un modelo de dicho sondeo:

TABLA 2.- Variación de la actividad enzimática de las oxidasas totales según la dilución del extracto.

<u>Dilución extracto</u>	<u>∇ DO_{340 nm}</u>
1:1	*
1:5	*
1:10	0,033
1:20	0,064
1:30	0,052
1:40	0,036

* No se detecta decremento en la lectura de DO -- porque la reacción es instantánea.

1.2.- DETERMINACION DE ARIL-HIDROCARBURO-HIDROXILASA(AHH).

Comparación de dos métodos de determinación de la actividad enzimática.

a) Detención de la reacción con acetona y extracción del benzopireno de la mezcla de reacción con disolventes orgánicos (Método de Pelkonen y col. 1.975).

Protocolo

	<u>Blanco</u>	<u>Problema</u>
Tampón fosfato (0,1 M ph= 7,4)	0,5	0,5
NADPH 2,5 mM	0,1	0,1
Cl ₂ Mg 100 mM	0,1	0,1
Cl ⁻ 1M	0,1	0,1
Extracto	-	0,5
Agua	0,75	0,25
Benzopireno 2,5 mM	0,1	0,1
37°C 15'		
Acetona	1,0	1,0
Centrifugar		

Extraer con hexano 2 ml 2--> 1 ml extraer con NaOH 1M

Det. Fluorescencia	}	Exc. 366	Rendija 4/4
		Em. 410	Sensibilidad 30

b) Detención de la reacción con Tritón y determinación directa (Dehnen y col.1.973)

Protocolo (ver material y métodos, pag. 36)

El valor medio de los resultados obtenidos en ratas normales con ambos métodos se presenta en la Tabla 3.

TABLA 3.- Valores medios obtenidos en ratas normales con -- dos métodos de determinación de AHH expresados en $\mu\text{mol/mg/min}$

<u>Método de extracción</u>	<u>Método directo</u>
4,14 \pm 1,50	7,13 \pm 0,86

Como se ve en la Tabla3el método directo da no só lo valores más altos en un mismo ensayo de un lote de animales normales sino que es mucho menos complejo y laborioso -- por lo que está menos sujeto a errores.

En los resultados que se darán en el resto del -- trabajo hemos reflejado solamente los obtenidos por el método cinético de determinación de la desaparición de TPNH y -- por el método directo para la AHH por considerar que son los verdaderamente fiables.

2.- ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN RATAS CONTROL NO TRATADAS.

En las tablas 4, 5 y 6 aparecen los valores - obtenidos en la determinación de oxidasas microsómicas/ totales (TPNH) y Aril-hidrocarburo-hidroxilasa en ratas control no tratadas.

TABLA 4.- Actividad de oxidasas microsómicas totales en ratas control no tratadas.

<u>Experiencia</u>		<u>TPNH</u>
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>(μ mol/mg/min)</u>
1	a	31,78
	b	23,77
	c	23,67
2	a	12,80
	b	11,52
	c	12,52
3	a	18,93
	b	15,75
	c	15,63
4	a	40,92
	b	39,03
	c	39,60

..... sigue

Cont. TABLA 4.

<u>Experiencia</u>		<u>TPNH</u>
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>(μ mol/mg/min)</u>
5	a	47,55
	b	33,44
	c	38,77
6	a	46,52
7	a	46,44
8	a	56,91
9	a	54,59
10	a	49,77
11	a	56,91

TABLA 5.- Actividad de la aril-hidrocarburo-hidroxilasa
en ratas control no tratadas.

<u>Experiencia</u>		<u>AHH</u>
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>(mμmol/mg/min)</u>
1	a	2,64
	b	5,64
2	a	7,65
	b	5,84
	c	8,46
3	a	5,60
	b	4,76
	c	6,00
4	a	8,64
	b	5,33
	c	5,92
5	a	1,64
	b	3,28
	c	3,49
6	a	6,56
	b	6,92
	c	6,56
7	a	13,00
	b	13,32
	c	17,20

.... sigue

Cont. TABLA 5.

<u>Experiencia</u>		<u>AHH</u>
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>(m μ mol/mg/min)</u>
8	a	6,66
	b	7,18
	c	4,26
9	a	9,48
	b	11,08
	c	9,28
10	a	3,09
	b	6,39
	c	7,92
11	a	13,88
12	a	6,66
13	a	2,26
14	a	6,53
15	a	7,93
16	a	5,67

TABLA 6.- Resumen de los valores medios de las actividades enzimáticas en ratas control no tratadas.

<u>TPNH</u>	<u>AHH</u>
<u>(μ mol/mg/min)</u>	<u>(mμ mol/mg/min)</u>
34,13 \pm 15,23 (a)	7,04 \pm 3,37 (b)

a) Valor medio de 21 animales.

b) Valor medio de 35 animales.

De los valores expuestos, podemos extraer - información sobre la influencia que en ellos tiene, - la época del año, la edad y el sexo (apartado 2.1, -- 2.2 y 2.3).

2.1.- INFLUENCIA DE LA EPOCA DEL AÑO EN LA QUE SE REALIZAN LOS EXPERIMENTOS.

En la tabla 7 se exponen los valores medios obtenidos en distintas épocas del año para ver la modificación que sufren estos niveles enzimáticos debido a distintas condiciones ambientales.

TABLA 7.- Influencia de la época del año en las actividades enzimáticas del TPNH y AHH en ratas normales no tratadas.

<u>Fecha</u>	<u>Nº Animales</u>	TPNH	AHH
		(<u>μmol/mg/min</u>)	(<u>mμmol/mg/min</u>)
Invierno	3	39,92 ± 5,81	9,94 ± 0,80
Primavera	3	50,26 ± 3,34	7,04 ± 0,63
Verano	3	12,29 ± 0,55	2,80 ± 0,82

2.2.- INFLUENCIA DE LA EDAD.

Los datos reflejados en la tabla 8 corresponden a experimentos realizados en una misma época, verano (Junio-Julio).

TABLA 8.- Influencia de la edad en las actividades de TPNH y AHH en ratas normales no tratadas.

<u>Edad</u> <u>meses</u>	<u>Nº Animales</u>	<u>TPNH</u> <u>(μmol/mg/min)</u>	<u>AHH</u> <u>(mμmol/mg/min)</u>
3	3	16,77 \pm 1,52	6,68 \pm 0,16
6	3	12,29 \pm 0,55	6,03 \pm 1,27

Nota.- De los resultados obtenidos a lo largo del estudio de los animales no tratados y reflejados en las tablas 4 y 5, recogemos en ésta sólo aquellos que son comparables por haberse realizado en la misma época del año, para que la única variable que influya sea la edad de los animales.

2.3.- INFLUENCIA DEL SEXO.

TABLA 9.- Influencia del sexo en la actividad de la AHH en ratas normales no tratadas.

<u>Sexo</u>	<u>Nº Animales</u>	<u>AHH</u> <u>(μmol/mg/min)</u>
♂	3	6,03 \pm 1,27
♀	3	5,80 \pm 2,0

Nota.- El presente trabajo está efectuado con ratas macho.

3.- EFFECTO DEL CANNABIS EN LOS SISTEMAS ENZIMATICOS
OXIDATIVOS DE DROGAS.-

3.1. TRATAMIENTO AGUDO.

En las tablas 10, 11, 12, 13 y figuras 1 y 2 aparece la evolución de los niveles enzimáticos a lo largo de una intoxicación aguda tras administración de una sola dosis de cannabis (600 mg/Kg).

TABLA 10.- Actividad de las oxidasas microsómicas -
 totales en la f.p.m. de ratas tratadas -
 con cannabis.

<u>Experiencia</u>			<u>TPNH</u>
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>Tiempo (*)</u>	<u>(μ mol/mg/min)</u>
1	a	4	-
	b		26,95
	c		29,07
2	a		34,89
	b		28,45
	c		24,88
3	a	8	13,98
	b		26,75
	c		13,71
4	a	12	16,72
	b		17,44
	c		14,15

.... sigue

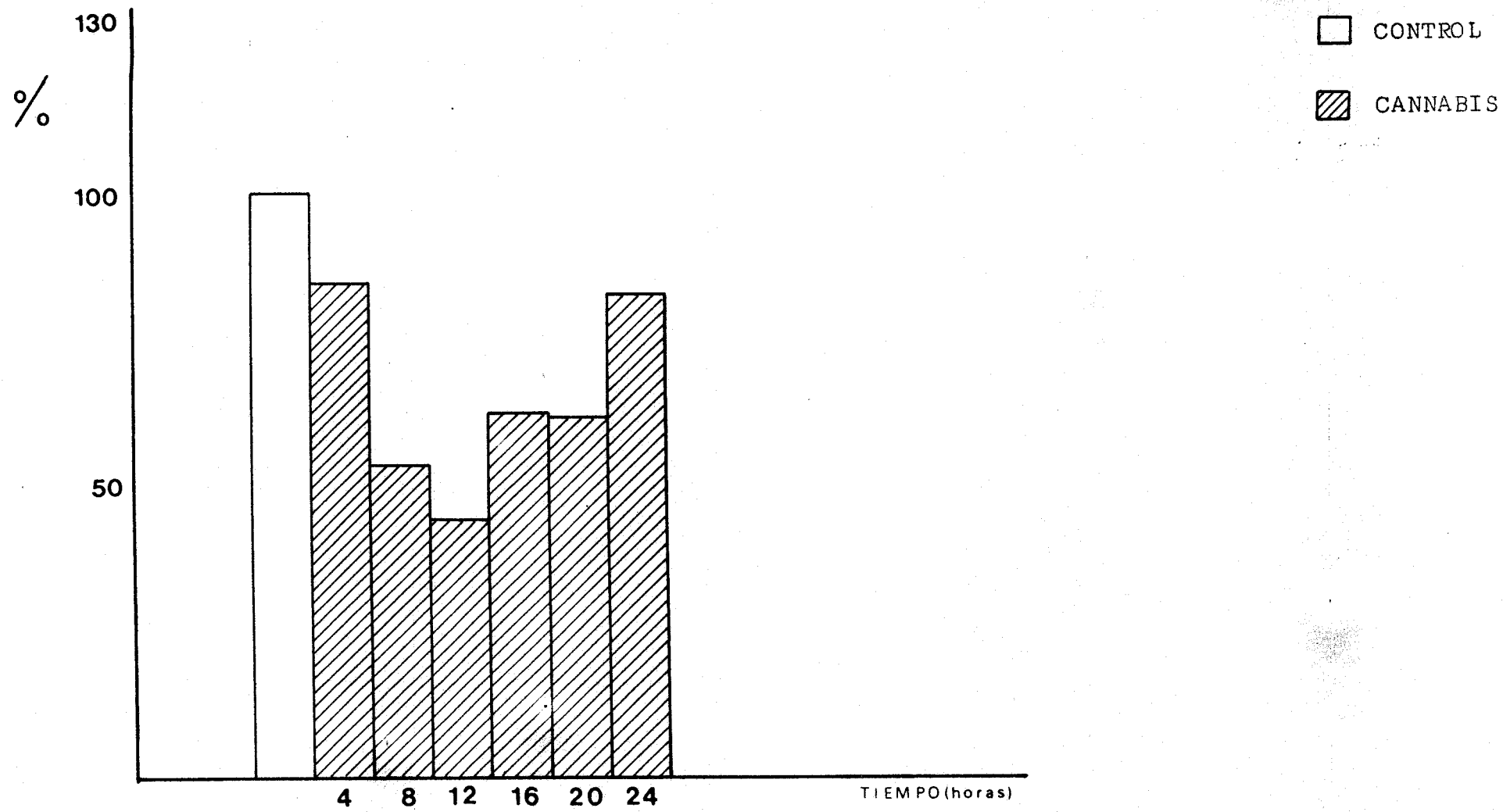
Cont. TABLA 10.

<u>Experiencia</u>		<u>TPNH</u>	
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>Tiempo (*)</u>	<u>(μ mol/mg/min)</u>
5	a	12	13,23
	b		12,84
	c		15,31
6	a	16	21,90
	b		21,95
	c		19,81
7	a	20	25,47
	b		19,02
	c		18,39
8	a	24	25,35
	b		30,83
	c		20,00
9	a		28,18
	b		31,04
	c		31,70
10	a		28,53
	b		27,98
	c		29,92

*) En esta tabla y las siguientes, Tiempo, en horas transcurrido desde el principio del tratamiento/ al sacrificio de los animales.

TABLA 11.- Resumen de los valores medios de la actividad de las oxidaxas microsómicas totales en la f.p.m. de ratas tratadas con cannabis.

TRATAMIENTO		Tiempo (h)	TPNH		% Actividad
Nº Dosis			(μ mol/mg/min)		
CONTROL	-	-	34,13	\pm 15,23	100
AGUDO	1	4	28,84	\pm 3,35	84,50
(600 mg/Kg)	1	8	18,14	\pm 6,08	53,14
	1	12	14,94	\pm 1,70	43,77
	1	16	21,22	\pm 0,99	62,17
	1	20	20,96	\pm 3,19	61,41
	1	24	28,17	\pm 3,42	82,53



VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS OXIDASAS MICROSOMICAS TOTALES
EN LA INTOXICACION AGUDA POR CANNABIS (Fig.1)

TABLA 12.- Actividad de la aril-hidrocarburo-hidroxi-
 lasa en la f.p.m. de ratas tratadas con -
 una dosis aguda de cannabis (600 mg/Kg).

<u>Experiencia</u>		<u>AHH</u>		
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>Tiempo (h)</u>	<u>(μ mol/mg/min)</u>	
1	a	4	5,20	
	b		9,27	
	c		-	
2	a		5,10	
	b		-	
	c		5,45	
3	a	8	6,27	
	b		4,26	
	c		6,97	
4	a	12	4,63	
	b		4,44	
	c		4,26	
5	a	16	4,44	
	b		3,26	
	c		8,48	
6	a	20	4,84	
	b		5,71	
	c		6,66	

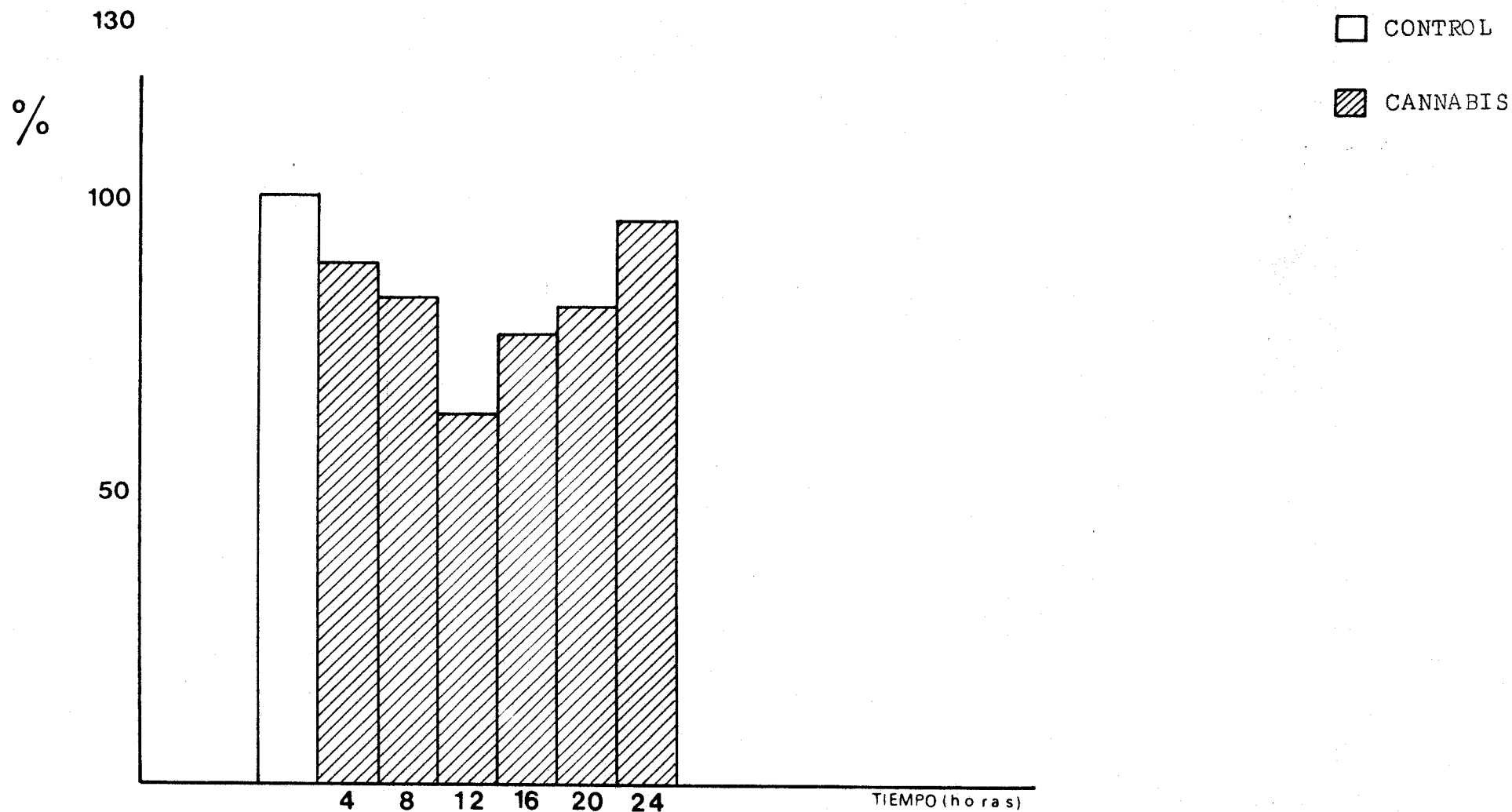
..... sigue

Cont. TABLA 12.

<u>Experiencia</u>			<u>AHH</u>
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>Tiempo (h)</u>	<u>(m μmol/mg/min)</u>
7	a	24	1,68
	b		4,23
	c		4,56
8	a		6,92
	b		8,53
	c		5,06
9	a		7,61
	b		7,24
	c		4,14
10	a		9,60
	b		10,66
	c		10,80

TABLA 13.- Resumen de los valores medios de la actividad de la aril-hidrocarburo-hidroxilasa en la f.p.m. de ratas tratadas con --cannabis.

	TRATAMIENTO		AHH	% Actividad
	Nº Dosis	Tiempo (h)	(μ mol/mg/min)	
CONTROL	-	-	7,04 \pm 3,37	100
AGUDO	1	4	6,25 \pm 1,74	88,77
(600 mg/Kg)	1	8	5,83 \pm 1,14	82,81
	1	12	4,44 \pm 0,15	63,06
	1	16	5,39 \pm 2,23	76,56
	1	20	5,73 \pm 0,74	81,39
	1	24	6,75 \pm 2,74	95,88



VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ARIL - HIDROCARBURO - HIDROXILASA
EN LA INTOXICACION AGUDA POR CANNABIS (Fig.2)

3.2.- TRATAMIENTO CRONICO.

En las tablas 14, 15, 16 y 17 y figuras 3 y 4, aparece la evolución de las actividades enzimáticas a lo largo de una intoxicación crónica.

TABLA 14.- Actividad de las oxidasas microsómicas totales/ en la f.p.m. de ratas tratadas de forma crónica con cannabis (300 mg/Kg en días alternos).

<u>Experiencia</u>					<u>TPNH</u>
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>Nº Dosis</u>	<u>Tiempo(*)</u>	<u>(μ mol/mg/min)</u>	
1	a	9	3	5,52	
	b			4,40	
	c			2,97	
2	a			7,00	
	b			6,52	
	c			7,30	
3	a	12	4	3,37	
	b			2,93	
	c			-	
4	a			3,88	
	b			3,41	
	c			4,07	
5	a	15	5	2,09	
	b			1,75	
	c			2,26	
6	a			1,80	
	b			1,87	
	c			2,01	

.... sigue.

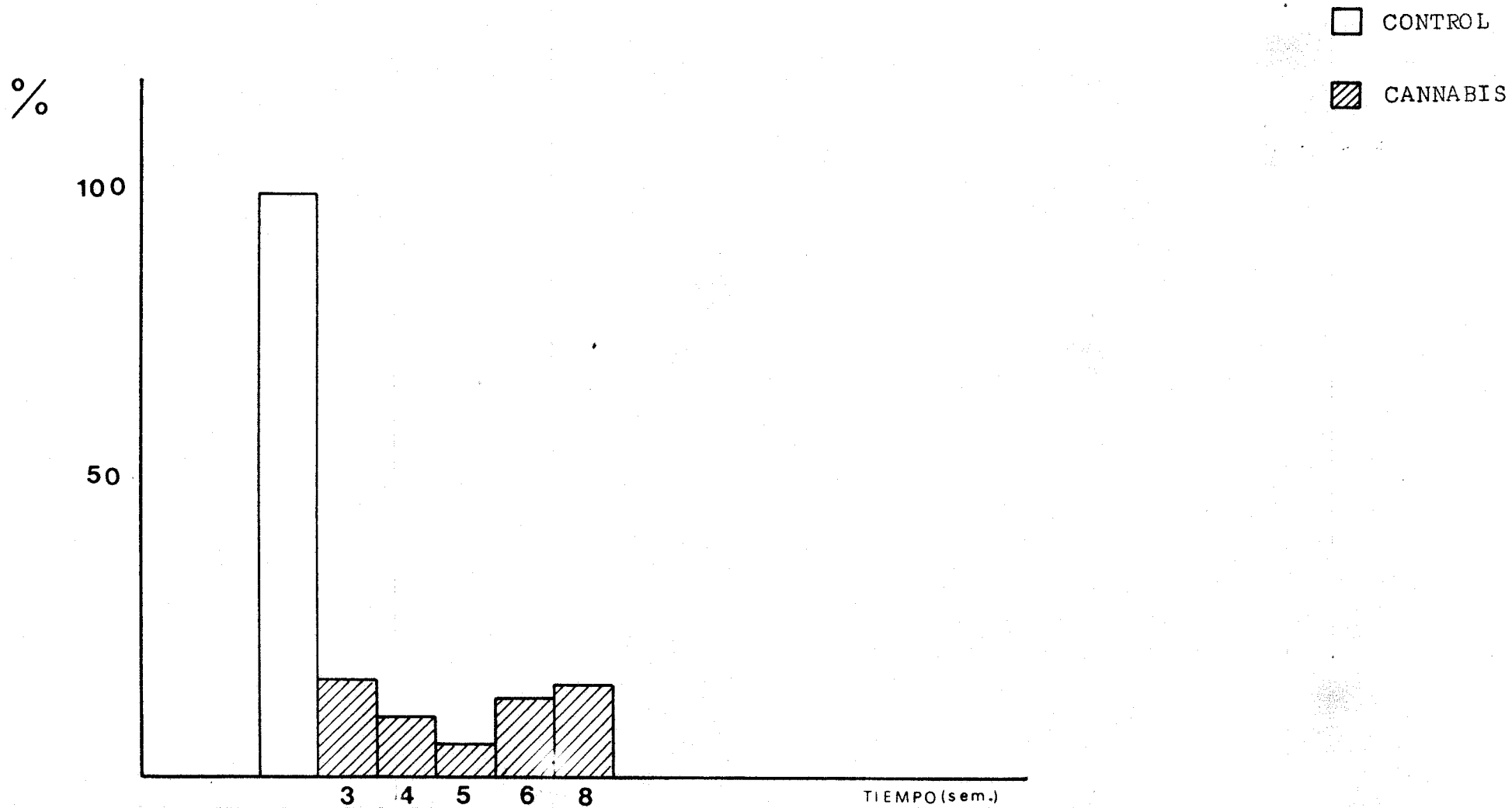
Cont. TABLA 14.-

<u>Experiencia</u>		<u>TPNH</u>		
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>Nº Dosis</u>	<u>Tiempo (*)</u>	<u>(μ mol/mg/min)</u>
7	a	18	6	4,20
	b			4,95
	c			4,54
8	a	24	8	5,75
	b			4,88
	c			5,66

(*) En esta tabla y siguientes, Tiempo, en semanas transcurrido desde el principio del tratamiento al sacrificio/ de los animales.

TABLA 15.- Resumen de los valores medios de la actividad de las oxidasas microsómicas en la f.p.m. de ratas tratadas con cannabis.

<u>TRATAMIENTO</u>			<u>TPNH</u>		<u>% Actividad</u>
<u>Nº</u>	<u>Dosis</u>	<u>Tiempo (sem)</u>	<u>(μ mol/mg/min)</u>		
CONTROL	-	-	34,13	\pm 15,23	100
CRONICO (300 mg/Kg)	9	3	5,61	\pm 1,53	16,43
	12	4	3,53	\pm 0,40	10,34
	15	5	1,96	\pm 0,17	5,74
	18		4,56	\pm 0,30	13,36
	24	8	5,43	\pm 0,39	15,90



VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LAS OXIDASAS MICROSOMICAS TOTALES
EN LA INTOXICACION CRONICA POR CANNABIS (Fig. 3)

TABLA 16.- Actividad de la aril-hidrocarburo-hidro
xilasa en f.p.m. de ratas tratadas con/
cannabis de forma crónica (300 mg/Kg) -
en días alternos.

<u>Experiencia</u>				<u>AHH</u>
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>NºDosis</u>	<u>Tiempo(sem)</u>	<u>(μmol/mg/min)</u>
1	a	9	3	3,99
	b			3,99
	c			4,50
2	a			7,90
	b			7,35
	c			5,52
3	a	12	4	6,26
	b			6,22
	c			6,93
4	a			5,58
	b			6,36
	c			-
5	a			4,96
	b			6,53
	c			5,46

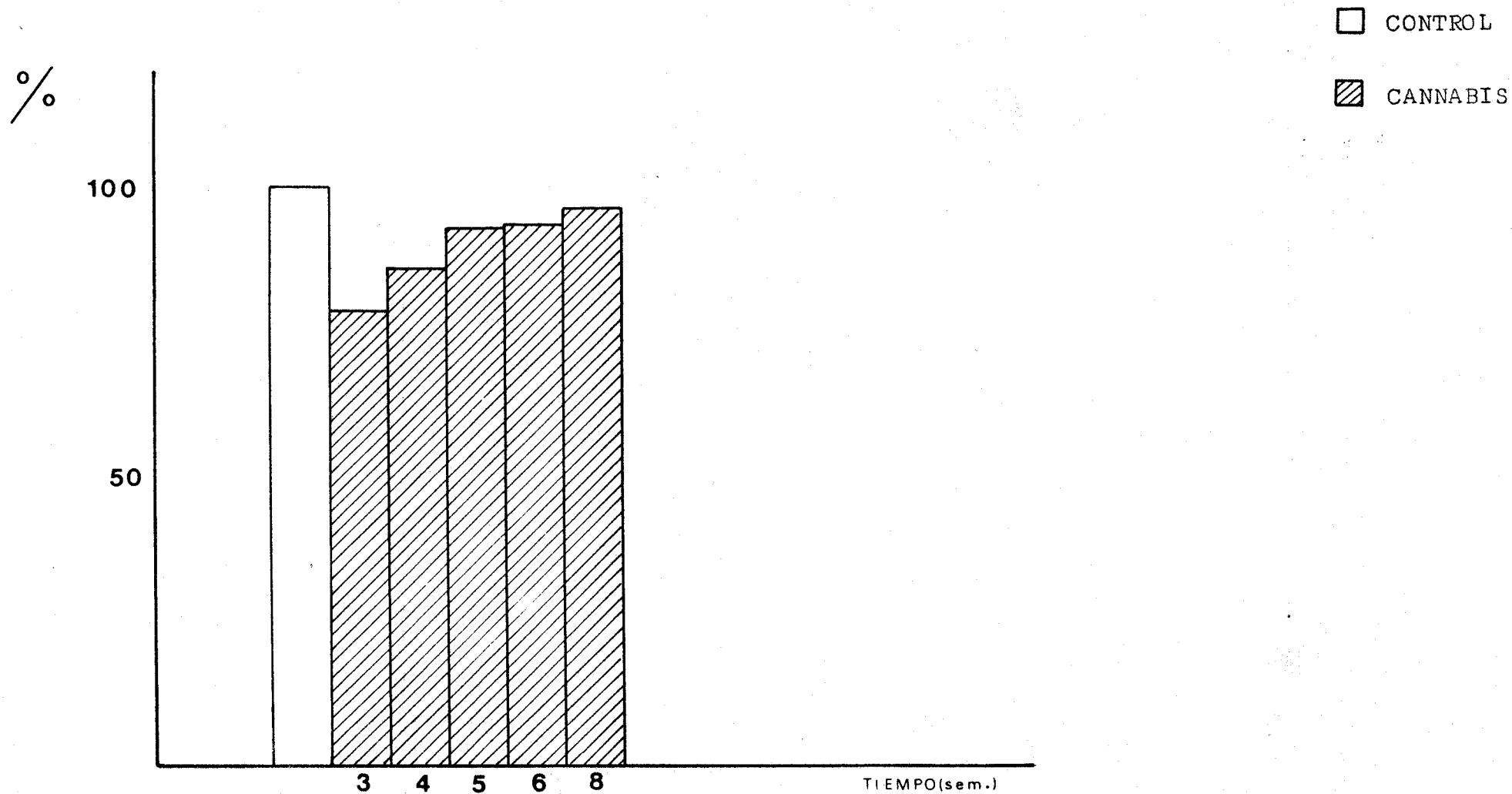
..... sigue

Cont. TABLA 16.

Experiencia					AHH
<u>Nº</u>	<u>Animal</u>	<u>Nº Dosis</u>	<u>Tiempo(sem)</u>	<u>(m</u>	<u>mol/mg/min)</u>
6	a	15	5		-
	b			6,33	
	c			10,99	
7	a				5,71
	b			5,95	
	c			6,51	
8	a				5,61
	b			7,20	
	c			4,02	
9	a	18	6		7,90
	b			5,23	
	c			6,55	
10	a	24	8		8,60
	b			4,96	
	c			6,77	

TABLA 17.- Resumen de los valores medios de la actividad de la aril-hidrocarburo-hidroxilasa en la f.p.m. de ratas tratadas con cannabis.

TRATAMIENTO		AHH	% Actividad
Nº Dosis	Tiempo (sem)	(m μ mol/mg/min)	
CONTROL	-	7,04 \pm 3,37	100
CRONICO (300 mg/Kg)	9	5,54 \pm 1,56	78,69
	12	6,03 \pm 0,60	85,65
	15	6,54 \pm 1,88	92,90
	18	6,56 \pm 1,09	93,18
	24	6,77 \pm 1,48	96,16



VARIACION DE LA ACTIVIDAD DE LA ARIL - HIDROCARBURO - HIDROXILASA
EN LA INTOXICACION CRONICA POR CANNABIS (Fig.4)

DISCUSION

=====

DISCUSION

A lo largo del presente trabajo se ha observado/ que influye de forma significativa la época del año en que se realizan los experimentos (Tabla 7). Al ver la diferencia de resultados que se obtenían según la estación en que se realizaron los experimentos, además del estudio de los niveles enzimáticos en animales control no tratados se añadió a cada lote de animales tratado, uno control.

Es importante resaltar en este tipo de trabajo - con animales que no solamente influyen condiciones endógenas y factores externos (Formeyer, 1.979) como la estacional que hemos analizado, sino que también hemos observado/ que cualquier situación meteorológica anómala aislada, como una tormenta etc. puede afectar los resultados de una experiencia.

No se llevaron a cabo experimentos en la época - de mayor calor debido a la disminución observada en los niveles enzimáticos, tanto oxidasas totales, como aril-hidrocarburo-hidroxilasa. Por ello se prefirió trabajar en primavera e invierno.

La edad de los animales, no influye en las actividades enzimáticas (Tabla 8) dentro de un margen comprendido entre los 3 y 9 meses.

El sexo no parece influir tampoco en los niveles enzimáticos determinados (Tabla 9), pero se prefirió trabajar exclusivamente con animales macho.

El tratamiento agudo con cannabinoides, no parece afectar al cabo de 24 horas las actividades enzimáticas

de las oxidasas microsómicas totales y aril-hidrocarburo-hidroxilasa, lo que tratamos de confirmar con el estudio/ de la evolución de la intoxicación aguda, sacrificando -- los animales a distintos tiempos después de la administración.

En este estudio se vió una inhibición máxima a/ las 12 horas de ambas actividades enzimáticas, apareciendo un 56,27% de inhibición en las oxidasas microsómicas, / dependiente de TPNH, implicadas en la oxidación de compuestos alifáticos, y un 36,94% de inhibición en la aril-hidrocarburo-hidroxilasa, que oxida los compuestos aromáticos.

Ambas actividades enzimáticas se van recuperando a partir de las 12 horas, y se acercan a los niveles / normales a las 24 horas (Tabla 11 y 13).

En el tratamiento crónico, se observa que los - productos cannábicos son fuertes inhibidores de los mecanismos de oxidación en el hígado, y afectan especialmente a las oxidasas microsómicas. Esta actividad queda reducida al 5,74% del control a las 5 semanas, que representa / un 94,26% de inhibición (Tabla 15).

Sin embargo, la aril-hidrocarburo-hidroxilasa - parece menos afectada. Sólo en el tratamiento crónico a - las 3, ó 4 semanas presenta un 15-20% de inhibición (Ta-- bla 17). Cabe pensar que la actividad de esta enzima se - mantiene alta por ser la utilizada por la célula para la/ hidroxilación metabólica de los cannabinoides.

Esto coincide con otros resultados obtenidos en estos laboratorios en los que otra enzima implicada en el proceso de desintoxicación, uridin-difosfo-glucosa deshidrogenasa, aparece muy activada (Repetto y col. 1.981).

Si bien el efecto inhibitor de los cannabinoides sobre los sistemas enzimáticos puede ser consecuencia de la inhibición que sufre la síntesis de macromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas (Nahas y col. 1.976; Nahas, - - 1.978), con el presente trabajo podemos deducir claramente que los cannabinoides actúan de forma bastante específica/ como inhibidores de los sistemas enzimáticos oxidativos.

CONCLUSIONES

=====

CONCLUSIONES

1ª.- Se ha comprobado la importancia de la influencia de la época del año en que se efectúa el estudio y de las alteraciones meteorológicas, en los parámetros metabólicos.

2ª.- Tras la administración de una dosis alta de cannabinoides (600 mg/Kg), se manifiesta a las 12 horas la máxima inhibición enzimática (56,27% en las oxidasas/ totales y 36,94% en la AHH). Ambas actividades enzimáticas están recuperadas a las 24 horas.

3ª.- En el tratamiento crónico (300 mg/Kg/alterno), las oxidasas totales manifiestan fuerte inhibición, -- que es máxima a las 5 semanas (94,26%). La AHH sufre ligera inhibición, que es máxima a las 3 semanas (21,31%).

4ª.- Como conclusión general, puede afirmarse que los cannabinoides son inhibidores específicos de los sistemas enzimáticos oxidativos.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, R. y BAKER, B.R. (1.940).
J. Amer. Chem. Soc. 62, 2208
en: "Marijuana"
Academic Press, 1.973.

- ADAMS, R. (1.942)
Marihuana.
Bull. N. Y. Acad. Med. 18, 705-730.

- AGURELL, S. (1.970).
Chemical and pharmacological studies of cannabis.
en: "Botany and Chemistry of Cannabis".
Proc. Conf. 1.969 (Pub 1.970) 175-91.
Ed. JOYCE and CHURCHILL LONDON.

- BARTOVA, A. y BIRMINGHAM, M.K. (1.976).
Effect of Δ^9 - THC on mitochondrial NADH-oxidase activity.
J. Biol. Chem. 251 (16), 5002-5006.

- BLEVINS, R.D. y REGAN, J.D. (1.976).
Tetrahydrocannabinol: Effect on Macromolecular synthesis in human and other mammalian cells.
en: "Marihuana: Chemistry, Biochemistry and Cellular - Effects".
Ed. G.G. Nahas, Springer-Verlag. Neu York.

- BURSTEIN, S. y KEPFER, D. (1.971).
Hydroxylation of trans- Δ^1 - tetrahydrocannabinol by hepatic microsomal oxygenase.
Ann. N.Y. Acad. Sci.; 191, 61-67.

- CHARI-BITRON, A. y BINO, T.E. (1.970).
Effects of Δ^1 -THC on ATP-ase activity of rat liver mi
tochondria.
Biochem. Pharmacol. 23, 873.

- CHARI-BITRON, A. (1.976).
Effect of Δ^1 -THC on red blood cell membranes and on
alveolar macrophages.
en: "Marihuana:Chemistry, Biochemistry and Cellular -
Effect".
Ed. G.G. Nahas, Springer-Verlag, New York.

- DAVIS, T.W.M.; FARMILO, C.G. y OSADCHUK, M. (1.963).
Identification and origin determinations of cannabis
by gas and paper chromatography.
Anal-Chem; 35, 751-755.

- DEHNEN, W.; TOMINGAS, R. y ROOS, J. (1.973).
A modified Method for the Assay of Benzo (α) pyrene/
Hydroxylase.
Analytical Biochemistry, 53, 373-383.

- DOLBY, T.W. y KLEINSMITH, L.J. (1.974).
Effects of Δ^9 -THC on the levels of AMP_C in mouse brain.
Biochem Pharmacol, 23 (13), 1.817-1.825.

- FERNANDES, M.; WARNIN, N. CHRIST, W. y HILL, R. (1.973)
Interactions of several cannabinoids with the hepatic
drug metabolizing system.
Biochem. Pharmacol, 22 (23) 2.981-2.987

- FLEISCHER, S y KERVINA, M. (1.974).
en: "Methods in Enzymology".
Colowick Kaplan. 31, 6-41,,
Academic Press.

- FORTMEYER, H.P. (1.979).
"El animal de laboratorio estandarizado y su ambiente!"
Simpisium sobre el mantenimiento del animal de labora-
torio.
Barcelona. 1-12.

- FOURNIER, E.; ROSENBERG, E.; HARDY, N. y NAHAS, G. -
(1.976).
Teratologic Effects of Cannabis Extracts in Rabbits:
A Prelimiary Study.
en: "Marihuana: Chemisry, Biochemistry, and Cellular/
Effects".
Ed. G.G. Nahas, Springer-Verlag New York.

- GHOSH, J.J.; MITRA, G.; PODDAR, M.K. y CHATERJEE, D.K.
(1.977).
Effect of Δ^9 -THC administration on hepatic functions.
Biochem. Pharmacol. 1.26 (19), 1.797-1.801.

- GOLLA, G.; NEGRI, G. y CAPPELLETI, C. (1.961).
"Tratado de Botánica".
Editorial Labor, 2ª. ed. S.A. Barcelona.

- HIGHTY, E.G.; FENTIMAN, A.F. jr y FOLTZ, R.L. (1.976).
Long retained metabolites of Δ^9 and Δ^8 tetrahydrocanna-
binols identified as novel fatty acid conjugates.
Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 14(1) 13-28.

- HILLER, A.; PLAZIN, J. y VAN SLYKE, D.D. (1.948).
en: " Métodos seleccionados de análisis clínicos".
2, 126-137, Aguilar, Madrid (1.964).

- HO, B.T.; FRITCHIE, E.G.; KRALIK, P.H.; ENGLERT, -
L.F.; ISAAC, W.M. y INDANPAAN-HEIKKILA, J. (1.970).
Distribution of ^3H - Δ^9 -THC in rat tissues after in-
halation.
J. Pharm. Pharmacol, 22 (7). 538-539.

- JAKUBOVIC, A. y McGEER, P.L. (1.976).
In vitro inhibition of protein and nucleic acid syn-
thesis in rat testicular tissue by cannabinoids.
en: " Marihuana: Chemistry, Biochemistry and Cellular
Effects".
Ed. G.G. Nahas, Springer-Verlag, New York.

- JERNSTRÖM, B., CAPDEVILA, J., JAKOBSSON, S. y ORRENIVS,
S. (1.975).
Solubilization and partial purification of cytochrome/
P-450 from rat lung microsomes.
BBCR, 64 (2), 814.

- JOYCE, C.R.B. y CURRY, S.H. (1.970).
"The Botany and Chemistry of cannabis".
Londres. Churchill.

- KANTER, S.L.; HOLLISTER, L.E., MOORE, F. y GREENE, D.
(1.972).
Cannabinoids in the urine of man after single and sub-
chronic oral doses marihuana.
Int. Pharmaco.Psychiat (Basel) 7 (1-4) 205-213.

- KANTER, S.L.; HOLLISTER, L.E. y MOORE, F. (1.975).
Marihuana metabolites in the urine of man v. characterization and separation of polar metabolites of Δ^9 -THC.
Res. Commun. Chem Path. Pharmacol, 10 (2), 215.

- KEBABIAN, J.W. y GREENGARD, P (1.971).
Dopamine sensitive adenylyl cyclase: possible role in synaptic transmission.
Science, 174, 1.346-1.348.

- KELLEY, J.A. y ARNOLD, K.P. (1.976).
Detection of urinary Cannabis metabolites: a preliminary investigation.
J. For. Sci.; 21 (2), 252.

- KINGSLEY, G.R. (1.942).
en: "Métodos seleccionados de análisis clínicos".
1, 126-137, Aguilar, Madrid (1.968).

- KLAUSNER, H.A. y DINGELL, J.V. (1.970).
Studies on the metabolism and distribution of Δ^9 -THC.
Pharmacologist, 12, 259.

- KLAUSNER, H.A.; WILCOX, H.G. y DINGELL, J.V. (1.975).
The use of zonal ultracentrifugation in the investigation of the binding of Δ^9 -tetrahydrocannabinol by plasma lipoproteins.
Drug Metab. Disposition. 3 (4), 314-319.

- LAURENT, B.; ROY, P.E. y GAILIS, L. (1.974).
Inhibition by Δ^1 -tetrahydrocannabinol of a $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -
transport ATPase from rat ileum.
Canad. Physiol. 52. (6) 1.110-1.113.

- LAURENT, B. y ROY. P.E. (1.975).
Alteration of membrane integrity by Δ^1 -THC.
Int. J. cli. Pharmacol. Biopharm. 12, 1-2, 261-266.

- LEHNINGER, A.L. (1.978).
"Bioquímica".
2ª. Ed. 153, Omega, S.A. Barcelona.

- LEMBERGER, L.; SILBERSTEIN, St. D.; AXELROD, J. y KOPIN,
I.J. (1.970).
Marihuana: Studies on the disposition and metabolism -
of Δ^9 -THC in man.
Science, 170 (3.964) 1.320-1.322.

- LEMBERGER, L., TAMARKIN, N.R.; AXELROD, J. y KOPIN, -
I.J. (1.971).
 Δ^9 -THC Metabolism and disposition in long-term marihua
na Smokers.
Science, 173 (3.991), 72-74.

- LERNER, M. y ZEFFERT, J.T. (1.968).
Determinación of THC isomers in marihuana and hashish.
Bull. Narcot.; 20, nº 2, 53-54.

- LIBET, B. y TOSAKA, T. (1.970).
Dopamine as a synaptic transmitter and modulator ni -
sympathetic ganglios: a different mode of synaptic ac-
tion.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 667-673.

- LITWATCH, G. (1.960).
"Experimental biochemistry".
John Wiley and sons, inc. New York.

- LOWRY, OH.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. y RANDALL, -
R.J. (1.951).
J. Biol. Chem; 193, 265.
en: "Biochemistry Laboratory Techniques".
Yohn Wiley and sous, inc. New York, 1.966.

- LUTHRA, Y, K. y ROSENKRANTZ, H.(1.974).
Cannabinoides: neurochemical aspects after oral chronic
administration to rats.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 27 (1), 158-168.

- MECHOULAM, R. y GAONI, Y. (1.967).
Recent advances in the chemistry of Hashish.
en: " Progress in the chemistry of organic Natural Pro
ducts".
Springer-Verlag. New-York. 25.

- MECHOULAM, R. (1.970).
Marihuana Chemistry.
Science, 168, 1.159-1.166

- MECHOULAM, R. (1.973).
"Marijuana".
Academic Press New York and London.

- MECHOULAM, R. (1.976).
Le Cannabis.
La Recherche, 7, n° 73, 1.018-1.026.

- MIRAS, C.K.; KYRKOU, K.A. y MARKIDOU, S.G. (1.978).
Anomalies chromosomiques chez les gros fumeurs de has-
chisch.
Recherches scientifiques sur le cannabis.
Naciones Unidas, ST/SOA/SER.S/56.

- MITRA, G.; PODDAR, M.K. y GHOSH, J.J. (1.976).
In vivo and in vitro effects of Δ^9 - THC on rat liver/
microsomas durg metabolizing enzymes.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 35 (3), 523-530.

- MORISHIMA, A.; HENRICH, R.T.; SENJOV y NAHAS, G.G. --
(1.976).
Errone of chromosome segregation induced by olivetol a
compound with de st mature of c-ring common to cannabi
noids: Formation of bridges and Multipolar division.
en: "Marihuana Chemistry, Biochemistry and Cellular --
Effects".
Ed. G.G. Nahas, Springer-Verlag.

- NAHAS, G.G.; SUCIU-FOCA, N.; ARMAND, J.P. y MORISHIMA,
A. (1.973).
Marijuana, inhibition de l'immunité et de la replica-
tion cellulaires.
Recherches scientifiques sur le cannabis.
Naciones Unidas, ST/SOA/SER.S/47.

- NAHAS, G.G.; DESOIZE, B.; HSU, JOY y MORISHIMA, A. -
(1.976).
Inhibitory effects of Δ^9 -THC on nucleic acid synthesis
and proteins in cultured lymphocytes.
en: "Marihuana: Chemistry, Biochemistry, and Cellular,-
Effects".
Ed. G.G. Nahas. Springer-Verlag. New York.

- NAHAS, G.G. (1.978).
Symposium sur la Marihuana.
Bull. Stup. 30 (3), 23-32.

- NATHANSON, A.J. y GREENGARD. P. (1.977).
Segundos mensajeros en el cerebro.
Investigación y Ciencia, 2 (13), 82.

- OMURAT, y SATO, R. (1.967).
en: "Methods in Enzymology".
10 Sec. VII, 556. Acad. Press.

- O.M.S.(1.971)
El uso del Cannabis.
Org. Mund. Salud Ser. Inf. Tecn., nº. 478, 1.971.

- ORTEGA, B.G. (1.974).
Cambios enzimáticos inducidos por la Cannabis.
Arch. Invest.Med. 5. (suppl. 1), 195-204.

- OULLET, J.; PALAIC, D.; ALBERT, J.N. y TETREAUULT, L.
(1.973).
Effect of Δ^9 -THC on serotonin, MAO and tryptophan - -

hidroxilase in rat brain.

Rev. Can. Biol., 32, nº 3, 213-217.

- PACE, H. B.; DAVIS, M. y BORGEN, L.A. (1.971).
Teratogenesis and marihuana.
Marihuana:chemistry, pharmacology and patterns of -
social use.
Ann. N. y Acad. sci. 191:123.
- PANEQUE, A. (1.979).
Comunicación personal.
- PELKONEN, O. EERO H. KALTIALA, NIILO T.KÄRKI JALONEN
y KALEVI PYÖRÄLÄ. (1.975).
Properties of Benzpyrene hydroxylase from Human Liver
and comparison with the Rat, Rabbit and Guinea-pig Enzymes.
Xenobiotica, 5, NO.8, 501-509.
- PELT, J.M. (1.971).
"Droque et plantes magiques".
Horizons de France, 1.971.
- PEREZ, V. (1.969).
"Hígado y Drogas".
Ed. Paidós, 34.
- PERSAND, T.V.N. y ELLINGTON, A.C. (1.967).
Cannabis in carly pregnancy.
Lancet, II: 1.306.

- PODDAR, M.K. y GHOSH, J.J. (1.972).
Effect of cannabis extract, Δ^9 - THC and lysergic -
acid on rat liver enzymes.
Biochem. Pharmacol; 21 (24), 3.301-3.303.

- PODDAR, M.K. y GHOSH, (1.972).
Extrait de Cannabis et Δ^9 - THC: effets de leur adminis-
tration sur les enzymes du foie.
Recherches scientifiques sur le Cannabis.
Naciones-Unidas, n° 32.

- PODDAR, M.K. y GHOSH, (1.973).
Cannabidiol: effect sur l'activite enzymatique du foie/
induite par le Δ^9 -THC.
Recherches scientifiques sur le Cannabis.
Naciones Unidas, n° 43.

- PRYOR, G.T.; HUSAIN, S. y MITOMA, CH. (1.976).
Acute and subacute interaction between Δ^9 -tetrahydrocan-
nabinol and other drugs in the rat.
Annals N.Y. Acad. Sci. 281, 171-189.

- REPETTO, M. y MENENDEZ, M. (1.972).
Contribución al estudio de la toxicomanía por cannabis.
Rev. San. Hig. Pub. n° 3.

- REPETTO, M. (1.974).
Interés de los metabolitos del Cannabis.
II Jornadas Toxicológicas Españolas.
Monografías Liade. 37-40.

- REPETTO, M. y MARTINEZ, D. (1.975).
Sin publicar.

- REPETTO, M. y MARTINEZ, D.; LOPEZ ARTIGUEZ, M. y -
REPETTO, J. (1.976).
Memoria de los estudios sobre metabolismo y toxicología
del Cannabis.
Efectuado con la beca de la Presidencia del Gobierno,-
1.974.
Sin publicar.

- REPETTO, M.; SANZ, P, y PASTOR, T. (1.979).
Estudio experimental de la influencia del Cannabis --
sobre cinco parámetros bioquímicos.
III Jornadas Toxicológicas Españolas.
Monografías Liade, 337-341.

- REPETTO, M.; CARRASCO, I.; DOMINGUEZ, C.; GIMENEZ, M.
P.; JURADO, M.C.; LOPEZ-ARTIGUEZ, M.; MARTINEZ, D.;-
MENDOZA, R.; RICO-LARA, M.; RODRIGUEZ-CONSUEGRA, M.A.;
RODRIGUEZ-VICENTE, C.; SANZ, P. y VILLAR, M.P.(1.981).
Toxicología de la drogadicción.
En Prensa.

- REPETTO, M.; SANZ, P. y RODRIGUEZ-VICENTE, C.(1.981).
Aumento del metabolismo de la glucosa por cannabis.
General Pharmacol.
En Prensa.

- ROSENKRANTZ, H. y BRAUDE, M.C. (1.975).
"Comparative chronic toxicities of delta-9-THC.
administered by inhalation or orally in rats.The Pharma
cology of Cannabis".
Eds. M. Braude and S. Szarra. Raven Press New York.

- SANZ, P.; MESA, A. y REPETTO, M. (1.979).
Influencia del Cannabis en la adquisición de la memoria.
III Jornadas Toxicológicas Españolas.
Monografías Liade. 327-336.

- SCHWARTZ, A.; LINDENMAYER, E. y ALLEN, J.C. (1.975).
The Na⁺ - K⁺ - ATPase: Pharmacological, Physiological and Biochemical aspects.
Pharmacol. Rev., 27, 3

- STRASBURGE, E.; NOLL, F y SCHIMPER, A. F.W. (1.968).
"Tratado de Botánica".
5ª. Ed., Marin, S.A. Barcelona.

- SIEMENS, A.J. y KALANT, H. (1.975).
Metabolism of Δ^1 -Tetrahydrocannabinol by the rat in vivo and in vitro.
Biochem. Pharmacol. 24. (7), 755-762.

- VERDEJO, G. (1.973).
CANNABIS SATIVA."Estudio Botánico, Químico, Farmacológico, Toxicológico Sociológico y Legal".
Archivos del Instituto de Aclimatación. 23, 5-137. Al
merial.

- WARBURG, O. y CHRISTIAN, W. (1.941).
Biochem. Z; 310, 384.

en: "Biochemistry Laboratory Techniques".
Yohn Wiley and sous, inc. New York, 1.966.

- WIDMAN, N, NORDQUIST, M. y AGURELL, S (1.974).
Biliary excretion of Δ^A -tetrahydrocannabinol and its
metabolites in the rat.
Biochem. Pharmacol. 23. (7), 1.163-1.172.

- WOOD, T.B.; SPIVEY, W.T.N. y EASTERFIELD, T.H.(1.896).
J. Chem. Soc. 69, 539.

en: "Marijuana".
Academic Press. New York and London, 1.973

- ZIMMERMAN, A.M. y ZIMMERMAN, S.B. (1.976).
The influence of marijuana on eukaryote cell growth -
and development.

en: "Marihuana: Chemistry, Biochemistry and Cellular -
Effects"
Ed. G.G. Nahas, Springer-Verlag, New York.