

R. 8256

T-432

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Presentado en

la Facultad de Farmacia desde el día

de

Sevilla de

de 19

del DIRECTOR DE

# MECANISMO DE ACCION DEL CANNABIS SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE LA GLUCOSA EN RATA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA

Trabajo presentado en el curso de Farmacología  
el día 493 de mayo 65 del libro  
de Farmacología de la Universidad de Sevilla  
Sevilla,

El día del mes de 1965.

*Olivia Laffitte*

M<sup>ra</sup> del Carmen Rodríguez Vicente

Sevilla, 1990

UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

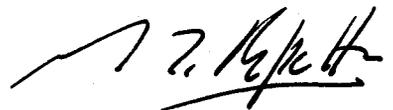
Area de Toxicologia

VºBº  
EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO



Fdo.: Dr. A. Machado

VºBº  
EL DIRECTOR



Fdo.: Dr. M. Repetto

UNIVERSIDAD DE SEVILLA - FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

MECANISMO DE ACCION DEL CANNABIS SOBRE  
EL METABOLISMO HEPATICO DE LA GLUCOSA EN RATA

*Memoria presentada por  
M<sup>º</sup> del Carmen Rodríguez  
Vicente para optar al  
grado de Doctora en  
Farmacia.*

*Sevilla, Enero de 1.990*

# Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología

ACULTAD DE FARMACIA

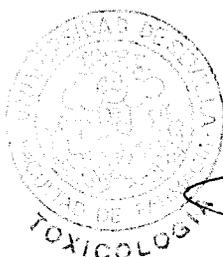
. Prof. García González, s/n.

012-SEVILLA

Don Alberto Machado de la Quintana, Director del Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología. Universidad de Sevilla.

La Memoria titulada "Mecanismo de Acción del Cannabis sobre el Metabolismo Hepático de la Glucosa en Rata" correspondiente a los trabajos de Tesis Doctoral realizados por Doña María del Carmen Rodríguez Vicente, efectuada bajo la dirección del Dr. Manuel Repetto Jimenez, Profesor de este Departamento, reúne los requisitos necesarios, por lo que doy mi conformidad para su presentación.

En Sevilla, a 27 de Junio de 1989.



A handwritten signature in black ink, appearing to read "A. Machado de la Quintana". The signature is written in a cursive style and is positioned to the right of the circular stamp.

Sr. Presidente de la Comisión de Doctorado.

Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología

CULTAD DE FARMACIA

Prof. García González, s/n.

12-SEVILLA

DON MANUEL REPETTO JIMENEZ, PROFESOR ASOCIADO DE TOXICOLOGIA DEL -  
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA FA--  
CULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA., Y DOÑA PILAR SANZ  
NICOLAS, DOCTORA EN CIENCIAS BIOLOGICAS, JEFE DE LA SECCION DE BIO  
LOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE TOXICOLOIGA, DE SEVILLA,

CERTIFICAN: Que la presente Tesis Doctoral, titulada: "MECANISMO DE  
ACCION DEL CANNABIS SOBRE EL METABOLISMO HEPATICO DE LA GLUCOSA EN  
RATA", que presenta la Lda. M<sup>a</sup> del Carmen Rodríguez Vicente, ha sido  
realizada en este Departamento bajo nuestra dirección, y aprovechan-  
do instalaciones e instrumentos del Instituto Nacional de Toxicolo--  
gía, de Sevilla. A nuestro juicio, reúne todos los requisitos exigidos  
por la normativa vigente para la elaboración y presentación de  
memorias de tesis doctorales, y ser defendida ante Tribunal.

Y para que conste, firmamos la presente certificación en -  
Sevilla, a diecinueve de Junio de mil novecientos ochenta y nueve.



M. Repetto P. Sanz

## AGRADECIMIENTOS:

Ninguna investigación es obra exclusiva de una persona, y la mía sí merece tal nombre, no podría ser una excepción: ello es claro, sobre todo, para quien no presenta la tesis al principio de su carrera, sino tras algún tiempo de quehacer profesional. Tanto más grato resulta por ello, empezar recordando aquí a cuantos me han dedicado atención y saber.

Y en primer lugar al Doctor D. Manuel Repetto, Director del Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla, que ha dirigido esta tesis y me animó a dar forma a los diez años que he pasado trabajando sobre el Cannabis, en una línea de investigación coincidente con la originaria del citado Instituto.

Tengo, asimismo, que agradecer su constante estímulo y continua ayuda a la Doctora Dña. Pilar Sanz, Jefa de la Sección de Biología del Instituto, auténtica co-directora de mi tesis; así como a la Doctora Dña. M<sup>a</sup> Angeles Rodríguez Consuegra, Jefa de la Sección de Histología, que ha contribuido especialmente a las determinaciones histológicas que aparecen en mi trabajo.

Ha sido una suerte poder beneficiarme de las orientaciones y la competencia profesional de los tres.

Dña. Amalia Muñoz ha mecanografiado un manuscrito no siempre sencillo con particular esmero y pulcritud; Dña. Josefa Valenzuela ha supuesto una tenaz ayuda a lo largo de la realización de la tesis; y Dña. M<sup>a</sup> Angeles Correa ha colaborado en la realización de gráficas y dibujos con su buen hacer.

Debo a Dña. Inmaculada Flores y Dña. Ana M<sup>a</sup> Eguino los programas informáticos mediante los cuales he obtenido los datos estadísticos utilizados.

Finalmente, sería injusto no mencionar el apoyo que me han manifestado todos los miembros del Instituto, así como silenciar el hecho de que, sin la comprensión, sacrificio y ayuda de toda mi familia, muy en especial de Juan Antonio, de María y Carmen, no habría podido, sencillamente, alcanzar nunca a ver el final del trabajo.

Gracias a todos.

## ABREVIATURAS UTILIZADAS EN LA PRESENTE MEMORIA

- AChE: Acetil colinesterasa
- ALDOLASA: Fructosa-1,6-difosfo aldolasa
- AMP, ADP, ATP: 5'-Mono, di y tri-fosfato de adenosina
- ADN: Acido desoxirribonucléico
- ARN: Acido ribonucléico
- CBD: Cannabidiol
- CBN: Cannabinol
- D.O.: Densidad óptica
- E.C. (seguido de núms.): Comisión de enzimas; los números indican la clasificación de la enzima.
- EDTA: Acido etilendiaminotetraacético
- F-1,6-di-P: Fructosa-1,6-difosfato
- F-6-P: Fructosa-6-fosfato
- GDM-TIM: Glicerín-3-fosfato-deshidrogenasa triosafosfato-isomerasa
- G-1-P: Glucosa-1-fosfato
- G-6-P: Glucosa-6-fosfato
- G-6-Pasa: Glucosa-6-fosfatasa
- G-6-P DH: Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- GLPs: Good Laboratory Practices  
(Prácticas Correctas de Laboratorios)



- THC: Tetrahidrocannabinol
- $\Delta^9$ THC: Posición del doble enlace de los distintos isómeros del tetrahidrocannabinol.
- THC-COOH: Acido tetrahidrocannabinólico
- Tris: Tris (hidroximetil) aminometano
- UMP, UDP, UTP: Mono-di y tri-fosfato de uridina
- UDPG: Uridin-difosfo-glucosa
- UDPGA: Acido uridin-difosfo-glucurónico
- UPPG-DH: Uridin-difosfo-glucosa-deshidrogenasa

**A JUAN ANTONIO**

# INDICE

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
-------------------	---

### ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

- ANTECEDENTES HISTORICOS.....	6
- BOTANICA.....	8
- QUIMICA.....	17
- TOXICOCINETICA.....	22
- TOXICODINAMICA.....	30
- POTENCIAL APLIACION TERAPEUTICA.....	44

### PARTE EXPERIMENTAL

#### - PLAN DE TRABAJO

- Hipótesis de Trabajo.....	45
- Plan de Trabajo.....	47

#### - MATERIAL Y METODOS

##### - Material

1.- Animales.....	49
2.- Productos utilizados en los tratamientos.....	52
3.- Reactivos.....	53
4.- Aparatos utilizados.....	54

##### - Métodos

1.- Modelo Animal.....	55
2.- Sacrificio de los animales y preparación de los tejidos.....	56
3.- Métodos Analíticos.....	57
3.1.- Determinación de amoníaco en sangre.....	57
3.2.- Determinación de glucógeno en hígado.....	58
3.3.- Determinación de glucosa.....	59
3.4.- Determinación de fosfofructoquinasa.....	60
3.5.- Determinación de glutamina sintetasa.....	62
3.6.- Determinación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	64

3.7.- Determinación de uridindifosfoglucosa deshidrogenasa.....	65
3.8.- Determinación de proteínas.....	66
3.9.- Determinación de fosforilasa.....	67
3.10.- Determinación de insulina.....	69
4.- Métodos estadísticos	
4.1.- Estadística básica.....	70
4.2.- Comparación de medias de cada parámetro entre animales control y cada tiempo de sacrificio de cada uno de los tratamientos.....	70
4.3.- Comparación de medias de cada parámetro dentro de un mismo tratamiento para ver la influencia del tiempo de sacrificio.....	70
4.4.- Comparación de medias entre tratamientos para cada parámetro y tiempo de sacrificio.....	70
- RESULTADOS.....	72
<b>DISCUSION.....</b>	<b>162</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>173</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>174</b>

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

La resina de cannabis es una mezcla muy compleja de productos procedentes de la planta Cannabis sativa L. Se han llegado a identificar 421 componentes, lo que dificulta la investigación y la interpretación de los resultados (Turner, 1.980).

Es el tóxico tradicionalmente más utilizado en la drogadicción junto con el tabaco y el alcohol, aunque en la actualidad ha aumentado de forma muy considerable el consumo de otras drogas de adicción más tóxicas como son la heroína y la cocaína.

Se encuentra sujeta a las legislaciones sobre estupefacientes y sobre sustancias psicotrópicas. En cuanto estupefaciente está contemplada en el Convenio Unico Internacional de 1.961, recogido en la Ley 17/1.967, enmendado por el Protocolo de 1.972, publicado en el B.O.E. de 4 de noviembre de 1.981. La Orden del Ministerio de la Gobernación de 31 de julio de 1.967 (B.O.E. de 17 de agosto de 1.967), que publicaba las Listas del citado Convenio incluía al Cannabis y su resina, extractos y tinturas en la Lista I, correspondiente a los estupefacientes propiamente dichos sometidos a rigurosas medidas de control, y en la Lista IV que abarca a las sustancias cuya producción, fabricación, comercio y posesión está prohibida. Como sustancia psicotrópica está regulada por el Convenio de Viena de 1.971, ratificada por España en 1.973 y publicada en el B.O.E. de 10 de septiembre de 1.976 en cuya Lista I del Anexo I (B.O.E. 13 de abril de 1.976), se prohíbe el uso, fabricación, comercio y tenencia de todos los isómeros del tetrahidrocannabinol, entre otros psicotropos.

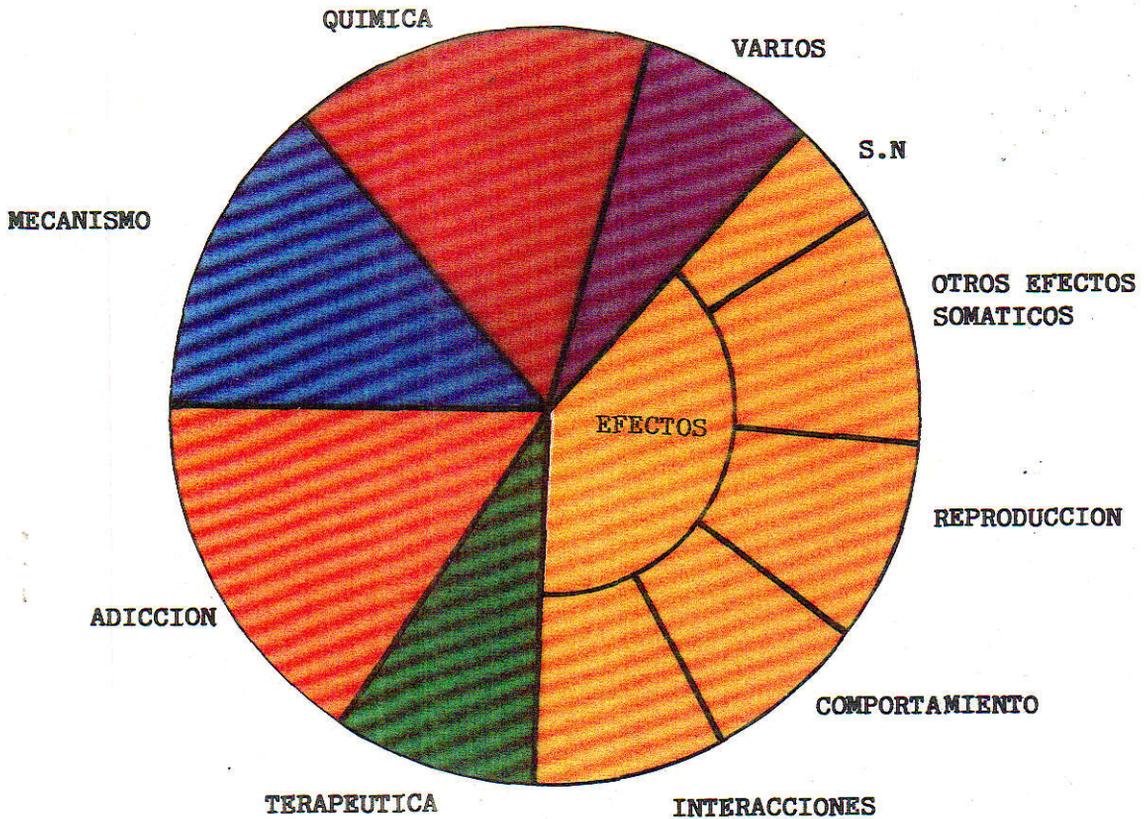
El Consejo Económico y Social de las Naciones Unidas, en su Resolución 1984/22 sobre el problema del cannabis, aprobada a instancias de la Comisión de Estupefacientes, recomendó a todos los gobiernos que combatesen el uso indebido, el tráfico ilícito y el cultivo de la planta. En esa misma resolución el Consejo recomendó que se prosiguiese e intensificase la investigación de los efectos a largo plazo que puede producir su consumo.

Profundizar en el conocimiento de la Toxicología de los productos cannábicos no solo puede contribuir a mejorar las técnicas del tratamiento clínico de la adicción, sino también a clarificar criterios en relación con las medidas legislativas y administrativas para la prevención y control, así como a proporcionar una correcta información y apoyo a los programas educativos destinados a jóvenes en edades en las cuales la droga sea "un atractivo".

Los estudios sobre el cannabis han sido muchos y muy profundos, sobre todo desde finales de los años 70.

En la Figura 1 se muestra un diagrama en el que se reflejan los porcentajes de las publicaciones dedicadas a los distintos temas de interés, elaborado a partir de la revisión bibliográfica realizada por nosotros con motivo de esta memoria.

Fig. 1.- Distribución porcentual de los principales temas de interés en las publicaciones sobre el cannabis, de un total de 1976 citas bibliográficas consultadas que abarcan un período de 16 años (1973 a 1989).



**NOTAS.-**

- Otros efectos somáticos: en muchos de ellos está implicado el sistema nervioso.
- Adicción: incluye legislación, aspectos socio-culturales y programas educativos.
- Química: incluye toxicocinética y análisis químico.
- Mecanismo: se refiere a mecanismos de acción molecular, enzimáticos, hormonales y otros.
- Varios: incluye revisiones, generalidades y botánica.

Como se observa en la figura la mayor proporción de publicaciones se refiere a los efectos (38.72%), dentro de los que destacan los referentes a los efectos somáticos (14.22%). De éstos el 4.45% corresponde exclusivamente al sistema nervioso, que también está considerado en el grupo de otros efectos somáticos. Les siguen en frecuencia los trabajos dedicados a toxicidad sobre la reproducción (actividad sexual y descendencia), y sobre el comportamiento, así como a las interacciones con anestésicos, otras drogas de adicción y de los distintos cannabinoides entre sí. Otros focos de interés son los problemas derivados de la adicción, tanto respecto al drogadicto en sí como a las repercusiones sociales, legislativas y educativas.

En todo el período considerado en la revisión destaca el constante interés en el análisis y determinación de los productos cannábicos en la droga procedente de distintas áreas geográficas, así como el de las sustancias activas y sus metabolitos en sangre y orina de consumidores. En este sentido se observa un esfuerzo continuado en la aplicación a este problema de las más modernas técnicas instrumentales de análisis químico disponible en cada momento.

Debe señalarse que un significativo porcentaje de publicaciones (8.95%) se ocupa de posibles aplicaciones de los cannabinoides con fines terapéuticos, especialmente como antieméticos.

Por último, es importante llamar la atención sobre el hecho de que, aunque se ha realizado un esfuerzo considerable por aclarar el mecanismo molecular de acción (13.51% de las publicaciones), éste se halla todavía sin resolver. Sigue siendo, por tanto, de enorme interés el proseguir ahondando en los mecanismos de acción profunda de los cannabinoides y de la fracción no psicoactiva, tanto desde el punto de vista del conocimiento científico como con la intención de potenciar sus efectos beneficiosos y contrarrestar los tóxicos, con vista a una perseguida aplicación terapéutica.

Con estos objetivos, hemos dirigido nuestro esfuerzo, desde hace años, al estudio de alteraciones bioquímicas producidas en animales de experimentación en intoxicación aguda y crónica, interesándonos tanto

por los mecanismos de detoxificación como por otras vías metabólicas en hígado y cerebro.

En este trabajo hemos estudiado las variaciones que en el metabolismo hepático de la glucosa se pueden producir por administraciones únicas de cannabis, tanto en forma de resina como de tetrahidrocannabinol puro.

## ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

## **ANTECEDENTES HISTORICOS**

## ANTECEDENTES HISTORICOS

La planta del Cannabis es oriunda del área geográfica comprendida entre los mares Caspio y Negro, de ahí pasó a Persia y a la India, cultivándose en el Extremo Oriente desde la más remota antigüedad (Bouquet, 1.950).

Aunque se han encontrado restos de cáñamo en urnas funerarias de la prehistoria parece ser que su conocimiento y uso como fibra textil y como planta medicinal data de 5.000 a 4.000 años a.C., según algunos autores y según Font Quer (1.973) de 8 siglos a.C. Otras informaciones dicen que se encontraba en el herbario del Emperador Chino Nung en el año 2.737 a.C. (Winek, 1.977).

La referencia médica más antigua aparece en el libro de Dioscórides (años 80 d.C.) donde se la menciona como planta afrodisíaca. También Galeno habla de ella y de su uso terapéutico.

Existen documentos históricos en los que se prueba que en el siglo XI Hassan Ibn Sabah formó un poderoso ejército que le obedecía ciegamente porque embriagaba a los hombres con hachís y así consiguió dominar Siria y Persia (Maccagno, 1.975).

Al parecer se utilizó de forma abusiva en la Edad Media y hubo que frenar su consumo con leyes muy severas.

En España cuentan algunos historiadores que la usaban los moros para soportar los tormentos a que los sometía la Inquisición.

Ramazzini, médico del siglo XVIII estudió sus efectos tóxicos, pero las primeras investigaciones científicas se deben a O'schenghnessy que llevó a cabo estudios farmacológicos con la planta (Maccagno, 1.975).

Moreau de Tours en su libro "El hashich y la alienación mental" (1.845) describe los efectos tóxicos y alucinatorios y llama la atención sobre el peligro de su uso por producir deterioro individual y social y provocar dependencia.

El primer producto cannábico aislado por Wood y col. en 1.896 fué el cannabinol, (como veremos más adelante) y en 1.903 Frankel lo purifica.

A partir de aquí comienzan los estudios experimentales de esta droga. (Maccagno, 1.975).

El consumo de la planta en sus diferentes preparados, que consideraremos más adelante, y sus derivados se conocía en India y China desde antiguo y se extendió por Oriente Medio y Africa traído por mercaderes musulmanes, llegando a ser para ellos como el alcohol para la cultura cristiana.

El "cannabismo" permaneció circunscrito dentro de los límites del ambiente bohemio-artístico hasta la década de los 50 para difundirse en los años 60 por toda Europa y América y en todas las clases sociales. Esto estimuló un interés, aún vigente, de sociólogos, gobernantes, sanitarios y científicos, en el estudio de diferentes aspectos de esta drogadicción.

**BOTANICA**

## BOTANICA

### Sistemática

Cannabis sativa L. es una planta dióica perteneciente a la clase de las Dicotiledoneas, orden 4º, Urticales, familia Cannabinaceas (Strasburger y col., 1.960; Gola y col., 1.965).

Pertenecen al mismo orden las familias Ulmaceas (olmo, almez), Moráceas (morera, higuera) y Urticáceas (ortiga) y presentan tanta semejanza con las Cannabináceas que algunos autores (Gola y col., 1.965) opinan que se podían reunir en una familia única. Emberger (1.960) en su tratado de Botánica Sistemática clasifica a las Cannabináceas como tribu dentro de la familia Moráceas.

La familia Cannabinaceas está formada sólo por dos géneros, ambos con interés farmacológico, que son: Humulus cuya especie más representativa es H. lupulus, planta aromática utilizada en la fabricación de la cerveza y con propiedades antibióticas y Cannabis.

El género Cannabis está constituido por una única especie botánica, C. sativa, clasificada por Linneo en 1.753 basándose en ejemplares procedentes de la India, con diversas formas encontradas que aunque descritas con nombres distintos (Cannabis índica, mexicana, americana... etc.) (Emboden, 1.972) no son más que variedades debidas a condiciones climáticas, regionales y al cultivo con distintos fines. Así la frondosidad, tamaño, características morfológicas, producción de fibras, aceites o resinas... etc. son tan variadas que la clasificación botánica es muy difícil y objeto de polémica.

En el "Manual de Materia Médica y Terapéutica" (Farre, 1.866) aparece C. indica definida como "extremo floral de la planta femenina seca a la que no se ha extraído la resina" pero no como especie botánica distinta de C. sativa.

Los botánicos de habla inglesa tienden a considerar una sola especie con tres variedades productoras de fibra, de aceite y de droga respectivamente (Dewey, 1.914).

Janischeuski describe en 1.924 una especie nueva en el cáñamo silvestre que crece en el sureste de Rusia, C. ruderalis. Se diferencia en el fruto, que es más pequeño, ovoide, duro, con perianto moteado y persistente, pero una vez maduro el aquenio está incluido en el perianto y se desprende con rapidéz. Sin embargo, él mismo no considera definitivas sus conclusiones llegando a proponer una nomenclatura alternativa C. sativa var. ruderalis (Small y col., 1.975 a, b).

Actualmente y como consecuencia de las implicaciones legales a las que se encuentra sometida esta planta han surgido dos posturas muy distintas (Small, 1.976). Algunos botánicos defienden la existencia de tres especies: C. sativa, C. indica y C. ruderalis, o dos, considerando las dos primeras como C. sativa o C. sativa y C. ruderalis como única y C. indica como especie diferente. Así Schultes, del Havard Botanical Museum publica en 1.970 un trabajo defendiendo una especie única y en 1.974 presenta una nueva revisión en la que concluye esta vez la existencia de tres distintas.

Después de los trabajos de los botánicos Forskall, Delille, Figari, Christiason, Baillon y otros, se admite una especie única de C. sativa, si bien la Sociedad de Naciones, acepta tres variedades (Documento 1.542 R. pág. 2) (Verdejo, 1.973): a) variedad vulgaris, b) variedad indica y c) variedad sinensis.

Para establecer estas distintas variedades, se han basado los botánicos en diferencias morfológicas, pero hay que tener presente que las características de esta planta varían mucho por el cultivo o por influencia del medio ambiente.

Small (1.975 a) realiza un estudio estadístico, para lo cual cultiva 2.500 plantas en las mismas condiciones (en campo abierto en Ottawa, Canadá) procedentes de 350 semillas de todo el mundo. Estudia 47 características de estas plantas y las clasifica en tres grupos según la producción de droga, a saber: tóxicas, semitóxicas y no tóxicas.

Así las plantas que producen mayor cantidad de resina y sin embargo una fibra de muy mala calidad son las procedentes de países meridionales (Africa, Asia y Centroamérica) donde se cultiva con fines de drogadicción. Por el contrario en los ejemplares que proceden de

regiones septentrionales, la producción de resina es mucho más escasa y la segrega el pie femenino casi de forma exclusiva. La distinción clara de estos grupos sólo ocurre en condiciones de cultivo ideales, pero cuando la planta crece en estado salvaje se da un mayor número de variedades intermedias.

Las observaciones de Small en su experimentación están de acuerdo con otros autores (Verdejo, 1.973; Luchi y col., 1.979; Baker y col. 1.983) que opinan que la secreción de resina es un mecanismo de defensa de la planta contra condiciones ambientales adversas (altas temperaturas y falta de humedad) lo que explica su mayor contenido en las plantas procedentes de climas meridionales. Cuando crece con agua abundante y temperatura moderada, no es necesaria la resina como protección frente a la desecación, las plantas crecen más y son más aprovechables por su fibra. Entre estos casos extremos existen multitud de formas intermedias, productoras tanto de fibra como de resina de diferentes calidades. Por otra parte, plantas claramente establecidas como productoras de resina o fibra de buena calidad, cultivadas en condiciones ambientales distintas de las originales al cabo de unas generaciones cambian sus características a las correspondientes al nuevo clima.

Por último, sabemos que la condición biológica indispensable para establecer que dos poblaciones pertenecen a especies distintas es que no sea posible la hibridación. En el caso de C. sativa esto es siempre posible (Small, 1.972) por lo que parece poco riguroso proponer la existencia de especies distintas basándose en diferencias morfológicas, incluso bioquímicas por muy acusadas que estas sean.

### Descripción botánica

C. sativa, de nombre vulgar cáñamo, es una planta herbácea anual que presenta un tallo erguido, recto y rígido con sección transversal cilíndrica, raíz pivotante, de aspecto áspero, color verde oscuro y con ramas cortas y frágiles.

Las hojas se diferencian según su ubicación, las inferiores, que ocupan prácticamente la totalidad del tallo, son opuestas, palmeadas,

presentando de 5-7 foliolos lanceolados y a veces 9-11, de bordes aserrados y enteros en los extremos. Poseen peciolo muy largo con una estípula rectiforme en la base.

En la parte superior del tallo, en las proximidades de las inflorescencias, las hojas que aparecen son alternadas o aisladas y de morfología diferente. No presentan peciolo y pueden ser simples y poseer dos o tres segmentos (disectas, trisectas). Sus bordes son también dentados pero no se desarrollan tanto como las inferiores.

Es una planta dióica, siendo el pie femenino más fuerte y frondoso que el masculino que es pequeño, delgado y se marchita rápidamente después de la floración (Strasburger, 1.960; Quimby, 1.974). (Fig. 2).

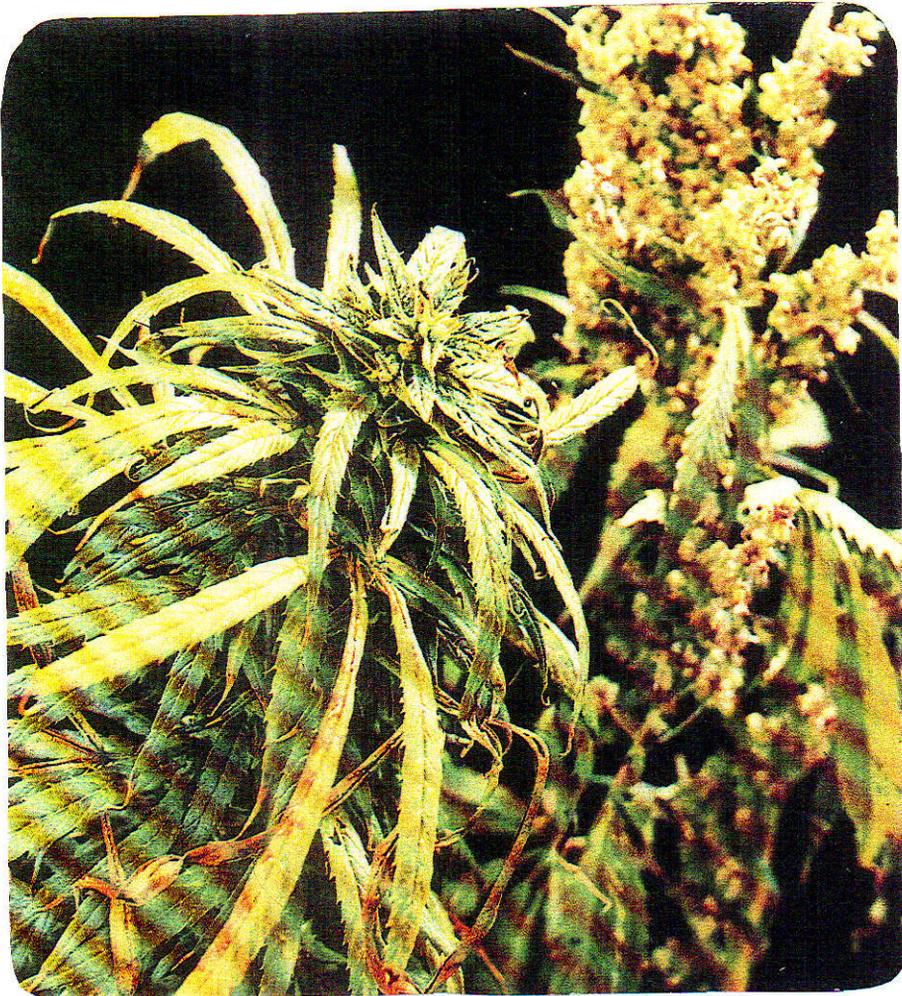


Fig. 2

Las flores masculinas (Fig. 3) se agrupan en racimos, son más pequeñas que las femeninas, de color amarillo verdoso. El cáliz lo forman cinco sépalos que rodean a cinco estambres, episépalos, en disposición opuesta, con grandes anteras colgantes. En el centro del androceo, se observa en ocasiones un ovario rudimentario que en determinadas condiciones, temperatura baja y poca iluminación, se puede desarrollar y dar lugar a pies hermafroditas (Shaffner, 1.923).

Las flores femeninas (Fig. 4) forman racimos muy contraídos de cimas interpuestas con brácteas foliáceas. El perianto de las flores femeninas forma un cono por cuyo extremo asoman dos estigmas largos de color rosado rojizo. El cáliz es urseolado, ovario súpero sentado, bicarpelar y unilocular que contiene un óvulo campilotropo el cual da lugar en la madurez a un aquenio blando globular, grisáceo, rodeado por una bráctea muy rica en glándulas secretoras de resina. La fecundación es por chalazogamia.

Las semillas pobres en albumen, con cotiledones carnosos anchos y gruesos, son ricas en lípidos y aleurona.

El fruto, cañamón, (Fig. 5) es un aquenio seco, redondo, comprimido, formado por dos mitades hemisféricas, de olor aromático y sabor ardiente. Los cañamones se han utilizado como alimento de aves. Por su contenido en aceite se aprovecha para la fabricación de jabones, pinturas y barnices. Una vez extraído el aceite, el fruto se puede utilizar como fertilizante y como cebo para peces (Verdejo, 1.973).

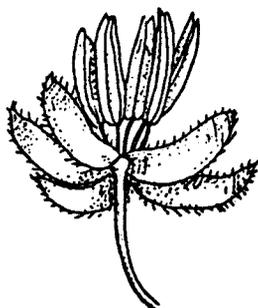


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5

En sus células epidérmicas se observan pelos cistolíticos con depósitos de carbonato cálcico y en la inferior pelos tectores unicelulares muy comprimidos, y ambos curvados hacia la dirección del ápice de la hoja. Los haces liberianos forman cordones de 1 ó 2 metros de largo de gran interés como fibra textil. Con este fin se cultiva en España, principalmente en Alicante.

Otro fin de su cultivo es obtener la sustancia psicoactiva de la resina. Esta es segregada por los pelos glandulares que se encuentran en toda la parte vegetativa, tanto en el pie femenino como en el masculino (Agurell, 1.970); Maurisse (1.891) en su tesis "Le Hachich" observó órganos secretores internos.

El número de pelos y su grosor aumenta a medida que crece la planta; están dispuestos principalmente en las hojas superiores y en las sumidades floridas. La resina por tanto, la segrega tanto el pie masculino como el femenino, aunque proporcionalmente el femenino segrega más al ser más frondoso. También, dado que la planta masculina se seca inmediatamente después de la floración, se explica la falsa creencia de que sólo el pie femenino segrega resina (Agurell, 1.970).

Para identificar una planta de Cannabis y poder distinguir sus distintas variedades, se necesita un ejemplar entero y fresco y contar con taxonomistas expertos (McBay, 1.977).

La identificación histológica y/o histoquímica a partir de restos no completos o de planta seca triturada se basa en la observación al microscopio del polvo e identificación de los cistolitos y de los depósitos de carbonato cálcico en la base de éstos. También puede hacerse un estudio de los pelos glandulares que forman dos tipos de tricomas: testores y glandulares pluricelulares. Además se observan fragmentos de estigmas, células epidérmicas, restos de brácteas... etc. (Furr y Mahlberg, 1.981).

Sin embargo, con un estudio histológico, aunque se hayan observado todos los elementos típicos no podemos llegar a ninguna afirmación rotunda ya que otras plantas los pueden poseer (Nakamura, 1.969). Por ello, es necesario un estudio químico para identificar y cuantificar los principios activos y poder establecer diferencias entre las distintas

variedades, teniendo en cuenta que el contenido en resina depende del clima y de otros factores ecológicos al igual que de la forma de recolección y almacenamiento (Davis y col., 1.963; Lerner y Zeffert, 1.968; Joyce y Curry, 1.970; Repetto y Menéndez, 1.972; Luchi, 1.979).

Dentro de las características consideradas por Small (1.975 a) en el estudio citado anteriormente, valora el contenido en  $\Delta^9$  y  $\Delta^8$  tetrahidrocannabinol, cannabidiol y cannabinol por cromatografía gaseosa relacionándolo con el origen geográfico de la semilla, confirmado recientemente por otros autores (Avico y col., 1.985; Cortis y col., 1.985; Felby y Nielsen, 1.985 y Taylor y col., 1.985). Llega a la conclusión de que en las regiones situadas al norte del paralelo 30º de latitud norte, los pies femeninos producen más resina, esta resina es pobre en tetrahidrocannabinol y predomina el cannabidiol. Las originarias de regiones del sur de ese paralelo producen mayor cantidad de resina, de la misma calidad la de los pies femeninos que la de los masculinos; es muy rica en tetrahidrocannabinol y menor su contenido en cannabidiol, sin llegar a florecer en las condiciones del experimento realizado en Ottawa.

Además de las diferencias cuantitativas en cuanto a la composición de los cannabinoides según el origen geográfico, se da un perfil característico de los órganos dependiente del fenotipo en el que influye la madurez de la planta el sexo, la colocación del órgano y el procedimiento de muestreo. Tanto los granos de polen como la semilla prácticamente carecen de cannabinoides (Hemphill y col., 1.980).

FORMAS DE CONSUMO

El preparado de la planta para el consumo se realiza de distintas formas, que reciben diferentes nombres que varían de unos países a otros. Estos son:

- Hierba: hojas y sumidades floridas picadas como tabaco con las que se hacen cigarrillos que se consumen fumados. En éstos suelen encontrarse semillas. Se denomina:

- Grifa (Marruecos y España)
- Marihuana (EE.UU.)
- Marijuana (México)
- Dagga (Sudáfrica)
- Hemp (Gran Bretaña)
- Maconha (Brasil)
- Kiff o Kiffi (Marruecos)
- Polvo: rapé de kiffi
- Polvo prensado

- Ganja (India): picadura de sumidades floridas comprimidas para darle forma de bola.

- Bang, bhang o patti (India): macerados acuosos o alcohólicos de picaduras de hojas secas, que se consume solo o con otros tóxicos que se añaden (opio, datura, etc.).

- Resina: es el producto segregado por la planta espontáneamente en pequeñas gotitas. Se extrae en las mismas plantaciones por el roce (los trabajadores utilizan unos delantales de cuero o unos lienzos donde queda adherida la resina). También se puede extraer de la planta con disolventes orgánicos. Se fuma en cazoleta, generalmente mezclada con tabaco, o se ingiere añadida a dulces o galletas. Es lo que se denomina hachis, hashis o hash. La resina va mezclada a veces con polvo vegetal. Se presenta en forma de comprimidos o barras que se conoce como "chocolate". Se fuma generalmente mezclada con tabaco rubio.

- Aceite rojo: se obtiene por extracción en caliente de la planta con disolventes orgánicos y posterior evaporación (Repetto y col., 1.985).

En la bibliografía en español se encuentran las expresiones "el cannabis", "la cannabis" utilizadas indistintamente por diferentes autores; pensamos que hay aquí un punto más de confusión, de los muchos que participan en la toxicología por cannabis. A lo largo de esta memoria nosotros seguiremos el criterio de reservar el femenino para la planta ("la planta cannabis"), y utilizar el artículo masculino ("el cannabis") para el conjunto de compuestos activos presentes en la planta o parte de ella (picadura, hachis) o preparaciones de parte de la misma (extractos, resina, aceite); por "cannabinoides" entenderemos las distintas sustancias constituyentes de esta familia química.

**QUIMICA**

## QUIMICA

No es posible realizar un estudio farmacológico y toxicológico de la cannabis, igual que de cualquier sustancia natural o de síntesis, si no se conoce su química en profundidad y con precisión.

El conocimiento de los componentes de esta planta no avanzó hasta los años 50 ya que estudios anteriores habían dado lugar a comunicaciones que carecían del rigor científico de la investigación actual. Además resultó difícil el aislamiento de los productos activos del cáñamo debido a las variaciones que sufre en cuanto a su composición no sólo a lo largo de su vida vegetativa (Kushima y col., 1.980),, sino además dependiendo de las características de su recolección, almacenamiento, conservación así como del origen geográfico (Bertol y Mari, 1.980; Tucker y Graham, 1.981; Barni y col., 1.984).

Los principios activos responsables de los efectos euforizantes del cannabis, por los cuales se consume como droga de adicción, se encuentran principalmente en la resina que segrega la planta, y se conocen como "Cannabinoides" a propuesta de Mechoulam y Gaoni en 1.967. Estos compuestos poseen una estructura carbonada que responde a un esquema tricíclico de dibenzopirano.

Existen distintos sistemas de nomenclatura con diferente numeración de los anillos de los cannabinoides. Un grupo de investigadores consideran a estos compuestos como derivados del terpeno (Fig. 6), lo que está de acuerdo con sus precursores bioquímicos terpénicos (Mechoulam y Shvo, 1.963); Adams y col. (1.942) por el contrario utilizan la numeración normal de los derivados del pirano (Fig.7). Una numeración y otra tienen sus ventajas y sus inconvenientes; nosotros vamos a adoptar la terpénica debido a que muchos cannabinoides no poseen el anillo de pirano, si bien en las referencias bibliográficas respetaremos el criterio del autor de la cita correspondiente.

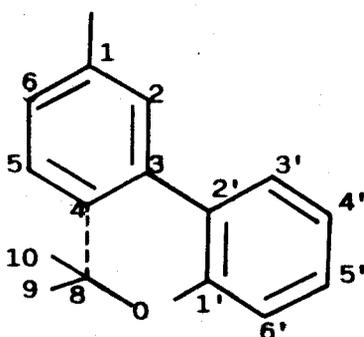


Fig. 6

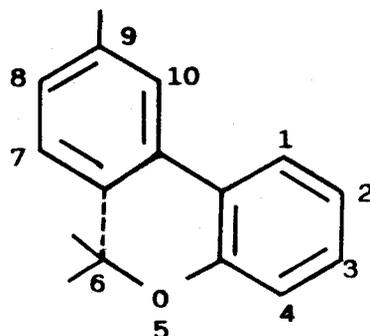


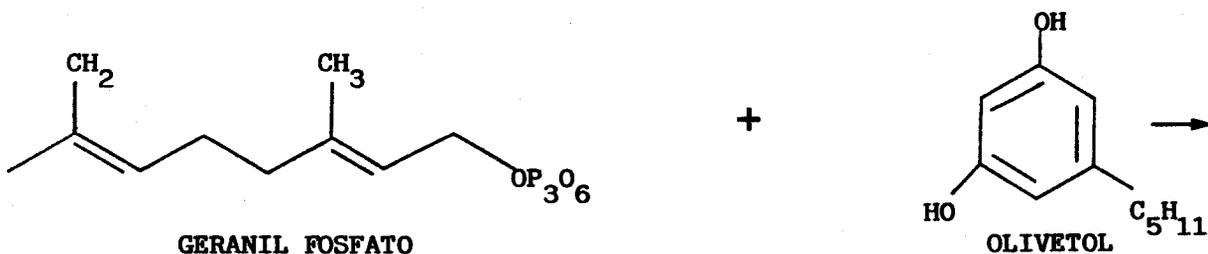
Fig. 7

En el siglo pasado ya se conocía que en los extractos de cáñamo existían unas sustancias que precipitaban con los reactivos de alcaloides. Los trabajos de Smith y Smith en 1.847 (a, b) mostraron que los principios activos de la resina estaban contenidos en una fracción insoluble en álcali, de alto punto de ebullición, que se obtenía de la planta por extracción alcohólica.

El primero de los cannabinoides conocido fue el cannabínol (CBN), compuesto fenólico aislado de la resina por Wood y col. en 1.896. Es Cahn en 1.932 quien consigue purificarlo bajo la forma de acetato cristalino y demuestra que es un derivado fenólico del dibenzopirano. Algo más tarde y gracias a los trabajos de Cahn en Inglaterra (1.933) y Adams (1.940) en EE.UU., se estableció la estructura del CBN; Adams y Baker (1.940) aislaron otro nuevo principio activo de la resina de cannabis al que denominan cannabidiol (CBD) que es obtenido a la vez por Jacob y Tood (1.940).

En la planta se ha demostrado que existe un ciclo biosintético, de los cannabinoides que además los relaciona entre sí. Fue Mechoulam (1.970) quien estableció estas reacciones en cadena y demostró que los cannabinoides que se habían aislado eran productos intermediarios.

Según Mechoulam el proceso se inicia con la condensación del Geranil fosfato y el Olivetol que origina el Cannabigerol que a su vez se cicla y produce el CBD que por otra ciclación forma el Tetrahidrocannabinol (THC) el cual por deshidrogenación se transforma en CBN (Fig. 8).



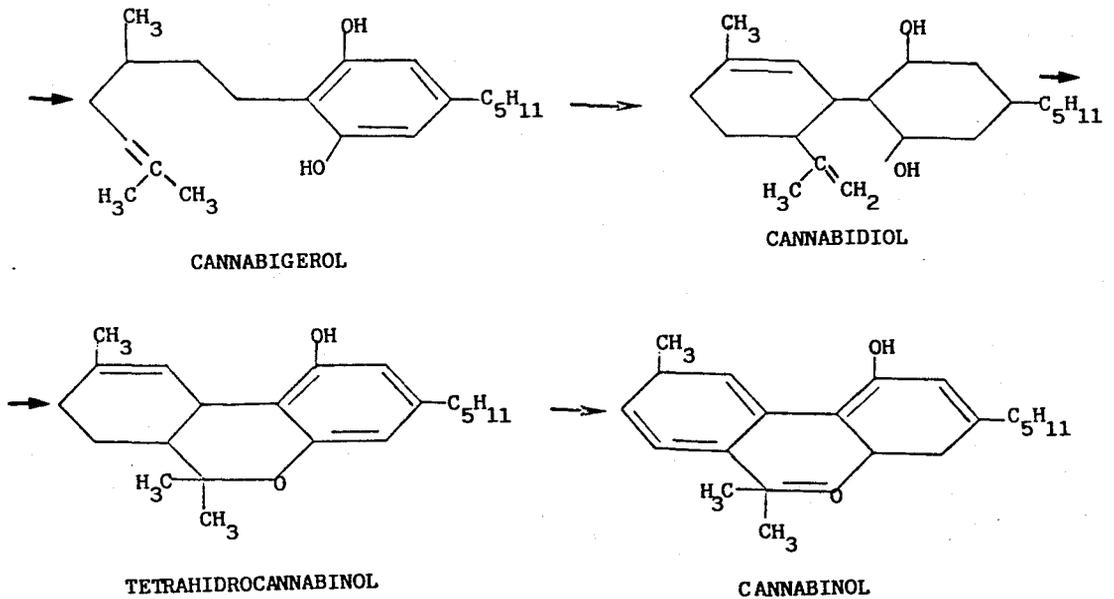


Fig. 8

Según otros autores el ácido cannabidiólico es otro producto intermedio que por descarboxilación da CBD (Grlic, 1.962; Korte y col., 1.966; Noirfalise, 1.968) (Fig. 3) y existe una vía de descomposición del  $\Delta^9$  THC a CBN (Turner y Elsohly, 1.979). (Fig. 9)

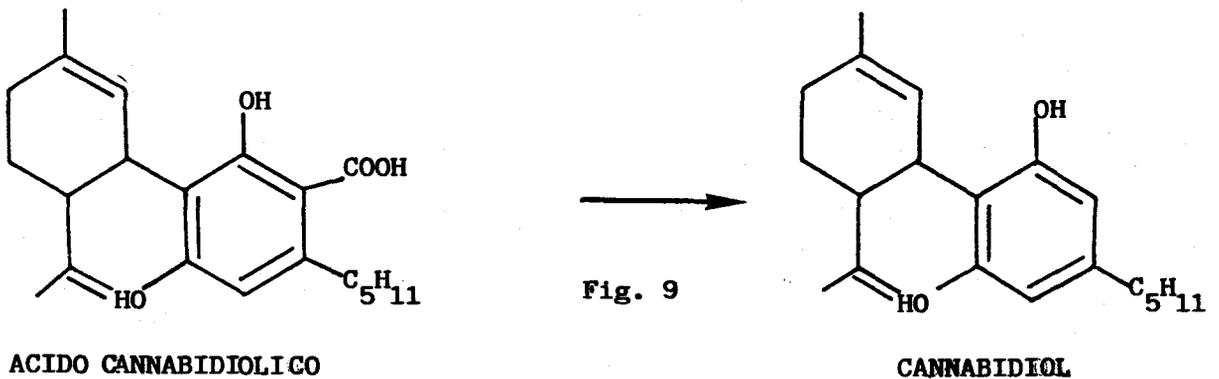


Fig. 9

Aunque son posibles seis isómeros del THC debido a la isomería de posición por la localización del doble enlace, sólo se han aislado del producto natural los isómeros  $\Delta^1\text{THC}$  y  $\Delta^{1'6}\text{THC}$ . (Hollister, 1.970; Mechoulam, 1.970).

Todos los cannabinoides que se han aislado de la planta han sido preparados de forma sintética o semisintética en el laboratorio. El CBN fue sintetizado por Adams y Baker (1.940) partiendo del Olivetol, Ghosh y col. (1.940) lo sintetizaron por otra ruta y obtuvieron como producto intermedio el THC. En 1.965 Mechoulam y Gaoni obtienen CBN y THC por la misma ruta, partiendo de Citral y la sal de litio del dimetil éster del Olivetol. Petrzilka y Sikemeier (1.967) obtienen de forma específica el isómero (-) CBD con un rendimiento del 25%. Taylor y Stronjny (1.960) presentan una síntesis del  $\Delta^8\text{THC}$  y  $\Delta^9\text{THC}$  en un solo paso en el que se obtienen otros isómeros que no se encuentran en la planta.

Hay que citar también la presencia de otros cannabinoides identificados en los extractos de resina como cannabigerol, cannabicitrol, cannacromeno, cannabivarol,  $\Delta^2\text{THC}$ , ácido A  $\Delta^1\text{THC}$ , ácido B  $\Delta^1\text{THC}$ , ácido cannabigerólico, ácido cannabinólico (Mechoulam, 1.973), Cannabiripsol (Boeren y col., 1.979; Turner y col., 1.980) y cannabiglendol (Turner y col., 1.981). Gill y col., en 1.970 comunican la identificación del cannabidivarin, compuesto homólogo al CBD pero su cadena lateral es de tres átomos de carbono ( $\text{C}_3\text{H}_7$ ) en vez de ser  $\text{C}_5\text{H}_{11}$ . Merkus (1.971 a y b) estudiando unas muestras de hachis de Nepal y valorando su contenido en cannabinoides postula unos procesos biosintéticos a partir del CBD y THC en los cuales se dan como intermedios el cannabidivarin, el tetrahidrocannabivarin y cannabivarin.

Otros productos secundarios extraídos de la planta son alcaloides como la nicotina, tetanocannabina, muscarina, colina y trigonabina (Bercht y Salemink, 1.969; Gill y col., 1.970; Samrah, 1.970; Klein y col. 1.971). Estos productos alcaloideos se extraen tanto de ejemplares frescos de cannabis como de material seco, con un contenido semejante. Se logran separar por cromatografía en capa fina cuatro alcaloides que se denominan cannabaminas A, B, C y D, y más tarde se identifican por espectrometría de masas.

Wood y col. (1.896 a, b) detectan también en el cáñamo la presencia de ceras, así como de aceites esenciales como carofileno,  $\beta$  humileno,  $\alpha$  selimeno, limoneno y  $\gamma$  terpineno (Martín y col., 1.961; Nigam y col., 1.965; Lamberkovics y col., 1.979 y 1.981).

#### Relación estructura química-acción farmacológica

Se ha visto que existe un antagonismo farmacodinámico entre los distintos cannabinoides (Farnsworth, 1.969; Mechoulam, 1.970; Repetto, 1.974) y que la actividad de THC está ligada al radical del C 5. Así se ha demostrado que si cambia el radical n-pentilo de los cannabinoides naturales, por el dimetil-heptil en un producto de síntesis, la actividad aumenta cuatro veces (Grunfeld y Edery, 1.969).

Los dos isómeros dextro y levo del THC preparado por síntesis también presentaron distinta actividad, así la forma l es 4 ó 5 veces más activa que la d que a su vez es un 40% más activa que la racémica. (Adams y col., 1.941).

Otros productos sintetizados por Mechoulam (1.970) han demostrado distinta actividad debido a cambios estructurales. Así cuando se sustituye un hidrógeno aromático por un radical metilo la actividad disminuye y el producto se inactiva completamente cuando la sustitución es de grupos hidroxilos o carboximetilos. Otro cambio estructural que disminuye la acción del THC es la acetilación de los grupos hidroxilos libres (Mechoulam, 1.970; Paton, 1.975). La actividad psicotropa está especialmente relacionada con la estereoquímica del sustituyente en el C1. Si ésta se mantiene, la actividad no se altera aunque cambien los sustituyentes en el C2 y C6 (Mechoulam y col., 1.980, 1.988).

# **TOXICOCINETICA**

## TOXICOCINETICA

Para el estudio de la absorción, distribución, biotransformación y eliminación de los cannabinoides se han utilizado sustancias marcadas por técnicas biogénicas (Gaoni y Mechoulam, 1.966), tal como el cultivo de la planta en atmósfera de  $^{14}\text{CO}_2$  o utilizando productos de síntesis. Así Burstein y Mechoulam en 1.963 usaron  $\Delta^1(6)\text{THC}$  específicamente marcado en el C-2 con tritio y Agurell y col. en 1.970 marcaron los hidrógenos aromáticos del  $\Delta^1\text{THC}$  también con tritio.

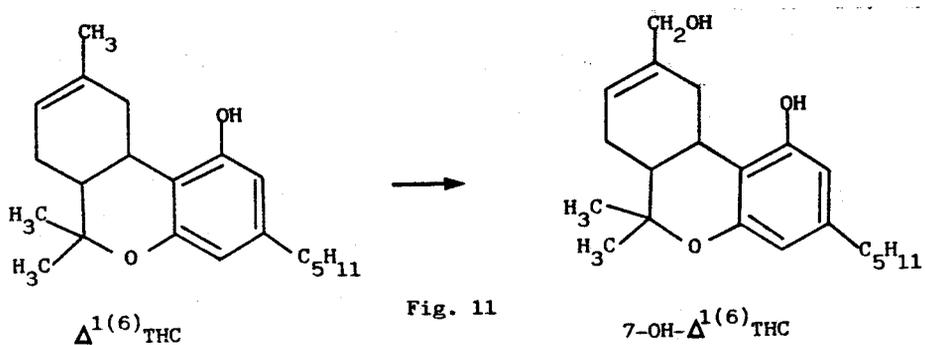
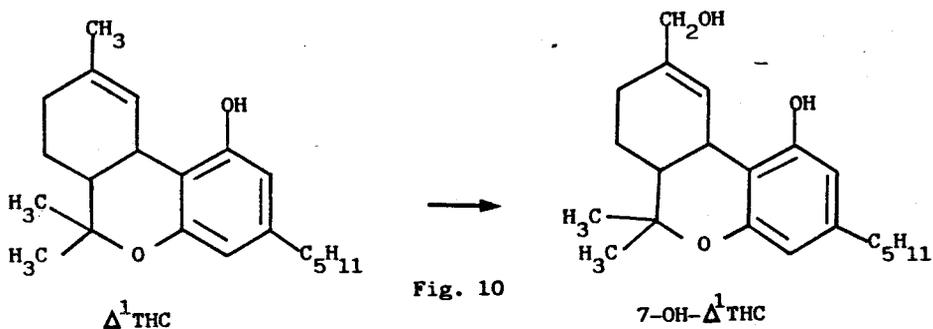
Para el estudio farmacocinético experimental del cannabis, se ha utilizado la vía inhalatoria, por ser la más usual en los consumidores, y también la oral y la parenteral. Se ha visto que la vía de administración afecta fundamentalmente a la distribución de los cannabinoides, ya que una misma dosis de  $\Delta^1\text{THC}$  por vía intraperitoneal permanece en la cavidad abdominal con escasa distribución a los tejidos, mientras que por vía intravenosa el paso a tejidos se realiza en cinco minutos (Ho y col., 1.971; Layman y Milton, 1.971).

Los productos cannábicos se transportan en la sangre unidos a proteínas. Se sabe que el  $\Delta^1\text{THC}$  se une fuertemente a las  $\alpha$  y  $\beta$  lipoproteínas y algo a la albúmina, por esta razón la concentración de  $\Delta^1\text{THC}$  libre en plasma es muy baja (Agurell y col., 1.970; Nilsson y col. 1.970; Walquist y col., 1.970; Widman y Nilsson, 1.973; Widman y col., 1.974 a). Klansner y col., en 1.975 publican un trabajo sobre la distribución del THC en el que parece que está más relacionada con el contenido en lípidos totales que con proteínas y fosfolípidos.

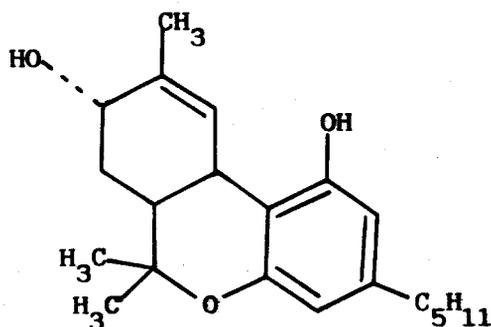
Cuando se estudian las concentraciones de los cannabinoides marcados, en los distintos órganos, con relación al tiempo, se observa que si la vía utilizada es la inhalatoria, a los 20 minutos la mayor concentración está en el pulmón y la menor en hígado y testículos. A las 8 horas la acumulación aumenta en hígado y disminuye en cerebro y riñón. Hasta después de 7 días se encontraron concentraciones residuales en cerebro, pulmón e hígado. (Ho y col., 1.970). En cerebro la penetración es mayor por vía inhalatoria que por vía intravenosa (Leighty, 1.973).

En estudios comparativos con fumadores habituales o no de marihuana (Lemberger y col., 1.971) se comprobó que los cannabinoides marcados permanecen en el plasma de los primeros un 50% más tiempo que en los no habituales, de lo que deducen la existencia de una inducción de las enzimas hepáticas, aunque podía también interpretarse por desarrollo de tolerancia. Mason y col. en 1.983 detrmnan por RIA y posterior confirmación y cuantificación por cromatografía gaseosa/masa el contenido en THC y COOH-THC y sus concentraciones relativas en plasma de fumadores activos y pasivos. Desde 20-30 minutos y hasta 4 horas después de fumar, el derivado carboxilado predomina sobre el THC en los primeros, mientras que en los pasivos ocurre al contrario, lo que aboga en favor de una estimulación de los mecanismos metabólicos destoxicantes en el fumador activo.

El metabolismo de los principios activos de los cannabinoides es de gran importancia. Los primeros estudios se llevaron a cabo tanto in vivo (Burstein y Mechoulam, 1.963) en conejos tratados por vía intravenosa con  $\Delta^1$ THC tritiado en el C-2, como in vitro (Mechoulam, 1.970), incubando  $\Delta^1$ THC con homogeneizado hepático de conejo. En ambos casos se ha comprobado que el THC se biotransforma en los microsomas hepáticos en su compuesto hidroxilado. Así el  $\Delta^1$ THC origina el 7-OH- $\Delta^1$ THC (Fig. 10) y su isómero  $\Delta^1(6)$ THC el 7-OH- $\Delta^1(6)$ THC. (Fig. 11).



Mechoulam también identificó en su trabajo in vitro otro metabolito del  $\Delta^1$ THC que igualmente es otro compuesto hidroxilado, el 6- $\beta$ -OH- $\Delta^1$ THC. (Fig. 12).



6- $\beta$ -OH- $\Delta^1$ THC

Fig. 12

Se ha puesto de manifiesto que esta hidroxilación es realizada por una enzima monooxigenasa dependiente del oxígeno y del sistema NADP-NADPH que se inhibe con monóxido de carbono lo cual indica que también interviene el citocromo P-450. (Burstein y Kupfer, 1.971).

Estos metabolitos del THC se han aislado y sintetizado y cuando se administran a animales se ha comprobado que su actividad es similar, incluso superior a la del THC (Ben-Zvi y col., 1.971; Christensen y col., 1.971). Esto indica que la actuación farmacológica del  $\Delta^1$ THC requiere una transformación previa en su 7-hidroxiderivado y explica que algunos neófitos en el consumo de la droga la ingieran en gran cantidad para inducir el sistema enzimático y conseguir su efecto.

Sofia y Barry comprobaron en 1.970 que no se alteraba la hidroxilación por la administración simultánea de hexobarbital, que sí es impedida por el SKF-525-A (acetato de  $\beta$  dietil amino etil difenil propilo) que inhibe las enzimas microsómicas metabolizadoras (James y Fujimoto, 1.973; Estevez y col., 1.974). Cuando se produce esta inhibición los animales experimentan una depresión central, que hay que achacar al THC original, y el metabolito es el estimulante (Repetto y

Menéndez, 1.972). También aumenta la depresión por la administración conjunta de THC, hexobarbital y alcohol etílico (Phillips y col., 1.971).

Posteriormente los siete hidroxiderivados se transforman en el hígado en dihidroxi-THC (Fonseka y Widman, 1.977) y carboxi-THC (Ben-Zvi y col., 1.974; Kanter y Hollister, 1.977; Yisak y col., 1.978; Nordqvist y col., 1.979 a, b; Agurell y col., 1.979).

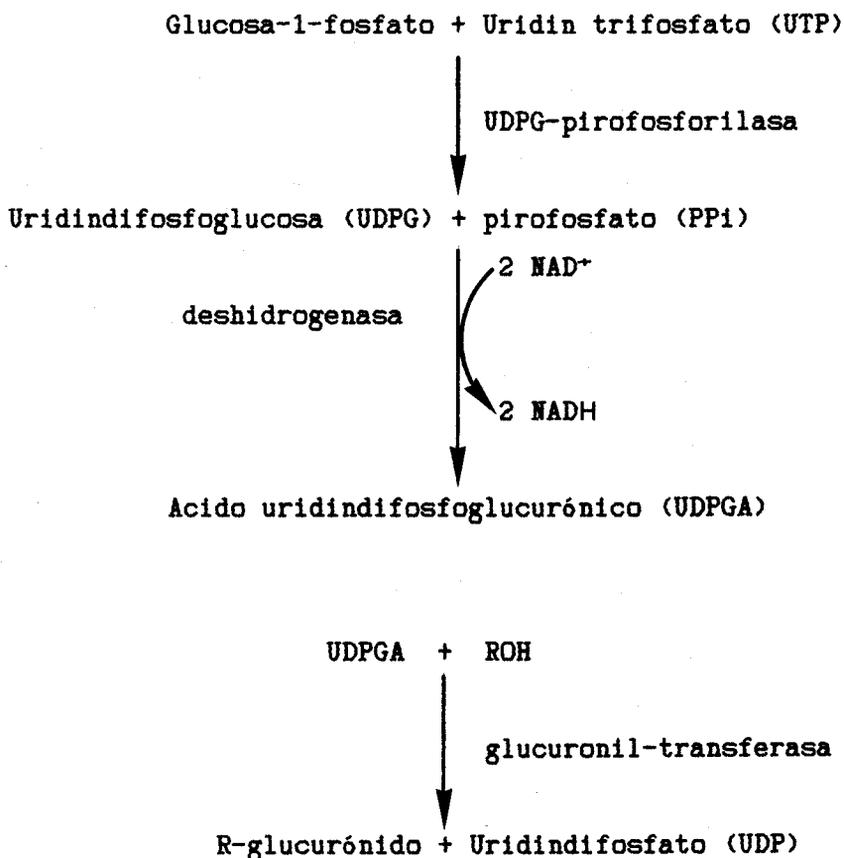
Se han aislado también mono y dihidroxiácidos (Harvey y Paton, 1.976, 1.980) y otros oso, hidroxil, dihidroxil, hidroxilácidos y cetonas en distintas posiciones de la cadena lateral (Harvey y Paton, 1.976; Nordqvist y col., 1.979 a, b; Harvey y col., 1.980 a, b, c).

Se ha postulado que la formación de los derivados hidroxilados sería a través del doble enlace (Harvey y col., 1.980 b) con la formación de un epóxido inestable aislado por Ben-Zvi en 1.980.

El CBN y CBD sufren un metabolismo semejante al de THC (Martin y col., 1.976, 1.977; Kanter y Hollister, 1.977; Yisak y col., 1.977, 1.978; Fonseka y col., 1.977; Harvey y col., 1.980a).

La eliminación de los principios activos del cannabis y de sus metabolitos, se realiza por orina y también por bilis. Tanto el  $\Delta^1$ THC como el  $\Delta^8$ THC no se excretan en su forma libre, sino previa conjugación con el ácido glucurónico debido a la estructura fenólica (Burstein y Raz, 1.972; Widman y col., 1.974 b; Lyle y col., 1.977; Levy y col., 1.978) dando lugar a diferentes glucurónidos.

La glucuroconjugación se realiza en el hígado y en esta reacción interviene una serie de enzimas por las que a partir de glucosa 1-fosfato se llega al ácido uridindifosfoglucurónico (UDPGA) que es el compuesto activo capaz de unirse al grupo hidroxilo del compuesto orgánico para producir el conjugado. Estas reacciones son las siguientes:



Los glucurónidos formados se eliminan por orina (Lemberger y col., 1.970; 1.971; Kanter y col., 1.972; 1.974; 1.975; Kelley y Arnold, 1.976) y por bilis (Widman y col., 1.974 b; Siemens y col., 1.975).

Los metabolitos eliminados por la bilis se excretan por las heces, pero en su mayor parte se reabsorben, desde el tubo digestivo (Ben-Zvi y col., 1.970; Burstein y col., 1.970; Foltz y col., 1.970; Paton, 1.975). Esta circulación enterohepática es la responsable del retraso en la eliminación de los metabolitos activos y por tanto de su mayor vida media (Neumeyer y Shagory, 1.971; Williams y Smith, 1.971). Esta es de 7 días, con una persistencia en el organismo de hasta 30 (Sutheiner y col., 1.986)

En tejidos se han aislado cannabinoides y sus derivados hidroxilados conjugados a ácidos grasos, como forma de retención de estas sustancias

en órganos ricos en lípidos (Leighty y col., 1.976; Leighty, 1.979, 1.980).

En orina y heces de fumadores se han aislado también numerosos metabolitos de los que son cuantitativamente importantes el mono, el dihidroxi y el carboxiderivado (Lemberger y col., 1.970, 1.971; Agurell y Leander, 1.971; Kelley y Arnold, 1.976; Kanter y Hollister, 1.977; Halldin y col., 1.982).

La identificación de los cannabinoides y de sus metabolitos en muestras biológicas con fines clínicos o forenses, ha sido bastante difícil. Hasta 1.970 sólo se habían identificado algunos cannabinoides en saliva, sangre y orina por cromatografía en capa fina (Da Silva, 1.967); en orina de un muerto Heyndrickx y col. detectaron en 1.969, por la misma técnica, CBN; y en boca y dedos de fumadores (Stone y Stevens, 1.969; Robinson, 1.971) pero sin poderlo identificar por cromatografía gaseosa.

Repetto y Menéndez consiguieron en 1.970, identificar por cromatografía gaseosa los constituyentes del humo del cannabis, metabolitos en orina, restos en dedos de fumadores y productos condensados y en la sangre de un individuo que sufrió una intoxicación aguda.

En la actualidad es de mayor interés identificar los metabolitos en sangre y orina ya que además puede dar información sobre el grado de habituación. Hoy día está muy difundido el uso de técnicas inmunológicas, fundamentalmente enzima-inmunoensayo (EMIT) para la detección de cannabinoides en fluidos orgánicos (DE Laurentis y col., 1.982). Pero debido a la elevada incidencia de falsos positivos y de reacciones cruzadas entre el amplio espectro de cannabinoides y metabolitos, estos métodos, aunque de gran sensibilidad carecen de la necesaria especificidad. Los resultados positivos deben por tanto validarse con otros métodos, como cromatografía de gases/masa, que permitan su diferenciación y su cuantificación.

El metabolito mayoritario en orina es el 11-nor-9-carboxi- $\Delta^9$ THC (Whiting y Manders, 1.982; Vinson y Lopatofsky, 1.985; Elsohly y Stanford, 1.985), así como en sangre (Burney y col., 1.986).

La cuantificación de este metabolito en orina puede servir para relacionar el tiempo transcurrido desde la absorción de la droga. Permanece días en sangre y semanas en orina después de interrumpir la ingestión o el fumado. Su presencia indica exposición previa en un tiempo indeterminado. Sin embargo, las relaciones THC-COOH libre/conjugado en orina y la de cannabinoides totales/THC en plasma nos informan del tiempo transcurrido desde la absorción. El THC incambiado no aparece prácticamente en orina, en la que sí se encuentra THC-COOH constituyendo el 27% de un conjunto de hasta 117-120 de otros derivados carboxílicos y dicarboxílicos minoritarios (Burney y col., 1.986). Se ha encontrado diOH-THC en orina inmediatamente después del fumado pero no al día siguiente, por lo que este derivado podría ser un indicador de consumo reciente (Hazan y col., 1.980), pero Burney y col. (1.986) proponen como indicador reciente la relación  $\log \text{ THC-COOH/THC}$  en plasma que se corresponde con el logaritmo del tiempo, además de la cuantificación de cada uno de ellos. Inmediatamente después de fumar dos cigarrillos de marihuana, se encuentran en plasma concentraciones de THC superiores a 100 ng/ml, pero a las 4-5 horas sólo 2-3 ng/ml. Por ingestión, el contenido plasmático de THC es siempre menor, mientras que el de THC-COOH y OH-THC son mayores que por inhalación. En orina de fumadores se encuentran concentraciones superiores a 15-20 ng/ml de diOH-THC sólo en las primeras 4-6 horas.

Las concentraciones sanguíneas de  $\Delta^9\text{THC}$  nos indican si la ingesta ha sido reciente o no, pero no dan idea de sus efectos. Sin embargo, la determinación de THC y THC-COOH en la misma muestra de sangre, presenta potenciales ventajas forenses, para estimar el grado de deterioro y tiempo de último uso de la marihuana por un individuo (Hanson y col., 1.983).

También Mason y col. publican en 1.983 un método para diferenciar entre fumadores activos y pasivos, según las concentraciones de THC-COOH y THC que se determinan en sangre. Concluyen que en plasma de un fumador pasivo se encuentran bajas concentraciones de THC y siempre THC-COOH en mayor proporción que THC.

Jones publica en 1.985 un trabajo muy interesante en el cual opina que para valorar la cinética de eliminación urinaria, hay que relacionar

concentraciones de metabolitos con creatinina, al igual que se hace para otros fármacos.

**TOXICODINAMICA**

## TOXICODINAMICA

El cannabis representa uno de los mejores ejemplos de psicofármacos de acción múltiple y compleja; pese a haber sido estudiado de forma extensa por muchos autores se siguen encontrando en la bibliografía resultados contradictorios, o incompletamente explicados. Quizás esto contribuya a que el mecanismo de acción todavía esté sin aclarar.

La razón primaria de esta complejidad de efectos es debida a la variedad de productos psicoactivos presentes en la planta cuyas acciones farmacológicas y tóxicas pueden solaparse, sumarse o contrarrestarse.

Se ha considerado siempre a THC como el más importante de los componentes activos, pero también participan en la acción el CBN y CBD que además se encuentran en mayor proporción. El ácido cannabidiólico es inactivo, pero se transforma en THC cuando el cannabis se fuma. Por otra parte los metabolitos hidroxilados son los responsables de la acción euforizante de la droga (Farnsworth, 1.969; Hollister, 1.970; Mechoulam, 1.970; Repetto, 1.974).

Se han adjudicado también acciones importantes a la fracción no psicoactiva de esta planta (Dalterio y col., 1.981).

En los últimos años aparecen muchos trabajos experimentales en los que se utilizan independientemente los distintos productos activos e incluso productos puros de síntesis, lo que ha permitido importantes avances en el conocimiento, pero a pesar de ello aún quedan por explicar muchos puntos de su modo de acción tanto individual como conjunta.

El estudio de los efectos de esta droga en humanos se complica aún más por una serie de factores: además de la dosis, participa la personalidad del individuo y la influencia que sobre él ejerza un ambiente más o menos propicio, el hecho de que se trate de un individuo neófito en el consumo o no y su grado de habituación; el momento en que se realice el estudio en cuanto a la fase cronológica de la adicción. De éstas se consideran las siguientes:

Fase I, de inducción: en esta fase se pueden producir sensaciones contradictorias, tanto efectos euforizantes como disfóricos, depresores, pánico o agresividad, risas o llantos.

Fase II, de dependencia: en ella el individuo aumenta la dosis, la consume sólo, adopta un cambio de conducta razonando su nueva filosofía de la vida pero va perdiendo actividad y disminuye su rendimiento laboral e intelectual.

Fase III, pre mórbida: el individuo se hace agresivo, paranoico, receloso.

Fase IV, patológica: los fumadores habituales ("duros") pueden llegar en esta fase a un estado patológico de tipo esquizoide con toda la sintomatología de esta enfermedad (Repetto y col., 1.985).

Los síntomas característicos tanto del cannabis como del THC aparecen con dosis bajas; así, se da ligera euforia desde dosis umbrales de 50 µg/Kg por vía oral (Isbell y col., 1.967). A medida que aumenta la dosis se producen otros síntomas inespecíficos como alteraciones perceptivas y sensoriales, que pueden llegar a distorsión de la percepción, despersonalización, pérdida del sentido del tiempo y de la realidad y alucinaciones visuales y auditivas.

Estos síntomas se acompañan de otros signos como congestión de la conjuntiva (Chopra y Chopra, 1.957), disminución de la fuerza muscular, aceleración del pulso y alteración de la presión sanguínea (Manno y col., 1.970; Renaut y col., 1.972; Nahas, 1.973; Kawasaky y col., 1.980; Stark y Dews, 1.980), así como disminución de la temperatura corporal (Weil, 1.969; Zinberg y Weil, 1.970; McLean y Littleton, 1.977; Haavik y Hardman, 1.980; Haavik y col., 1.980; Vaziri y col., 1.981), de la secreción salivar y de la presión intraocular (Isbell y col., 1.967; Sidney-Cohen, 1.976; Green y col., 1.977 a, b).

El efecto cardiovascular del THC es bifásico: con dosis bajas la frecuencia cardíaca disminuye, mientras que con dosis más elevadas aumenta. El THC también provoca una disminución de la fuerza contractil lo que progresivamente reduce el flujo sanguíneo coronario. Por el contrario el CBD produce un aumento de la frecuencia cardíaca dependiente de la dosis con aumento de la fuerza contractil y del flujo sanguíneo coronario. Este efecto antagónico del THC y CBD puede explicar las variaciones en la respuesta cardiovascular del cannabis dependiendo

de la concentración de estas sustancias en el preparado (Husain y Khan, 1.985).

En fumadores de marihuana se ha observado disminución de la capacidad vital y obstrucción de las vías respiratorias superiores. Las lesiones del parénquima pulmonar consisten en alveolitis focal diseminada, caracterizada por fenómenos granulomatosos de infiltraciones densas de macrófagos, asociados con depósitos de colesterol. Estos efectos son distintos a los producidos por el tabaco (Mechoulam, 1.976; Nahas, 1.978; Babers y col., 1.987; Gong y col., 1.987; Wu y col., 1.988). Hay que señalar también el mayor riesgo de cáncer de pulmón que presentan los fumadores de hachis frente a los de tabaco debido al mayor contenido de benzopireno en el cigarrillo de hachis (Repetto y col., 1.985).

El cannabis afecta de modo significativo las funciones cognitivas, tanto más cuanto más elevada es la dosis y más compleja la tarea, como lo demuestran los numerosos estudios sobre comportamiento realizados en grupos de humanos voluntarios, sometidos a pruebas psicológicas y de ejecución de tareas o en animales con distintos tipos de laberintos y de pautas de comportamiento de condicionamiento operativo con y sin autoadministración.

Son particularmente claros los efectos sobre el aprendizaje y la memoria. Parece ser que en los consumidores de cannabis aparece un deterioro de la memoria siendo la más afectada la inmediata y la reciente, no afectándose la permanente (Paton y Pertwee, 1.973; Wetzel y col., 1.982; Hollister, 1.988), lo que ha sido comprobado en los estudios realizados con animales (Sanz y col., 1.979; Essman, 1.984).

La revisión de la amplia bibliografía existente sobre el cannabis sugiere que los cannabinoides ejercen acciones ubicuas produciendo actuaciones en prácticamente todos los sistemas biológicos estudiados. La meta principal de muchos de los autores parece haber sido identificar el acontecimiento bioquímico o la vía responsable del efecto psicoactivo. Dado que este efecto es complejo, es lógico pensar que también sean múltiples los mecanismos implicados. Han despertado un especial interés los efectos neuroquímicos. Para descifrar el mecanismo

de la acción de los cannabinoides sobre el sistema nervioso central, se han estudiado sus efectos en diversos neurotransmisores (Filipovic y Trkovnik, 1.980; Ghosh y Bhattacharya, 1.980 a, b; Steger y col., 1.983; Mendelson y Mello, 1.984; Markianos y Vakis, 1.985).

Aunque todavía no está clara la acción del THC parece ser que tiene particular importancia en la renovación de la acetilcolina en el hipocampo mediante un mecanismo GABA-érgico (Lindamoord y Colasanti, 1.980, 1.981; Revuelta y Cheney, 1.981). No obstante no se puede descartar la posible acción de un mecanismo dopaminérgico (Bloom, 1.982; Machula y Barkov, 1.983; Cheongton y col., 1.988), con intervención de prostaglandinas que actuarían como moduladores (Bhattacharya y col., 1.980; Coupar y Taylor, 1.982; Burnstein y col., 1.983; Hillar y Bloom, 1.983) y del AMPc, sobre el que los cannabinoides ejercen un efecto bifásico. Con dosis entre 0'1-1'0 mg/Kg administrada vía i.p. a ratones, se encuentra un incremento de AMPc en cerebro, mientras que a dosis más altas, 2'0-10'0 mg/Kg, disminuye (Dolby y Kleinsmith, 1.974).

Estas alteraciones se corresponden con un efecto paralelo en la adenilciclasa, enzima responsable de la ciclación del AMP, cuya actividad aumenta con dosis baja y disminuye o no sufre alteración a dosis alta de cannabinoides.

Al estar implicado el AMPc en el transporte de neurotransmisores a través de las membranas sinápticas, sus efectos se pueden relacionar con las modificaciones detectadas en éstos y en las acciones sobre el comportamiento.

Se han observado también alteraciones en el contenido de histamina cerebral (Fennessy y col., 1.983), corticoides (Puder y col., 1.982) y catecolaminas (Poddar y Dewey, 1.980; Patel y col., 1.985). También parece afectado el sistema serotoninérgico (Bhattacharya y col., 1.980; Jonhson y col., 1.981; Taylor, 1.982) con diferente respuesta para los isómeros del  $\Delta^9$  y  $\Delta^8$  del THC.

Se ha comprobado un paralelismo entre la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) y la monoamino oxidasa (MAO) cerebral y las reacciones que experimentaban los animales, en tratamientos crónicos, de 28-91 días de duración, tanto con THC como con resina, a dosis bajas. Al

principio del tratamiento (10 días) los animales manifestaban signos de depresión del sistema nervioso central, incoordinación, ataxia y pasividad. A los 28 días evolucionaban a hiperactividad, irritabilidad y agresividad, coincidiendo con una disminución de la AChE. Con tratamientos largos, de más de 90 días, la inhibición de la MAO coincide con convulsiones clónicas de algunos de los animales; todos los cambios neurotóxicos y neuroquímicos son reversibles después de 30 días de recuperación (Luthra y Rosenkrantz, 1.974; Luthra y col., 1.975, 1.976).

Dado que el THC parece interaccionar con varios neurotransmisores y que esta interacción presenta una cierta estereoespecificidad, se han buscado receptores del cannabis para explicar estos efectos, aunque hasta la fecha no se han encontrado evidencias experimentales que apoyan esta suposición (Martín, 1.986). El efecto ejercido sobre receptores  $\beta$ -adrenérgicos, dopamina y opiáceos y la unión a membranas neuronales de ratas, parece deberse más bien a una alteración del entorno membranoso (Husain y Khan, 1.985).

Los cannabinoides se acumulan en tejidos grasos gonadales (Rawitch y col., 1.979) y parecen interaccionar con receptores estrogénicos (Sawer y col., 1.983) interfiriendo en la función propia (Morrill y col., 1.983). Alteran la unión del estradiol a los tejidos (Chakravarty y Ghosh, 1.981; Chakravarty, 1.983).

En ratón se ha observado la inhibición de la secreción de testosterona (Dalterio y col., 1.977, 1.982, 1.983; Braunstein y col., 1.980; Barnett y Chiang, 1.983; Kumar y Chen, 1.983).

El THC estimula la secreción de proteínas fijadoras de andrógenos en testículo aumentando así la unión de éstos y disminuyendo la concentración de andrógenos libres; consecuentemente las células afectadas se convierten en hipoandrogénicas (Husain y Khan, 1.985).

Además de los efectos directos en las gónadas, el THC interfiere en la secreción hormonal de la hipófisis (Chakravarty, 1.982) de una forma más o menos directa (Hughes y col., 1.981). Bloquea la liberación de prolactina (Kramer y Ben-David, 1.978; Hughes y col., 1.981; Hughes y Tyrey, 1.982; Markianos y Stefani, 1.982; Steger y col., 1.983; Dalterio y col., 1.984; Harclerode, 1.984; Mendelson y col., 1.984, 1.985) de

hormona luteinizante (Besch y col., 1.977; Alozie y col., 1.978; Steger y col., 1.980) y de hormona folículo estimulante necesarias para la ovulación y el mantenimiento de la fase folicular (Husain y Khan, 1.985). Los efectos de la exposición prolongada del THC son reversibles y los niveles hormonales hipofisarios recuperan la normalidad cuando cesa la exposición (Harvey, 1.984).

Además de los efectos hormonales el THC produce cambios enzimáticos en los órganos sexuales (Chakravarty, 1.981, 1.982) inhibiendo fundamentalmente la oxidación de la fructosa y la glucosa y la fijación de la glucosa en las células testiculares, con deterioro de los mecanismos productores de energía necesarios para la espermatogénesis (Husain y Khan, 1.985). Se ha observado igualmente inhibición de las isoenzimas de las esterasas testiculares (Goldstein, 1.977) y de la MAO de útero (Chakravarty y col., 1.976).

El consumo de cannabis altera los mecanismos sexuales de hembras y de machos de todas las especies, afectando a las funciones reproductoras y al desarrollo de los fetos. A pesar de existir discrepancia en los estudios llevados a cabo en los humanos y animales y dentro de ambos grupos, pueden establecerse con claridad una serie de hechos, si bien unos autores atribuyen algunos de estos efectos a productos no cannabinoides de la droga (Wirth y col., 1.981) o los consideran como efectos secundarios a la disminución del consumo de alimento y bebida y a la pérdida de peso (Abel, 1.981).

En animales de experimentación se ha comprobado inhibición de la espermatogénesis y de la movilidad de los espermatozoides (Tilak y Zimmerman, 1.984; Zimmerman y col., 1.986) lo que coincide con la oligospermia observada en hombres consumidores habituales de cannabis (Husain y Khan, 1.985).

La función reproductora se ha visto alterada en roedores machos (Dalterio, 1.980) y en hembras con retrasos en la maduración sexual (Smith, 1.983; Field y Tyrey, 1.984; Smith y Asch, 1.984; Kumar y col., 1.985; Martín, 1.985; O'Connell y col., 1.987), incluso cuando la exposición ha sido perinatal (Dalterio y Bartke, 1.979).

También se han encontrado alteraciones de la función sexual en humanos (Halikas y col., 1.982; Erdolu y col., 1.985), perturbación del ciclo menstrual (Sanz y col., 1.981; Smith, 1.983) e inhibición de la ovulación tanto en humanos como en animales (Kostellow y col., 1.980).

Parece que el consumo de cannabis, tanto en hombres como en mujeres, afecta al crecimiento y desarrollo fetal (Greenland y col., 1.982, 1.983; Hingson y col., 1.982; Gibson y col., 1.983; Barr y col., 1.984; Fried y col., 1.984; Loscalzo y col., 1.984; Tennes, 1.984).

En animales se ha comprobado también disminución de crecimiento fetal en ratas (Abel, 1.980, 1.984; Qazi y col., 1.985; Hatch y Bracken, 1.987) con desmasculinización (Okey y Truant, 1.975; Dalterio y col., 1.986) y embriotoxicidad en ratas, ratones y conejos aunque con leve si no nulo efecto teratogénico (Abel, 1.979; Cozens y col., 1.980; Rosenkrantz, 1.980; Rosenkrantz y col., 1.986).

Por otra parte existen pruebas de que el consumo del cannabis o del THC puede provocar una disfunción del sistema inmune en humanos (Yashia y Watson, 1.987) y en monos (Daul y Heath, 1.975). En roedores se ha demostrado un efecto inmunosupresor de los constituyentes cannábicos, asociado a la disminución de la resistencia a determinadas bacterias y virus (Zimmerman y col., 1.977; Luthra y col., 1.980; Levy y Heppner, 1.980, 1.981; Baczynsky y Zimmerman, 1.983 a, b). Así por ejemplo se ha estudiado la disminución de la resistencia a la infección vaginal por el virus HSV-2 tras exposición de ratones y cobayas a THC, que se ha asociado con una disminución de la inmunocompetencia humoral (Husain y Khan, 1.985). Se ha comprobado también una inhibición en la función de las células NK ("natural killer cells") (Klein y col., 1.987; Kawakami y col., 1.988).

Se estima que el aumento inducido por los cannabinoides en la eliminación de los corticoides podría determinar ciertos aspectos de la supresión inmunitaria como la atrofia esplénica (Lefrowitz y Klager, 1.978; Husain y Khan, 1.985). La supresión de la inmunidad, tanto humoral como celular, presenta una relación con la estructura de los cannabinoides tanto naturales como sintéticos (Smith y col., 1.978).

Ya hemos indicado que de los mecanismos básicos que pudieran explicar la psicoactividad de los cannabinoides, debe descartarse de momento la posibilidad de existencia de un receptor específico. Por otra parte los efectos tan generalizados en múltiples y variados sistemas biológicos hace pensar en mecanismos más ubicuos.

Desde el punto de vista físico-químico los cannabinoides son fundamentalmente sustancias liposolubles (coeficiente de partición octanol/agua: 1.200) con gran afinidad por las lipoproteínas de las membranas celulares y sistema nervioso. Este mecanismo ha despertado considerable atención por parte de los investigadores, estableciendo una relación de semejanza con los anestésicos volátiles (Martín, 1.986).

A bajas concentraciones, los cannabinoides fluidifican y por tanto permeabilizan capas lipídicas, de un modo semejante a como lo hacen dosis subtóxicas de aquellos fármacos (Lawrence y Gill, 1.975) y de otros muchos xenobióticos que realizan una acción no específica sobre la membrana, denominada acción estabilizante de la membrana, MSA (Henry y Cassidy, 1.986). Esta consiste en una inhibición de la despolarización y por tanto del potencial de acción de las células excitables que se ha observado sobre el sistema nervioso central y periférico y sobre miocardio en casos de sobredosis de alcoholes, barbitúricos, antidepresivos tricíclicos entre otros.

El mecanismo de acción sobre los complejos lípido-protéicos de las membranas todavía no es muy claro, y en algunos puntos los resultados de los distintos autores son contradictorios. Estas discrepancias pueden quizás deberse a las dosis consideradas, ya que varios de los parámetros estudiados presentan comportamientos bifásicos o reversión de los efectos con el tiempo por adaptación o tolerancia.

En líneas generales con concentraciones por encima de  $10^{-6}$  M los efectos encontrados son inespecíficos, imputables solamente a la liposolubilidad de los cannabinoides; aparecen cambios estructurales que llegan hasta la desintegración de las membranas. Por debajo de esa concentración se encontraron efectos estereoespecíficos con alteraciones exclusivamente bioquímicas (Nahas, 1.978).

Existen por tanto concentraciones límites para estos dos efectos que dependen además del contenido en lípido de la membrana y quizás también del tipo de la molécula lipídica que la constituye (Chari-Bitron, 1.976).

En 1.974 Laurent y col. determinaron el THC en sangre después de fumar un cigarrillo de marihuana, que contenía 10 mg de THC. Los valores encontrados fueron de  $10^{-7}$  M, con concentraciones superiores en tejidos con contenido lipídico mayor. Esta concentración está muy próxima a la citada como límite productor de efectos estructurales o funcionales.

En tratamientos con cannabinoides se ha comprobado que se inhiben tanto la ATPasa dependiente de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , responsable del flujo de iones a través de la membrana, como la Mg-ATPasa que cataliza las transfosforilaciones. In vitro se ha comprobado que con concentraciones de THC de  $10^{-5}$  M, la  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasa desaparece completamente, mientras que la Mg-ATPasa sólo se inhibe en un 40% (Laurent y col., 1.974). También in vivo se ha comprobado esta inhibición que se ha puesto de manifiesto más claramente con tratamientos agudos que con los crónicos (Repetto y col., 1.979).

En 1.975 Laurent y Roy realizaron un estudio del comportamiento alostérico de estas enzimas y comprobaron que los cannabinoides no modificaban la estructura de la molécula, pero se adhieren a la membrana celular produciéndose cambios en su organización física.

Estos mismos cambios se señalan en trabajos con eritrocitos y mitocondrias hepáticas (Chari-Bitron, 1.976) e in vivo en la membrana sináptica (Lee y Olmsted, 1.976; Olmsted, 1.976).

Otro sistema de membrana que aparece alterado es el del AMPc y enzimas relacionados, como adenilciclase que como hemos visto ve incrementada su actividad con dosis bajas de THC y disminuída a medida que éstas aumentan (Dolby y Kleinsmith, 1.974).

Por otra parte pequeños cambios en el AMPc pueden repercutir en la actividad de proteinkinasa, muy importante en los mecanismos de regulación enzimática, produciendo un efecto en cascada sobre otros sistemas enzimáticos (Dolby y Kleinsmith, 1.977).

Uno de los sistemas regulados por mediación del AMPc, es la síntesis y catabolismo del glucógeno, que como veremos más adelante es uno de los parámetros más afectados por esta droga.

Otro importante efecto de los cannabinoides es la inhibición de la síntesis de macromoléculas, tanto ácidos nucleicos (ADN y ARN) como proteínas. Esto fué observado por primera vez por Jakubovic y Mc Geer en 1.972 y confirmado por Nahas y Desoize en 1.974, en un experimento in vitro, utilizando linfocitos humanos cultivados con distintas concentraciones de THC. Otros autores han comprobado este mismo efecto en otros tipos de células y especies animales. Así Zimmerman y Zimmerman (1.976) utilizaron protozoos, Braum y Brachet fase ameloide de un mixomiceto. También se ha observado esta misma acción en fibroblastos humano y de ratón (Blevins y Regan, 1.976; Huot, 1.976) testículos (Jakubovic y Mc Geer, 1.976) y pulmón (Leuchtemberger y Leuchtemberger, 1.973).

La inhibición de la síntesis de macromoléculas se puede explicar también por la alteración estructural y funcional de las membranas celulares. Unos autores opinan que este cambio en las membranas impide la entrada de precursores metabólicos y como consecuencia la síntesis normal de ácidos nucleicos y proteínas (Luthra y Rosenkrantz, 1.974; Laurent y Roy, 1.975; Nahas y col., 1.976). Sin embargo Nahas no descarta que fuese la inhibición de la síntesis de ADN y ARN lo que provocara la alteración de las proteínas enzimáticas de las membranas. Por el contrario, Blevins y Regan (1.976) defienden la hipótesis de que esta alteración de las membranas provoca la salida de lo que constituye la reserva intracelular normal de precursores y se ha comprobado que esta reserva disminuye hasta en un 50% (Mc Lean y Zimmerman, 1.976).

Otros autores opinan que esta disminución en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas puede ser debida a la utilización de biopolímeros como sustrato oxidativo debido a restricciones en la entrada de glucosa extracelular por alteración del mecanismo de transporte a través de membrana (Repetto y col., 1.981 a).

Cualquiera que sea el mecanismo por el cual se inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas esto repercute de forma muy importante en la

actividad celular normal. Así hay que destacar las anomalías de la mitosis observadas en cultivos celulares de linfocitos de fumadores habituales de marihuana (Leuchtenberger y Leuchtenberger, 1.972; Miras y col., 1.978) y de no habituales (Morishima y col., 1.976) con aparición de alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas, por afectación de la propia estructura molecular de los cromosomas y deterioro en la formación de microtúbulos y del huso acromático.

Tanto por afectación de la membrana celular como de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas o por un efecto directo sobre ellos deben quedar alterados otros sistemas enzimáticos intracelulares. Este ha sido otro de los centros de interés en la investigación de los mecanismos de acción de los productos cannábicos.

Así se han considerado los sistemas enzimáticos hepáticos del metabolismo general de las drogas. En humanos parece ser que se inducen estos sistemas, pero no se ha podido confirmar en experimentación animal. Algunos autores opinan que la inducción en humanos se debe al efecto de los productos de pirólisis y pirosíntesis presentes en el humo de los cigarrillos de marihuana (Kuffer y col., 1.973; Marcotte y col., 1.975; Gunnar y col., 1.976).

Poddar y Ghosh (1.972 a, b, 1.973) estudian el efecto del extracto del cannabis y del THC y el CBD por separado y observan una ligera inducción de distintas enzimas hepáticas del metabolismo de aminoácidos, triptófano oxidoreductasa,  $\alpha$ -cetoglutarato-transaminasa, triptófano pirrolasa; enzimas cuyo carácter inducible se ha estudiado muy a fondo, modificados por otras drogas psicoactivas y por variaciones en la dieta. Pero los resultados que obtienen son de difícil interpretación.

Años después, este mismo equipo (Mitra y col., 1.976, Ghosh y col., 1.977) concluye que el  $\Delta^1$ THC parece no producir daño hepático alguno si bien en tratamientos crónicos durante 21 días, 10 mg/Kg i.p. observan en microsomas un incremento de proteínas, ARN, fosfolípidos, colesterol, glucosa-6-fosfatasa y Mg-ATPasa y una inhibición de la peroxidación de lípidos y de distintas desmetilasas. También aparecen fuertemente inhibidas, in vitro, la NADH oxidasa mitocondrial de cerebro y corazón de rata, localizándose la acción en la cadena respiratoria en el mismo

lugar que el amital (citocromo C) (Bartova y Birmingham, 1.976) y también se inhibe el metabolismo hepático de esteroides (List y col., 1.977; Cham y Tse, 1.978).

El  $\Delta^1$ THC inhibe también la aminopirina desmetilasa y la arilhidroxilasa inducidas por fenobarbital o metilcolantreno (Friedman, 1.976). Si el  $\Delta^1$ THC y el inductor enzimático se administran simultáneamente la interacción no tiene lugar. El mismo efecto ejerce sobre la aminotransferasa y la triptófano oxigenasa hepáticas inducidas por los esteroides, aunque no aparece el efecto si la inducción se hace por triptófano (Friedman y Wrenn, 1.977).

En este mismo sentido nuestro equipo ha investigado en rata la capacidad inductora o inhibidora del extracto de cannabis y su interacción con inductores enzimáticos potentes como el fenobarbital. Nuestros resultados parecen indicar un marcado efecto inhibidor de las oxidasas de función mixta medidas como NADPH diaforasa y arilhidrocarburo hidroxilasa, tanto en tratamientos crónicos como agudos (Sanz y col., 1.983). La administración simultánea de dosis agudas de resina de cannabis y de fenobarbital bloquea totalmente el efecto inductor del fenobarbital. Esta misma acción se ha observado sobre la NADPH cit.P<sub>450</sub> reductasa siendo el efecto inhibidor del cannabis semejante al del dietilditiocarbamato (Sanz y col., 1.988).

Por otra parte se había observado en los adictos al cannabis, que al principio se les despierta un gran apetito con deseos de comer dulces para pasar después a inapetencia y pérdida de peso. Esto hizo pensar que se producía una alteración en el metabolismo de la glucosa.

En el estudio de este parámetro no existe acuerdo, ya que los primeros autores detectan hipoglucemia después de distintos tratamientos con cannabis (Beringer y col., 1.932; Lindeman, 1.933). Años más tarde Sengupta y Bhattacharya, (1.973) observan una inhibición de las disacaridasas intestinales lo que dificultaría la absorción de la glucosa y podría explicar la hipoglucemia. Sin embargo existen resultados contradictorios ya que mientras unos autores opinan que no existe alteración en la glucosa sérica (Hollister y col., 1.968; Weil y col., 1.969; Repetto y col., 1.979), otros observan una hiperglucemia

(Mayor's Committee in Marihuana, 1.944; Carbonaro e Imbasi, 1.948; El-Souroy y col., 1.966) y hasta incluso se ha descrito un coma diabético originado por alta dosis de cannabis (Hughes, 1.970). En 1.978 Pasquale y col. en perros tratados con un extracto de resina, observan una hiperglucemia transitoria inicial, reestableciéndose la normalidad con rapidez. Estos autores concluyen que el cannabis produce una disminución de la tolerancia a la glucosa. Esto está de acuerdo con los trabajos de Kephalas y col. (1.973) realizados en ratas diabéticas sometidas a una sólo dosis de resina de cannabis por vía i.p., que observan una disminución de glucosa con aumento de insulina en sangre a los 30 minutos de la administración.

Junto a todas las contradicciones que aparecen en la bibliografía sobre los niveles de glucosa, parece existir acuerdo en que el cannabis produce un fuerte decremento del glucógeno hepático, tanto en tratamiento agudo como crónico (El-Souroy y col., 1.966; Sprague y col., 1.973; Repetto y col., 1.979, 1.981 b).

Nuestro equipo se ha interesado en las distintas vías enzimáticas implicadas en el metabolismo de la glucosa en rata.

En una primera etapa, estudiamos y confirmamos el decremento del glucógeno como uno de los efectos iniciales y más llamativo de la administración de resina de cannabis, en tratamiento agudo y crónico de distinta duración. Esta disminución no va acompañada de alteraciones significativas en los niveles de glucosa sérica o intrahepática.

Consideramos que la alteración de los lípidos de la membrana, producida por el cannabis, podría ser uno de los mecanismos de acción molecular primario de los cannabinoides, ya que ésta se traduce en una modificación de su función y ésta a su vez provoca una cadena de alteraciones bioquímica.

Por ello, se estudió en primer lugar la actividad de la G-6-Pasa, enzima de membrana responsable de la salida de glucosa libre desde el citoplasma a la sangre. Esta enzima se encuentra inhibida tanto en tratamiento agudo como crónico y la inhibición es mayor a medida que aumenta la duración del tratamiento crónico (Repetto y col., 1.981 a).

Este hecho explica que la glucosa procedente de la desaparición de glucógeno no repercute en un aumento de la glucosa circulante. Por lo tanto es necesario buscar la vía intracelular de consumo de la glucosa.

Estudiamos por tanto una de las enzimas clave de la glucólisis, la fructosa-1,6-diP-aldolasa.

En los primeros trabajos realizados observamos que los cannabinoides parecen actuar en las células hepáticas aumentando algunas de las vías del metabolismo de la glucosa, de tal forma que toda la que se libera a partir del glucógeno se consume rápidamente, tanto en la intoxicación aguda como en la crónica. La vía glucolítica se encuentra ligeramente activada, alcanzando un máximo a las 12 horas en el tratamiento agudo y a las cuatro semanas en el crónico, sin embargo el consumo de glucosa deducido de los valores observados de glucógeno parece superior al correspondiente a la activación de esta vía. El transporte de glucosa a través de las membranas celulares no se activa en la intoxicación aguda, más bien se inhibe, sin embargo, sí hay afectación en tratamientos crónicos prolongados, por posible deterioro celular.

A partir de estos conocimientos hemos abordado el estudio de otras vías metabólicas que pudiesen estar implicadas.

**POTENCIAL APLICACION  
TERAPEUTICA**

## POTENCIAL APLICACION TERAPEUTICA

No podemos terminar la revisión de las propiedades y efectos del cannabis, sin aludir a su posible empleo como medio terapéutico.

Entre los variados efectos de esta droga de abuso, algunos de ellos ha despertado el interés del mundo médico para su potencial utilidad terapéutica. Así se han ensayado productos cannábicos, tanto naturales como de síntesis, para combatir la ansiedad, el insomnio, la depresión, el asma, el dolor, el glaucoma, como relajante muscular, como anticonvulsivante, como antiemético y para la inhibición tumoral (Cohen y Stillman, 1.976; Nida y Cohen, 1.980).

Miembros del Instituto Nacional del Cáncer (USA, 1.981), calificaron al THC como "una importante esperanza en la terapia del cancer". Aunque su utilización más prometedora es como antiemético en la terapia anticancerosa, ya que está demostrada su eficacia cuando fallan otros antieméticos (Sallan y col., 1.980; Gunby, 1.981), el uso terapéutico se encuentra limitado por sus efectos tóxicos (Colls, 1.980; Green y Roth, 1.980; Schlegel y Norris, 1.980). Los peligros y la utilidad terapéutica del cannabis requieren una mayor atención de la profesión médica y de la comunidad científica (American Medical Association, 1.981).

## PARTE EXPERIMENTAL

## **PLAN DE TRABAJO**

## HIPOTESIS DE TRABAJO

A la vista de los resultados obtenidos en los trabajos previos, realizados sobre tratamientos agudos y crónicos con resina de cannabis, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo:

El objetivo sería profundizar en el conocimiento del efecto de los cannabinoides sobre el metabolismo hepático de la glucosa en rata; para ello realizaríamos un seguimiento de la glucosa producida en el hepatocito, a consecuencia de la degradación del glucógeno que, sabemos, induce el cannabis; nos interesaría también conocer cual es la participación que en estos efectos tienen los diferentes cannabinoides, o al menos, las dos formas principales, es decir, la resina, como conjunto global de cannabinoides y el tetrahidrocannabinol, el componente reconocido como de mayor actividad psicotropa.

A tal objeto, además de medir los niveles de glucógeno, glucosa hepática y glucosa sérica, vamos a controlar la ruta glucolítica (fosfofructoquinasa), la vía de las pentosas fosfato (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), la vía de la eliminación (desintoxicación) por formación de glucurónidos (uridindifosfo deshidrogenasa).

Por otra parte, nos interesa comprobar en ratas si se produce el aumento inicial transitorio de amoníaco sanguíneo relacionado con una disminución paralela de insulina, observados en perros por otros autores (Pasquale y col., 1.978). En caso positivo, buscaríamos la repercusión de este hecho en el metabolismo hepático de eliminación del amoníaco (glutamina sintetasa), y en definitiva, considerar globalmente la acción de los cannabinoides sobre las rutas metabólicas representadas en el esquema (Fig. 13).

Consecuentemente elaboramos el siguiente plan de trabajo.

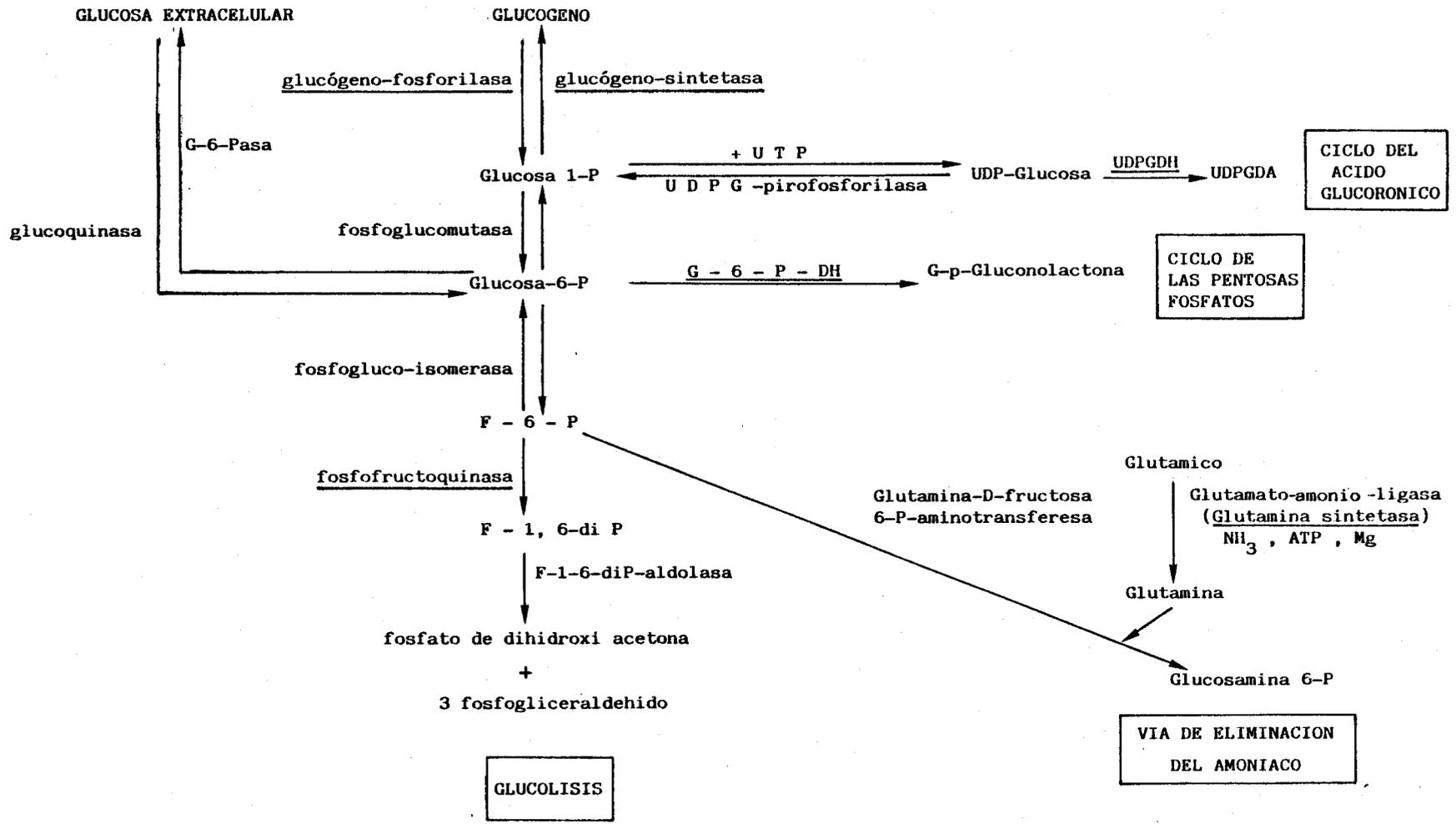


Fig.13: ESQUEMA DE LAS DIFERENTES RUTAS METABOLICAS DE LA GLUCOSA

## PLAN DE TRABAJO

1.- Estudio de la intoxicación aguda con dosis altas. El sacrificio de los animales se realiza a las 4 horas de la administración, momento en que habíamos observado el máximo efecto. Con este estudio se pretenden comprobar las hipótesis surgidas de trabajos anteriores.

1.1.- Tratamiento con una sola dosis de extracto de resina de cannabis, correspondiente a 200 mg de THC/Kg.

1.2.- Tratamiento con una sola dosis de 200 mg/Kg de tetrahidrocannabinil puro.

En ambos tratamientos se determina:

- Glucógeno hepático
- Glucosa hepática
- Glucosa sérica
- Fosfofructoquinasa
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- Uridindifosfoglucosa deshidrogenasa
- Glutamina sintetasa

2.- Estudio de la intoxicación aguda con dosis bajas y su evolución temporal.

2.1.- Tratamiento con una sola dosis de extracto de resina de cannabis, correspondiente a 10 mg THC/Kg, que es aproximadamente lo que contiene un cigarrillo de marihuana o de hachis. El sacrificio de los animales se realiza a los 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 5, 12 y 24 horas de la administración.

Se determina:

- Glucógeno hepático
- Glucosa hepática
- Glucosa sérica
- Fosfofructoquinasa
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- Uridindifosfoglucosa deshidrogenasa
- Amoníaco en sangre

- Glutamina sintetasa.

2.2.- Tratamiento con una sola dosis de 10 mg/Kg de tetrahidrocannabinol puro. El sacrificio de los animales se realiza a los 15, 30, 45 minutos, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 12 y 24 horas.

Se determina:

- Glucógeno hepático
- Glucosa hepática
- Fosforilasa
- Glucosa sérica
- Fosfofructoquinasa
- Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
- Uridindifosfoglucosa deshidrogenasa
- Amoníaco en sangre
- Glutamina sintetasa
- Insulina sérica.

## **MATERIAL Y METODOS**

**Material**

## MATERIAL

### 1.- Animales

La elección del animal de laboratorio viene condicionada por el tipo de investigación a realizar. En nuestro caso hemos utilizado roedores, concretamente ratas, pertenecientes a la categoría de agnotobióticos y dentro de ella, haloxénicos o convencionales. Son por tanto individuos sanos procedentes de criaderos de máxima garantía, con una flora microbiana normal lo que permite respuestas fisiológicas y metabólicas normales.

Se han utilizado 280 ratas albinas, machos adultas de 180-200 gramos de peso, Wistar, suministradas por IFFA-CREDO Lyon (Francia), y remitidas por vía aérea.

Todo el trabajo experimental se ha realizado con un solo sexo (macho) ya que habíamos comprobado anteriormente que no influía en los parámetros estudiados (Rodríguez-Vicente, 1.981), y hemos querido introducir el menor número posible de variantes para obtener resultados más homogéneos.

En experimentación animal no hay que considerar sólo las características genéticas del animal y el estado de salud al comienzo del experimento sino que además hay que tener en cuenta los factores ecológicos, para lo cual el experimentador debe tomar conciencia de las condiciones de mantenimiento de estos animales. Por ello, durante toda la experimentación se ha utilizado un estabulario o bioterio de mantenimiento que cumple las líneas directrices relativas al alojamiento y a los cuidados de los animales (Directiva 86/609/CEE, 1.986) y Real Decreto 223/1.988 de 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los factores que se han controlado son tanto los que influyen en el macroambiente (sala en que se mantienen los animales) como en el microambiente (interior de la jaula en que se alojan):

- Factores microbianos: se han tenido en cuenta tanto el estado de salud de los animales, con análisis bacterianos de rutina realizados periódicamente, como el control sanitario de salas, aire, jaulas,

accesorios, cama, dieta y agua. Asimismo se han cumplido las normas de higiene y protección para los propios cuidadores e investigadores, en contacto directo o indirectamente con los animales.

- Factores físicos: El sistema de ventilación ha garantizado ciclos de 15-20 renovaciones de aire filtrado por hora que alcanza por igual a todas las jaulas. La temperatura, constante en todas las épocas del año, ha sido de  $22^{\circ}\text{C} \pm 1$  y la humedad relativa de  $55\% \pm 10$ . Se han alternado ciclos de luz oscuridad de 12 horas, con lámparas de luz fría de 40 W de potencia.

- Factores químicos: Se ha reducido al mínimo el posible contacto de los animales con productos químicos, mediante control de posibles contaminantes de dieta y agua; y cumplimiento de las normas para la limpieza de animalarios y jaulas con utilización de los detergentes y desinfectantes recomendados.

A la recepción de los animales, se han mantenido en una sala de cuarentena durante 7 días, al final de la cual se someten a controles físicos y sanitarios antes de su utilización.

Las jaulas utilizadas han sido de metacrilato (Tecniplast Tipo 3) con suelo de rejilla de acero inoxidable, recomendadas para estudios de toxicidad para evitar el polvo y contaminantes procedentes de los lechos. Permiten una buena circulación de aire y evitan condensación de humedad y concentración de calor lo que daría lugar a microclimas en el interior de la jaula, diferentes de las condiciones controladas en la sala correspondiente.

La alimentación, ad libitum, consistió en pienso Sanders, especial para ratas, de la siguiente composición:

- Glúcidos.....	69%
- Proteínas brutas.....	18%
- Grasas.....	3%
- Fibra bruta.....	5%
- Sustancias minerales.....	5%

El agua suministrada fue de la red local.

Semanalmente se controla el peso, el consumo de agua y alimento y dos veces al día se realizan los controles físicos de todos los animales.

Todos los datos, tanto de los factores ambientales como de los animales, se registran diariamente y las hojas correspondientes se archivan cumpliendo así las normas de buena práctica de laboratorio, incluido lo referente a SOP. (GLP OCDE, 1.981; CEE, 1.987).

## 2.- Productos utilizados en los tratamientos

2.1.- Extracto crudo de Cannabis: se ha preparado en nuestro laboratorio a partir del producto bruto suministrado por la Delegación Territorial del Ministerio de Sanidad y Consumo. Se sometió a una extracción con éter de petróleo, en proporción 25% (p/v), mediante calentamiento a reflujo durante 15 minutos, enfriando y filtrando a continuación. Se repite la extracción dos veces y el extracto orgánico se concentra en rotavapor, a presión y temperatura reducidas, hasta obtener la resina.

La resina obtenida se valora por cromatografía gaseosa (véase apartado 4.10) (Repetto y Martínez, 1.975) y se disuelve en aceite de oliva hasta obtener la concentración deseada en THC para cada tratamiento.

2.2.- Tetrahidrocannabinol en solución metanólica suministrada por Makkor Chemicals (Israel).

2.3.- Aceite de oliva de 0'4º de acidez, utilizado como vehículo, cuya inocuidad en este tipo de estudios fué comprobada con anterioridad (Rodríguez Vicente , 1.981).

### 3.- Reactivos

Los reactivos utilizados se relacionan con cada método analítico, dentro del apartado 3, de Métodos; en los de carácter general, siempre que fue posible se emplearon de "grado para análisis".

#### 4.- Aparatos utilizados

4.1.- Balanza granatario Mettler P.E. 2000 provista de cubilete para pesar animales y de un integrador que hace la media de 10 pesadas.

4.2.- Balanza analítica Mettler AE 240.

4.3.- Balanza semianalítica Mettler PJ 3000.

4.4.- Centrifuga Beckman J2-21.

4.5.- Centrifuga Sigma 201.

4.6.- Baño Selecta Unitronic 320 OR con agitación orbital.

4.7.- pHmetro HI-8418 Hanna Instruments.

4.8.- Espectrofotómetro Uvikon 860 de la firma Kontron Instruments equipado con Plotter 800 de la misma firma.

4.9.- Espectrofotómetro visible-ultravioleta Spectronic 20 Bausch & Lomb.

4.10.- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5710 A, equipado con detector de ionización de llama FID, con columna semicapilar de 530  $\mu$  de diámetro interno con fase estacionaria de metilsilicona y con integrador Hewlett-Packard 3388 A.

4.11.- Microtomo-Criostato International Equipment Company de la Damon/IEC Division.

4.12.- Microscopio Nikon Microflex AFY-35 con equipo de fluorescencia y de fotografía.

4.13.- Congelador Koxka (- 80 $^{\circ}$ ).

4.14.- Fotocolorímetro Ammonia Checker de la firma A. Menarini Divisione Diagnostici.

4.15.- Ordenador IBM 5170 Enhanced color display.

## **Metodos**

## METODOS

### 1.- Modelo Animal

Los animales se agruparon en lotes de 5, estimado este número mediante test estadístico de tamaño de muestra a partir de resultados obtenidos en ensayos piloto previos. Se realizaron los siguientes tipos de tratamiento:

1.1.- Control vehículo: animales a los que se administró por vía s.c. una dosis única de aceite de oliva de 0'5 mL.

1.2.- Tratados con resina de cannabis: recibieron por vía s.c. una dosis única de resina disuelta en aceite de oliva. A los lotes A se les administró una dosis equivalente a 10 mg/Kg, a los C 200 mg/Kg de THC.

1.3.- THC puro: a estos animales se les administró por vía s.c. una dosis única de 10 mg/Kg a los lotes B y de 200 mg/Kg a los lotes D. El THC también se disolvió en aceite de oliva.

Todos los animales recibieron en la administración el mismo volumen que fue de 0'5 mL/rata.

El sacrificio se realizó por decapitación a distintos tiempos desde la administración que se especifican para cada tratamiento en el plan de trabajo.

En todos los experimentos se llevaron en paralelo lotes control vehículo que se mantuvieron en las mismas condiciones que los tratados.

## 2.- Sacrificio de los animales y preparación de los tejidos

2.1.- Sacrificio y necropsia: El sacrificio de los animales se llevó a cabo por decapitación, mediante guillotina, para que la muerte sea instantánea y así evitar la alteración de los niveles enzimáticos y de glucógeno por el estrés.

Inmediatamente se procede a hacer una toma de sangre en la que se determina la concentración de amoníaco en sangre total. Este análisis debe realizarse con rapidez para evitar pérdidas de amoníaco por volatilización. El resto de la sangre se deja coagular para separar suero, mediante centrifugación a 250 g durante 5 minutos.

A continuación se procede a realizar la necropsia del animal y después de un estudio macroscópico de rutina, para ver posibles alteraciones, se separa el hígado que se lava con solución salina fisiológica a 4<sup>o</sup> C.

El hígado se divide en varias porciones: se separa un trozo de un gramo para determinar glucógeno, una pequeña parte para la determinación de fosforilasa por método histoquímico y el resto se fracciona y se pesa. Tanto la porción separada para estudio histoquímico como las pesadas para obtener la fracción S<sub>2</sub> postmitocondrial se congelan con nitrógeno líquido y se almacenan a - 80<sup>o</sup>C hasta que se procesan.

2.2.- Homogeneización y fraccionamiento del hígado: Este órgano se homogeneiza en un homogeneizador Potter de émbolo de vidrio con tampón fosfato 0'1 M, 0'2 mM en ditiotreitól pH 8, a razón de 1/10 (p/v).

A continuación se filtra con nilón de 110 mallas para eliminar restos de células no rotas. Se centrifuga a 4<sup>o</sup>C y a 9.000 g durante 10 minutos (4.4), para separar la fracción S<sub>2</sub> (Fleischer y Dervina, 1.974). Se filtra con papel para eliminar lípidos y se mantiene a 4<sup>o</sup>C en un baño de hielo durante su manipulación.

### 3.- Métodos analíticos

#### 3.1.- Determinación de amoníaco en sangre:

3.1.1.- Método de Okuda y col., 1.978 modificado por Ratnaike y col. 1.984.

3.1.2.- Fundamento: Consiste en un método de microdifusión en placa para determinar amoníaco en sangre total. Al dispensar la sangre en el pocillo de la placa, el tampón alcalino libera el amoníaco que se difunde a través de la película de polipropileno hacia la zona de desarrollo de color. Un indicador de pH (verde de bromocresol) da una densidad de color, la cual es directamente proporcional a la concentración.

#### 3.1.3.- Reactivos:

- Placas de microdifusión conteniendo: 40  $\mu\text{g}$  de verde de bromocresol, 1'5 mg de carbonato sódico y 0'3 mg de bicarbonato sódico.

Estas placas son de la firma Menarini.

3.1.4.- Procedimiento: Se extraen 20  $\mu\text{L}$  de sangre total, mediante capilar graduado, se limpia bien el exterior del capilar y se deposita la sangre en el pocillo de la placa. Se cierra y se agita. La medida se realiza a los 15 minutos en un fotocolorímetro (4.14), previamente calibrado con una placa patrón. La prueba se debe realizar entre 15-30°C y en atmósfera exenta de amoníaco.

3.1.5.- Cálculos: El fotocolorímetro nos da directamente la concentración de amoníaco expresada en  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$  de sangre.

### 3.2.- Determinación de glucógeno en hígado:

#### 3.2.1.- Método de Seifter y col. (1.957).

3.2.2.- Fundamento: Se determina la glucosa formada, tras la digestión alcalina en caliente del hígado, midiendo el complejo coloreado que se forma con el reactivo de antrona.

#### 3.2.3.- Reactivos:

- KOH al 30%
- Patrón de glucosa de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Antrona al 0'2% en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado

Todos los reactivos utilizados son de la firma Merck.

3.2.4.- Procedimiento: Se toma 1 g de hígado y se le añaden 10 mL de KOH, se pone en baño de agua hirviendo durante 20 minutos hasta que se produce la digestión del órgano.

Una vez fría la mezcla de digestión se pasa a un matraz aforado de 50 mL y se enrasa con agua destilada. Se vuelve a diluir tomando 1 mL de la disolución anterior y llevando de nuevo a 50 mL con agua destilada en matraz aforado.

Se preparan 3 tubos (blanco, patrón y problema) y en cada uno se pone respectivamente 5 mL de agua destilada, 5 mL de la disolución patrón de glucosa y 5 mL de la disolución preparada del hígado. Colocando los tubos en un baño de hielo picado se añade a cada uno 10 mL de reactivo de antrona, se tapan con canicas y se ponen en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos.

Se enfrían y se lee a 620 nm (4.9) tanto el patrón como el problema frente al blanco.

3.2.5.- Cálculos: Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  de glucógeno/mg de hígado. El factor de conversión de la densidad óptica en glucógeno es:

$$\frac{100 \text{ . D.O. problema}}{1'11 \text{ . D.O. patrón}}$$

El factor determinado por Morris (1.948) para la conversión de glucosa en glucógeno según esa reacción, es = 1'11.

### 3.3.- Determinación de glucosa:

3.3.1.- Método de la glucosa oxidasa de Werner y col. (1.970).

3.3.2.- Fundamento: Consiste en la oxidación de la glucosa a gluconato con producción de  $H_2O_2$ , que con el reactivo 2,2'-azino-di-3-etil-benzotiazolina-ácido sulfónico-6 sal diamónica (ABTS) forma un compuesto coloreado.

3.3.3.- Reactivos:

- Acetato de uranilo.
- Solución patrón de glucosa 0'505 mM.
- Tampón/enzimas/cromógeno: tampón fosfato 100 mM, peroxidasa (POD) 0'8 U/mL, glucosa oxidasa (GOD) 10 U/mL y ABTS 1'0 mg/mL.

Todos los reactivos utilizados han sido de la firma Boehringer Mannheim.

3.3.4.- Procedimiento: Determinamos la glucosa tanto en suero como en el extracto hepático. En dos tubos de centrifuga se pone 1 mL de acetato de uranilo y 0'1 mL de suero y en el otro 0'1 mL de la fracción  $S_9$  de hígado para desproteinizar. Se centrifuga a 1.000 g durante 5 minutos y se separa el sobrenadante.

En tubos de ensayo se prepara un blanco al cual se añade 0'1 mL de agua destilada, un patrón con 0'1 mL de la solución estandar de glucosa y el problema con 0'1 mL de los sobrenadantes separados anteriormente. A continuación se añade a cada tubo 5 mL de la solución tampón/enzimas/cromógeno y se mezcla. Se mantienen 5 minutos en baño termostático (4.6) a 37°C.

Se lee la absorción a 435 nm (4.9) del patrón y problemas frente al blanco.

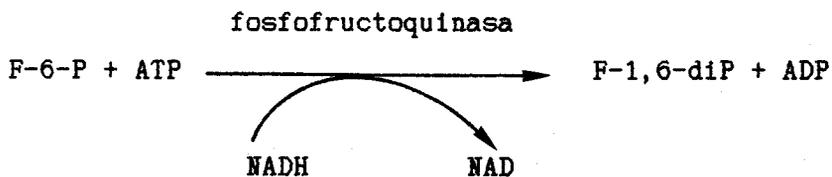
3.3.5.- Cálculo: La concentración de glucosa se expresa en mg/100 mL de suero o extracto hepático.

$$\text{Concentración de glucosa} = \frac{\text{D.O. problema}}{\text{D.O. patrón}} \cdot 100$$

### 3.4.- Determinación de fosfofructoquinasa (E.C. 2.7.1.11).

#### 3.4.1.- Método de Ling y col. (1.966).

3.4.2.- Fundamento: La actividad de la enzima se mide por medio de la cinética de la reacción siguiente:



Como sustrato actúa la fructosa-6-P que pasa a F-1,6-diP y el ATP pierde un P y pasa a ADP. En la reacción actúa como coenzima el NADH que se oxida a NAD<sup>+</sup>. Se determina la desaparición de NADH, y cada mol de NADH oxidado corresponde con un 1 mol de F-6-P transformada.

#### 3.4.3.- Reactivos:

- Tampón Tris ClH 0'2 M pH 8.
- ATP 0'02 M pH 7.
- SO<sub>4</sub>Mg 0'2 M.
- F-6-P-K<sub>2</sub> 0'02 M.
- NADH 2'4 mM.
- ClK 0'2 M.
- Ditiotreitól 0'1 M.
- GDH-TIM 10 mg/mL
- Aldolasa 10 mg/mL
- Albúmina bovina.

Todos los reactivos utilizados han sido de la marca Sigma.

3.4.4.- Procedimiento: Se prepara la mezcla reactiva que contiene: 500 μL de tampón Tris ClH, 300 μL de ATP, 75 μL de SO<sub>4</sub>Mg, 300 μL de F-6-P-K<sub>2</sub>, 200 μL de NADH, 750 μL de ClK, 30 μL de ditiotreitól, 200 μL de una mezcla de enzimas que contiene 50 μL de GDH-TIM en 4,7 mL de tampón Tris ClH 0'01 M pH 8 que contiene albúmina y 250 μL de aldolasa, y se completa hasta 4 mL con agua destilada.

Se pasa a una cubeta de cuarzo y se añade 50  $\mu\text{L}$  de la fracción  $S_9$  de hígado. Se realiza la cinética a 340 nm durante 6 minutos, cada minuto (4.8).

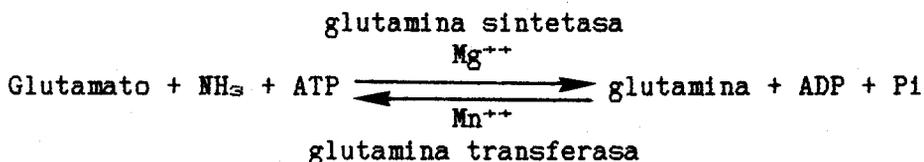
3.4.5.- Cálculo: La actividad enzimática se expresa en  $\mu\text{moles}$  de NADH desaparecidos/mL de extrato/mg de proteína/minuto.

$\Delta \text{D.O.}_{340 \text{ nm}} = 0'207$  corresponde a 0'1  $\mu\text{mol}$  de NADH desaparecido.

### 3.5.- Determinación de glutamina sintetasa (E.C.6.3.1.2.):

#### 3.5.1.- Método de Rowe y col. (1.969).

3.5.2.- Fundamento: Este método se basa en la formación de glutamina a partir de glutamato y amoníaco. La reacción tiene lugar en presencia de ATP, que pasa a ADP con la liberación de fósforo inorgánico que es lo que se mide. Requiere la presencia de magnesio.



#### 3.5.3.- Reactivos:

- Tampón imidazol ClH 0'125 M pH 7'2
- Cl<sub>2</sub>Mg 0'2 M
- 2-mercaptoetanol 0'25 M
- L-glutamato sódico 0'5 M
- Hidroxilamina 1 M pH 7'2
- ATPNa 0'1 M
- Cl<sub>3</sub>Fe 0'37 M
- ClH 0'67 N
- Acido tricloroacético (TCA) 0'2 M

Todos los reactivos utilizados han sido de la marca Merck.

3.5.4.- Procedimiento: En tubo de centrifuga se prepara la mezcla reactiva que contiene: 800 µL de tampón imidazol ClH, 200 µL de Cl<sub>2</sub>Mg, 200 µL de 2-mercaptoetanol, 200 µL de L-glutamato sódico, 200 µL de hidroxilamina y 200 µL de ATP sódico.

Exactamente con las mismas cantidades se prepara un blanco al que se añade 100 µL de agua destilada, y al tubo problema 100 µL de extracto hepático. Se incuban a 37º C (4.6) durante 15 minutos.

Pasado este tiempo se detiene la reacción desproteinizando con 1'5 mL de Cl<sub>3</sub>Fe preparado en ClH 0'67 N y al que se adiciona TCA.

Se centrifuga a 1000 g (4.5) durante 5 minutos. Se separa el sobradanante y se mide la absorbancia a 535 nm (4.8) frente al blanco.

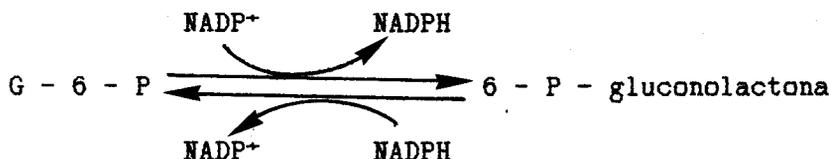
3.5.5.- Cálculo: La actividad de la enzima viene expresada en  $\mu$ moles de glutamil-hidroxámico/mg de proteína/mL de extracto/minuto.

$\Delta$  D.O.<sub>535 nm</sub> = 0'340 corresponde a un  $\mu$ mol de ac. glutamilhidroxámico formado en los 15 minutos de la reacción.

3.6.- Determinación de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.49):

3.6.1.- Método de Kornberg y Horecker (1.955).

3.6.2.- Fundamento: La actividad de esta enzima se mide por medio de la cinética de la siguiente reacción:



Como sustrato actúa la G-6-P y como coenzima el NADP<sup>+</sup> que se reduce a NADPH en presencia de magnesio.

3.6.3.- Reactivos:

- Tampón glicil-glicina 0'04 M pH 7'5.
- Glucosa-6-fosfato 0'2 mM.
- NADP<sup>+</sup> 1'5 mM.
- Cl<sub>2</sub>Mg 0'1 M.

Todos los reactivos utilizados han sido de la firma Sigma.

3.6.4.- Procedimiento: Mezcla reactiva: 300 μL de tampón glicil-glicina, 100 μL de G-6-P, 100 μL de NADP, 200 μL de Cl<sub>2</sub>Mg, se completa hasta 1 mL con agua destilada.

Se pasa a la cubeta y se añade 50 μL del extracto hepático y se realiza la cinética a 340 nm durante 6 minutos (4.8), frente a agua, siguiendo los cambios de absorbancia cada minuto.

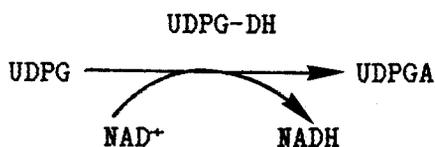
3.6.5.- Cálculo: La actividad enzimática viene expresada en μmoles NADPH/mL extracto/mg proteína/min.

Extinción molar del NADPH = 6'23 . 10<sup>3</sup>.

3.7.- Determinación de uridindifosfoglucosa deshidrogenasa (E.C.1.1.1.22):

3.7.1.- Método de Gainey y Phelps (1.972).

3.7.2.- Fundamento: El uridindifosfoglucosa es oxidado a ácido uridindifosfoglucurónico en presencia de  $\text{NAD}^+$  que se reduce a  $\text{NADH}$  y de la enzima uridindifosfoglucosa-deshidrogenasa. La reacción es la siguiente:



3.7.3.- Reactivos:

- Tampón Tris ClH 0'5 M pH 8'8.
- $\text{NAD}^+$  4mM.
- UDPG 2 mM.

3.7.4.- Procedimiento: Mezcla reactiva: 750  $\mu\text{L}$  de tampón Tris ClH, 750  $\mu\text{L}$  de  $\text{NAD}^+$  y 750  $\mu\text{L}$  de extracto hepático.

Se incuba a 30°C durante 2'5 minutos (4.6) e inmediatamente se añade 750  $\mu\text{L}$  de UDPG, se pasa a la cubeta de cuarzo y se realiza la cinética a 340 nm (4.8) observando los cambios de absorbancia que corresponden a la transformación de  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$ .

3.7.5.- Cálculo: La actividad enzimática se expresa en  $\mu\text{moles NADH/mL extracto/mg proteína/min}$ .

Un  $\Delta \text{DO}_{340} = 0'207$  corresponden a 0'1  $\mu\text{mol NADH/3 mL}$  del volumen total de reacción.

### 3.8.- Determinación de proteínas:

#### 3.8.1.- Método de Bradford (1.976).

3.8.2.- Fundamento: La determinación de proteínas por este método se basa en el incremento de absorbancia desde 465 nm a 595 nm de una solución de azul brillante de Coomassie G-250 cuando éste se une a proteínas.

#### 3.8.3.- Reactivos:

- Solución patrón de albúmina bovina de 1 mg/mL de concentración. A partir de ésta se preparan 3 patrones por dilución: Patrón 1: 0'1 mg/mL; Patrón 2: 0'2 mg/mL; Patrón 3: 0'5 mg/mL.
- Reactivo: tampón fosfato adicionado de azul brillante de Coomassie G-250.

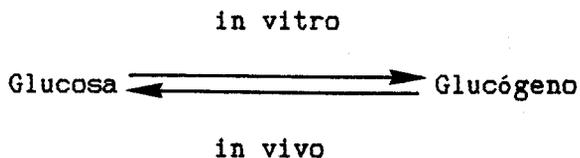
3.8.4.- Procedimiento: Se preparan cinco tubos a los que se añaden 100  $\mu$ L de solución salina fisiológica al blanco, 100  $\mu$ L de cada solución patrón preparada y 100  $\mu$ L del extracto hepático que previamente hemos diluido por 25. A continuación se añade a cada tubo 5 mL de la solución reactiva diluida por 4 con agua destilada y filtrada. Se mezcla cuidadosamente y se espera entre 5-60 minutos para medir la absorbancia a 595 nm (4.9).

3.8.5.- Cálculo: El contenido en proteínas de nuestro extracto hepático lo valoramos mediante una curva patrón que construimos a partir de los tres patrones. En ordenadas se coloca la D.O. obtenida y en abscisas la concentración en mg/mL de cada patrón. Es lineal la correspondencia mg prot./mL con la D.O. Hay que tener en cuenta la dilución que hemos efectuado al problema.

### 3.9.- Determinación de fosforilasa (E.C.2.4.1.1.):

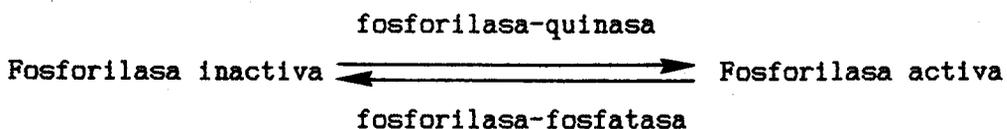
3.9.1.- Método de Takeuchi y Kuriaki (1.955) modificado (Guha y Wegmann, 1.961 y Erauko y Palkama, 1.961; GodLewski, 1.962).

3.9.2.- Fundamento: Este método se basa en la síntesis de moléculas de glucógeno a partir de glucosa.



La enzima fosforilasa cataliza la síntesis e hidrólisis de glucógeno; in vivo predomina la acción hidrolítica mientras que in vitro predomina la síntesis. La reacción está favorecida por la adición de glucosa-1-fosfato como sustrato y AMP como activador. La valoración de la fosforilasa se realiza a través del glucógeno neoformado que con el reactivo de lugol da una coloración azul y pardo caoba, correspondiente a cadenas no ramificadas y ramificadas respectivamente.

Esta enzima se presenta en forma activa e inactiva. En hígado predomina la forma inactiva y su activación depende de la enzima fosforilasa-quinasa.



y esta reacción se activa con AMP e insulina.

#### 3.9.3.- Reactivos:

- 100 mg de G-1-P.
- 10 mg de AMP Na<sup>+</sup>
- 2 mg de glucógeno.
- 18 mg de FNa.
- 10 ml de tampón acetato 0'2 M pH 6.
- 2 g de polivinil pirrolidona (P.V.P.)

- 2 unidades de insulina.
- 20 mg de EDTA.
- Solución de lugol (1 g I<sub>2</sub> + 2 g IK + 300 mL sacarosa 0'32 M).
- Reactivo de Schiff.

3.9.4.- Se realizan cortes de hígado en criostato de 10-12  $\mu$  de espesor. Se incuban a 37°C durante 2 horas en la solución de incubación, se lavan con agua destilada, a continuación se tratan con etanol al 40% y después con etanol de 95% durante 5 minutos. Se dejan secar al aire. Se tiñen con lugol hasta que aparece color. Se lavan y se observan al microscopio previamente montadas con glicerina-gelatina.

Paralelamente se llevaron cortes controles incubando sin G-1-P en el medio, y otros sin incubar.

3.9.5.- Cálculo: Como toda técnica histoquímica es semicuantitativa y los resultados se basan en datos comparativos entre los controles y los cortes problemas a los que se asignan unos valores previamente establecidos por el observador.

### 3.10.- Determinación de insulina:

3.10.1.- Método enzimoinmunológico (ELISA). Esta técnica mostró en suero de ratas una enorme variabilidad y escasa reproducibilidad lo que nos obligó a desecharlo.

3.10.2.- Método radioinmunológico (RIA). Como consecuencia de lo anterior, la valoración de insulina en el suero de los animales fué realizada por RIA en "Reference laboratory", de Barcelona, especializado en determinaciones clínicas hormonales.

#### 4.- MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Se utilizó un programa estadístico SIGMA en un ordenador personal IBM (4.15).

4.1.- Estadística básica. Los datos obtenidos de cada uno de los parámetros en los distintos tratamientos y tiempos considerados se sometieron a estadística básica (cálculo de la media, desviación tipo, tamaño de muestra, valores máximo y mínimo, rango, error estandar, coeficiente de variación).

4.2.- Comparación de medias de cada parámetro entre animales control y cada tiempo de sacrificio de cada uno de los tratamientos.

Se utilizó un contraste de medias para muestras independientes en el que se calcula la diferencia entre las dos medias y se comprueba si esta diferencia está dentro de los límites esperados debidos al azar.

Cuando las varianzas son homogéneas estos límites se calculan con el error estandar de la diferencia a partir de la desviación típica media ponderada de las dos muestras, y el contraste se realiza con un t de Student para  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad.

Cuando las varianzas no son homogéneas el error estandar se estima a partir de las desviaciones típicas individuales de cada muestra en vez de utilizar su media ponderada, y el contraste se realiza con la t de Student y además con una F de Fisher.

4.3.- Comparación de medias de cada parámetro dentro de un mismo tratamiento para ver la significación de la influencia del tiempo de sacrificio.

En cada tratamiento y parámetro se comparó cada uno de los valores de cada tiempo con el inmediato anterior mediante un contraste de medias para muestras independientes igual al descrito en 4.2.

4.4.- Comparación de medias entre tratamientos para cada parámetro determinado y tiempo de sacrificio.

Se utilizó igualmente un contraste de medias para muestras independientes.

## **RESULTADOS**

## RESULTADOS

Tras la puesta a punto de los métodos analíticos seleccionados, en animales control no tratados, se estudió la estabilidad de las actividades enzimáticas que se iban a determinar. Este ensayo se realizó en homogeneizado hepático de animales control, que previamente se había alicuotado y mantenidas unas alicuotas a 4°C y otras a -80°C. Las determinaciones se realizaron el mismo día del sacrificio y 1, 2, 3 y 4 semanas después.

Se concluyó que no había pérdida de actividad de las enzimas estudiadas, tanto si se congelaba el órgano en nitrógeno líquido, inmediatamente después del sacrificio y se mantenía a -80°C, como si se congelaba la fracción S<sub>9</sub> una vez preparada.

Los resultados de estos ensayos previos no se recogen en la presente Memoria.

En la primera tabla (TABLA 0) aparecen reflejadas las unidades en que se expresan todos los parámetros bioquímicos determinados en este trabajo.

TABLA 0.

RELACION DE UNIDADES EN QUE SE EXPRESAN LOS PARAMETROS BIOQUIMICOS CONTENIDOS EN LAS TABLAS QUE SIGUEN.

PARAMETROS	UNIDADES	ABREVIATURAS
GLUCOGENO	MICROGRAMOS DE GLUCOGENO POR MILIGRAMO DE HIGADO	$\mu\text{g}/\text{mg}$
GLUCOSA	MILIGRAMOS DE GLUCOSA EN 100 MILILITROS DE SUERO O EXTRACTO HEPATICO	$\text{mg}/100\text{mL}$
AMONIACO	MICROGRAMOS DE AMONIACO EN 100 MILILITROS DE SANGRE	$\mu\text{g}/100\text{mL}$
INSULINA	MICROUNIDADES DE INSULINA POR MILILITRO DE SUERO	$\mu\text{U}/\text{mL}$
PFK	MILIMICROMOLES DE NADH POR MILIGRAMO DE PROTEINA POR MILILITRO DE EXTRACTO POR MINUTO	$\text{m}\mu\text{mol}/\text{mg prot}/\text{mL}/\text{min.}$
G-6-P DH	MILIMICROMOLES DE NADPH POR MILIGRAMO DE PROTEINA POR MILILITRO DE EXTRACTO POR MINUTO	$\text{m}\mu\text{mol}/\text{mg prot}/\text{mL}/\text{min.}$
UDPG DH	MILIMICROMOLES DE NADH POR MILIGRAMO DE PROTEINA POR MILILITRO DE EXTRACTO POR MINUTO	$\text{m}\mu\text{mol}/\text{mg prot}/\text{mL}/\text{min.}$
Gln-SINTETASA	MILIMICROMOLES DE GLUTAMIL HIDROXAMICO POR MILIGRAMO DE PROTEINA POR MILILITRO DE EXTRACTO POR MINUTO	$\text{m}\mu\text{mol}/\text{mg prot}/\text{mL}/\text{min.}$

Todos los datos que se fueron obteniendo, tanto de animales control como de los animales sometidos a los diferentes tratamientos y distintos tiempos de sacrificio, se sometieron al programa estadístico detallado en el apartado 4 de Métodos.

Todas las tablas que se incluyen a continuación corresponden a los resultados obtenidos para cada parámetro y cada actividad enzimática después de los distintos estudios estadísticos.

Los resultados se han agrupado por tratamientos. En el caso de los animales control y en tratamiento con resina a dosis de 200 mg THC/Kg, se recogen en una misma tabla los datos de todos los parámetros y actividades enzimáticas consideradas.

En los tratamientos con resina a dosis 10 mg THC/Kg y THC (10 mg/Kg) cada tabla corresponde a un sólo parámetro o actividad enzimática en los distintos tiempos de sacrificio.

Cada grupo de resultados contempla una tabla de valores medios acompañada de los datos de la estadística básica, una segunda tabla con la comparación estadística entre animales tratados y controles y un diagrama de barras que refleja las medias, el error estándar y la significación estadística.

Al final de cada tratamiento se ha incluido una tabla resultante del estudio estadístico de la evolución temporal del parámetro o actividad enzimática.

En todas las tablas la columna de Tamaño de la muestra se refiere al número de animales utilizados.

En las gráficas la barra rayada corresponde al valor medio de los animales control.

En la TABLA 1 aparecen los valores obtenidos de los distintos parámetros y actividades enzimáticas en ratas control.

TABLA 1

NIVELES DE LOS DISTINTOS PARAMETROS BIOQUIMICOS EN RATAS CONTROL.  
ESTADISTICA BASICA.

PARAMETRO	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
GLUCOGENO	58.60	16.80	2.04	28.67	68
GLUCOSA HEPATICA	107.37	30.66	4.42	28.55	48
GLUCOSA SERICA	120.18	21.99	2.94	18.29	56
PFK	44.11	17.70	2.83	40.13	39
G-6-P DH	6.39	3.01	0.43	47.13	49
UDPG DH	17.37	4.02	0.79	23.12	26
AMONIACO	69.47	18.23	4.70	26.24	15
Gln-SINTETASA	32.04	12.28	2.62	30.33	22
INSULINA	13.52	2.05	1.02	15.15	4

1.- Estudio de la intoxicación aguda con dosis altas.

1.1.- Tratamiento con una dosis única de resina de 200 mgTHC/Kg y sacrificio de los animales a las 4 horas de tratamiento (TABLAS 2.1 y 2.2 y Figuras 14 y 15).

Se observa un 58% de decremento de glucógeno hepático respecto al control como alteración más llamativa.

No se contempla modificación de la glucosa intrahepática ni de la glucosa sérica.

Las actividades enzimáticas relacionadas con la vía glucolítica (PFK) y la vía de las pentosas fosfato (G-6-P DH), están incrementadas. Así la PFK presenta un 12% de incremento y la G-6-P DH un 35% de activación.

Los resultados de la actividad de UDPG DH reflejan un incremento del 69% en los animales sacrificados a las 4 horas que llegó hasta el 94% cuando el sacrificio es a las 24 horas.

TABLA 2.1

NIVELES DE LOS DISTINTOS PARAMETROS BIOQUIMICOS EN RATAS TRATADAS s.c. CON RESINA DE CANNABIS (200 mg THC/kg) A LAS 4 HORAS DE TRATAMIENTO. ESTADISTICA BASICA.

PARAMETRO	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
GLUCOGENO	24.30	12.25	2.61	50.43	22
GLUCOSA HEPATICA	98.18	20.59	4.39	20.97	22
GLUCOSA SERICA	103.95	11.57	2.47	11.13	22
PFK	49.69	8.11	2.57	16.34	10
G-6-P DH	8.63	3.78	0.80	43.82	22
UDPG DH	29.47	10.91	3.63	37.02	9
Gln-SINTETASA	17.55	1.52	0.68	8.67	5

TABLA 2.1 (bis)

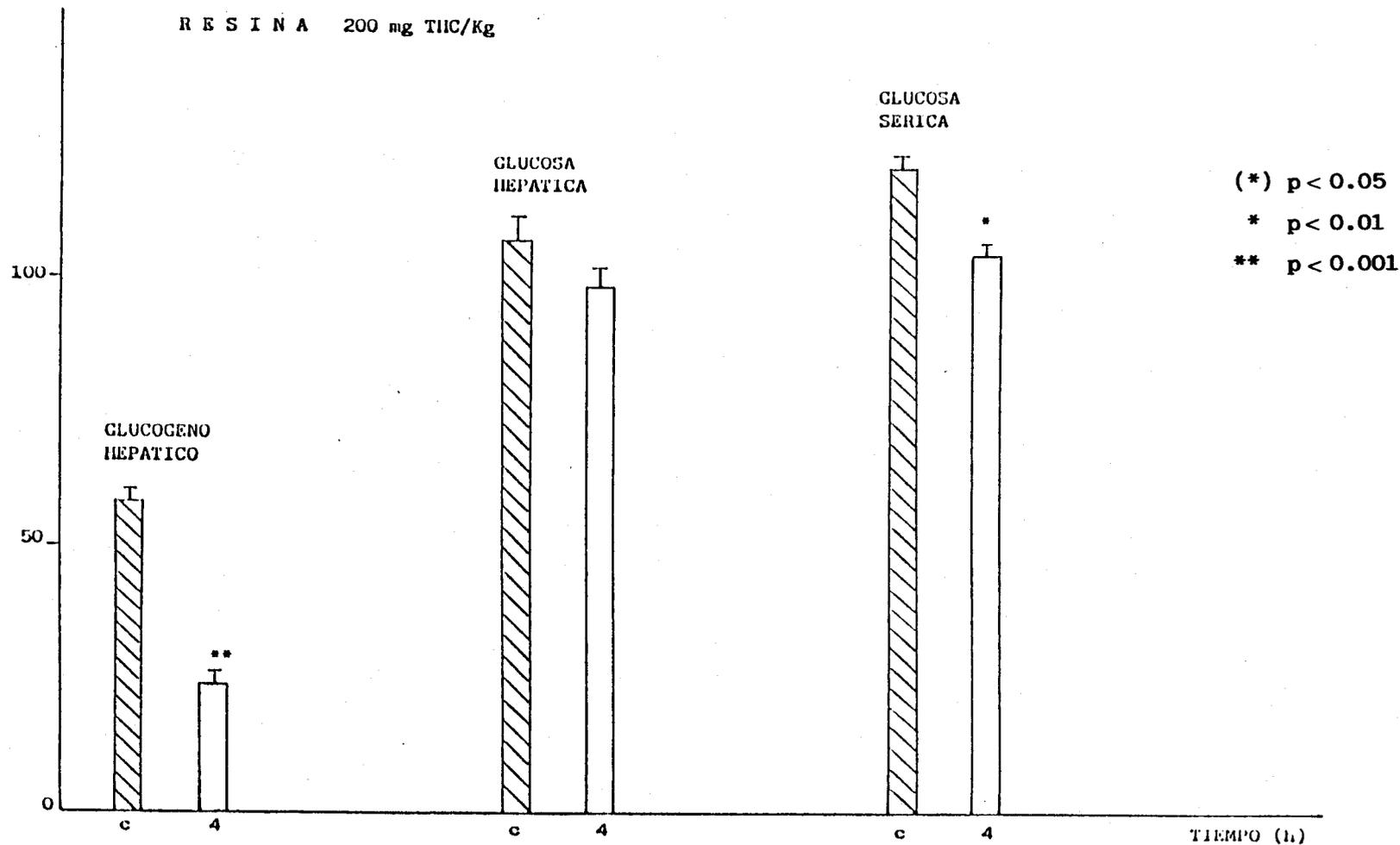
NIVELES DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE UDPG DH EN RATAS TRATADAS s.c. CON RESINA DE CANNABIS (200 mg THC/kg) A LAS 12 Y 24 HORAS DE TRATAMIENTO. ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
12	27.71	6.03	2.46	21.75	6
24	33.68	6.98	2.33	20.74	9

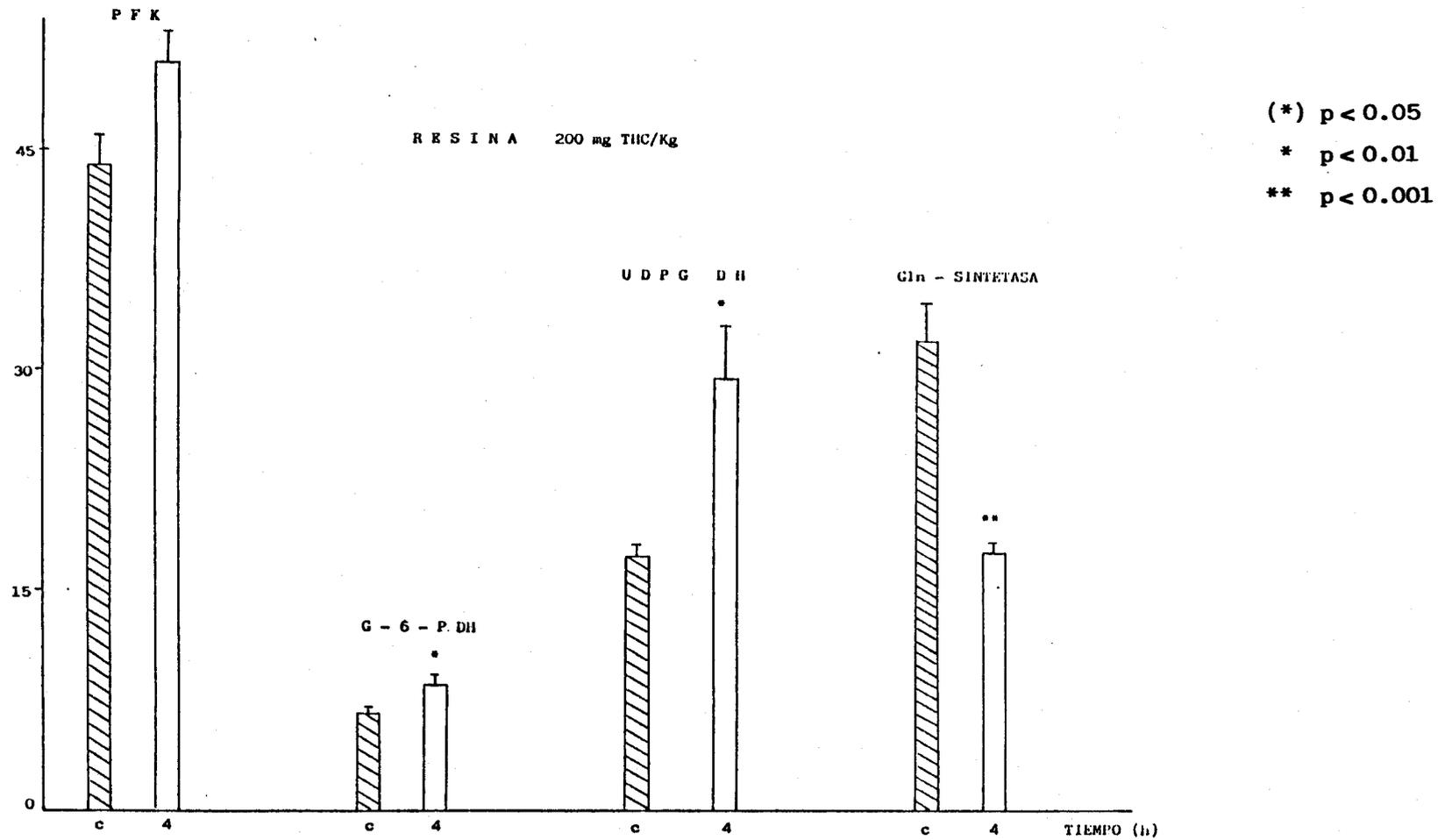
TABLA 2.2

COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA PARAMETRO RESPECTO AL CONTROL, EN RATAS TRATADAS CON RESINA DE CANNABIS (200 mg THC/kg). SACRIFICIO A LAS 4 HORAS.

PARAMETRO	NIVEL DE SIGNIFICACION
GLUCOGENO	S ( $p < 0.001$ )
GLUCOSA HEPATICA	NS
GLUCOSA SERICA	S ( $p < 0.001$ )
PFK	NS
G-6-P DH	S ( $p < 0.01$ )
UDPG DH	S ( $p < 0.01$ )
Gln-SINTETASA	S ( $p < 0.001$ )



**Fig.14.- EFECTO EN EL GLUCOGENO Y LA GLUCOSA, DE UNA DOSIS s. c. DE RESINA DE CANNABIS (200 mg THC/Kg) EN RATAS SACRIFICADAS A LAS 4 H. DE TRATAMIENTO.**



**Fig.15.- EFECTO EN LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS, DE UNA DOSIS s. c. DE RESINA DE CANNABIS (200 mg THC/Kg), EN RATAS SACRIFICADAS A LAS 4 H. DE TRATAMIENTO.**

1.2.- Tratamiento con una sola dosis de 200 mg/Kg de tetrahidrocannabinol puro y sacrificio de los animales a las 4 horas de la administración (TABLAS 3.1 y 3.2 y Figuras 16 y 17).

En estos resultados se pone de manifiesto un decremento de glucógeno del 24% mientras que en la glucosa intracelular se encuentra una disminución del 33,5%, la glucosa extracelular no se encuentra modificada.

Las actividades enzimáticas presentan un incremento del 14,8% la PFK y del 74% la G-6-P DH.

La Gln-sintetasa no se encuentra modificada respecto a los valores control.

En la actividad de la UDPGH se observa un incremento del 67% en este tratamiento.

TABLA 3.1

NIVELES DE LOS DISTINTOS PARAMETROS BIOQUIMICOS EN RATAS TRATADAS S.C. CON THC (200 mg/kg) A LAS 4 HORAS DE TRATAMIENTO. ESTADISTICA BASICA.

PARAMETRO	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
GLUCOGENO	44.60	3.96	1.22	8.66	10
GLUCOSA HEPATICA	71.40	8.02	3.58	11.23	5
GLUCOSA SERICA	129.40	7.92	3.50	6.05	5
PFK	50.67	6.69	2.11	13.20	10
G-6-P DH	11.12	1.36	0.43	12.26	10
UDPG DH	29.02	5.93	2.60	20.09	5
Gln-SINTETASA	32.60	7.42	2.34	22.78	10

TABLA 3.2

COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA PARAMETRO RESPECTO AL CONTROL, EN RATAS TRATADAS CON THC (200 mg/kg). SACRIFICIO A LAS 4 HORAS.

PARAMETRO	NIVEL DE SIGNIFICACION
GLUCOGENO	S ( $p < 0.001$ )
GLUCOSA HEPATICA	S ( $P < 0.001$ )
GLUCOSA SERICA	S ( $p < 0.05$ )
PFK	S ( $p < 0.05$ )
G-6-P DH	S ( $p < 0.001$ )
UDPG DH	S ( $p < 0.001$ )
Gln-SINTETASA	NS

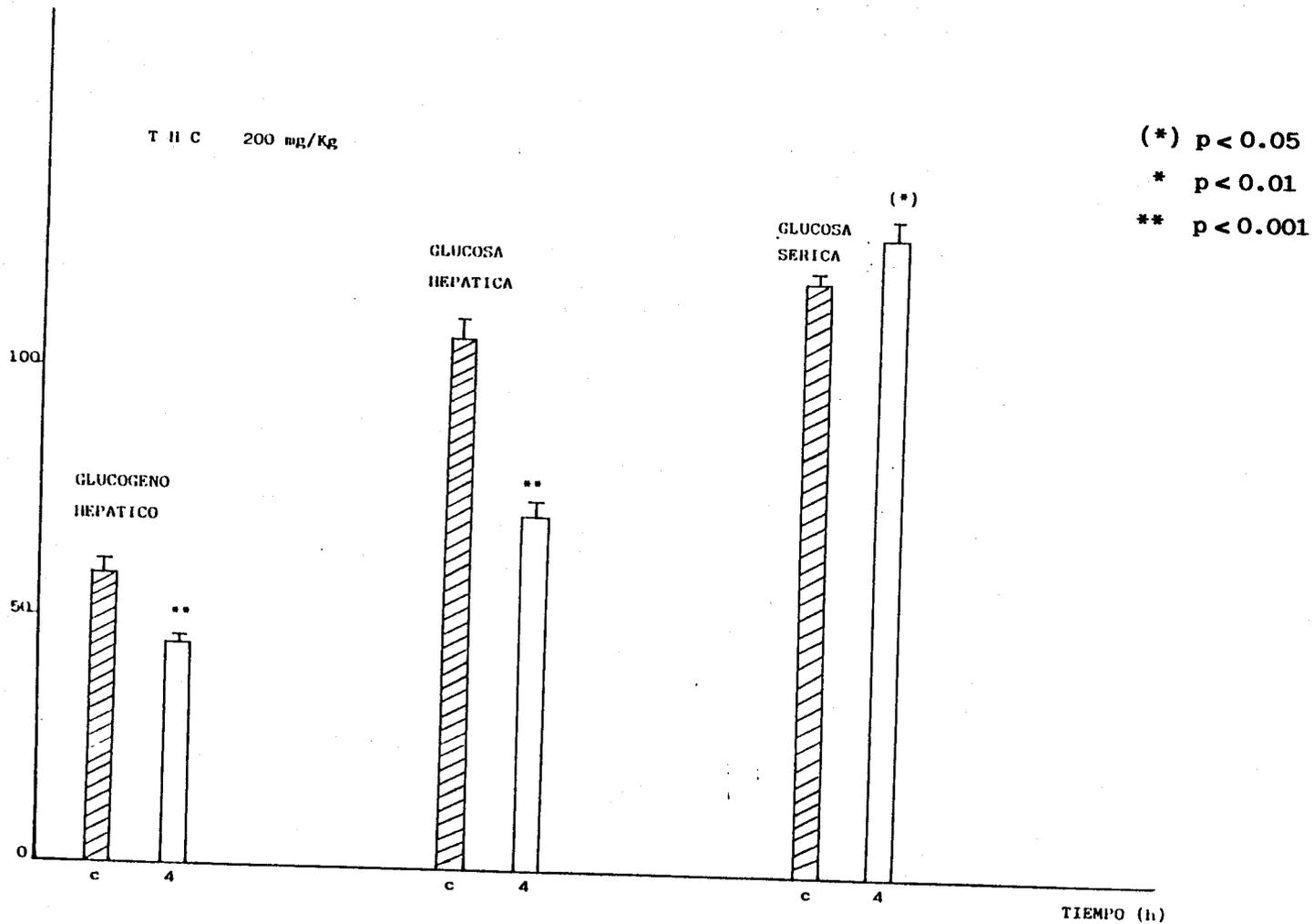
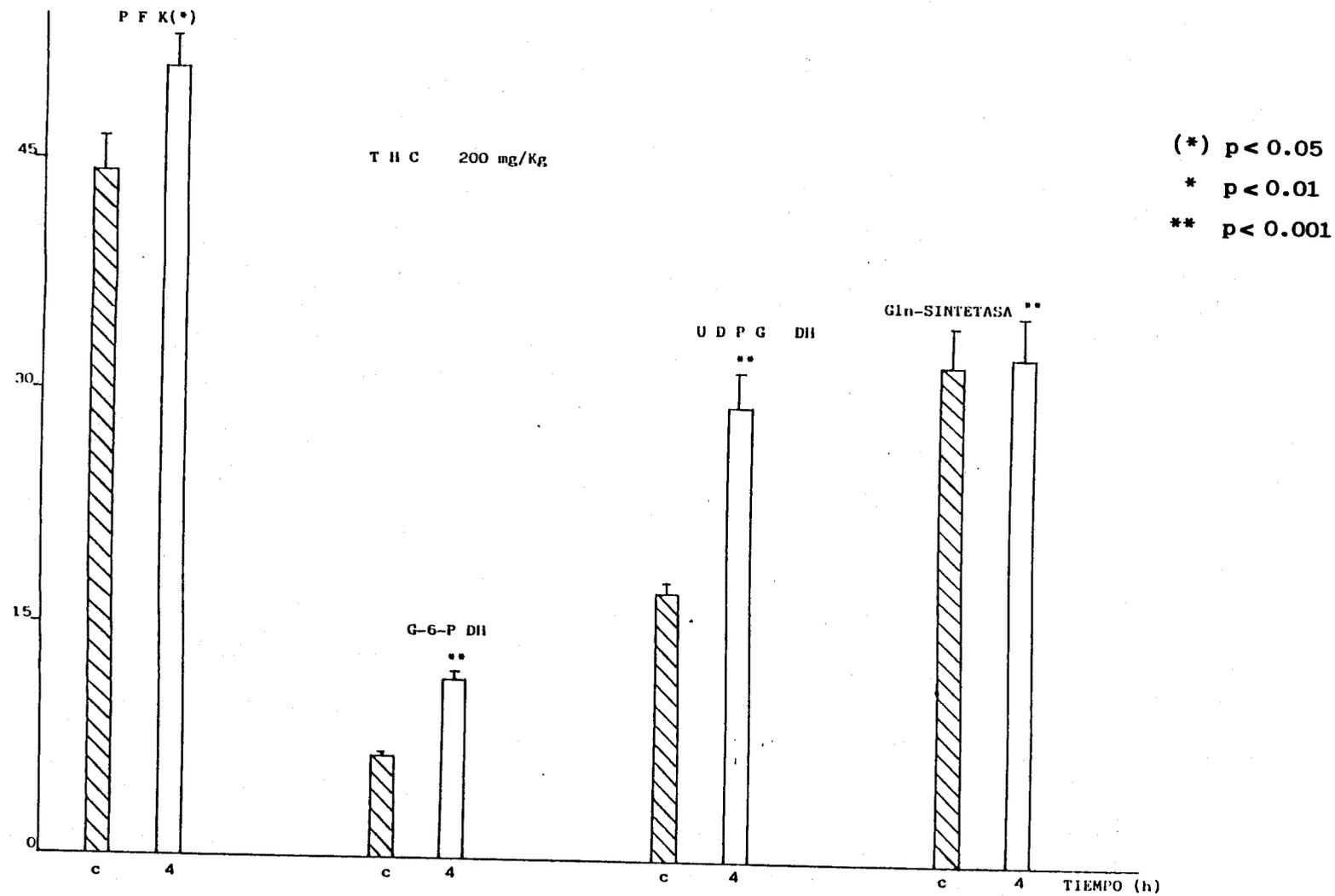


Fig. 16.- EFECTO EN EL GLUCOGENO Y LA GLUCOSA DE UNA DOSIS s.c. DE THC PURO (200 mg/Kg) EN RATAS SACRIFICADAS A LAS 4 h DE TRATAMIENTO



**Fig. 17.- EFECTO DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ESTUDIADAS, DE UNA DOSIS s.c. DE THC PURO (200 mg/Kg), EN RATAS SACRIFICADAS A LAS 4 h DE TRATAMIENTO.**

2.- Estudio de la intoxicación aguda con dosis bajas y su evolución temporal.

2.1.- Tratamiento con una sola dosis de extracto de resina de cannabis correspondiente a 10 mg de THC/Kg: los resultados de esta parte del trabajo experimental realizado se recogen en las tablas y figuras que vamos a describir a continuación.

En las TABLAS 4.1. y 4.2 y Figura 18 observamos los resultados obtenidos para los niveles de glucógeno hepático en cada tiempo considerado y su estudio estadístico.

Observamos que hay un fuerte decremento del glucógeno a esta dosis entre la  $\frac{1}{2}$  h y 2 h de tratamiento y que representa alrededor del 50% con significación estadística ( $p < 0,001$ ). A las 4 horas de tratamiento se repite la disminución de glucógeno (35%), también con significación estadística ( $p < 0,01$ ). A las 24 horas el contenido de glucógeno está ligeramente por encima del valor de los controles (17%) y su significación estadística es  $p < 0,01$ .

TABLA 4.1

EVOLUCION DEL VALOR DE GLUCOGENO EN HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c.  
 CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/2	21.40	19.03	8.51	88.94	5
1	30.87	20.02	7.08	64.85	8
2	25.33	6.54	3.76	25.68	3
3	50.00	1.41	1.00	2.83	4
4	38.50	4.95	3.50	12.86	4
5	52.50	0.71	0.50	1.35	4
12	55.00	7.39	3.67	13.44	4
24	69.00	3.91	1.96	5.67	4

TABLA 4.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE GLUCOGENO HEPATICO.  
COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA  
CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/2	S ( $p < 0.001$ )
1	S ( $p < 0.001$ )
2	S ( $p < 0.001$ )
3	S ( $p < 0.01$ )
4	S ( $p < 0.01$ )
5	S ( $p < 0.01$ )
12	NS
24	S ( $p < 0.01$ )

RESINA 10 mg THC/Kg GLUCOGENO

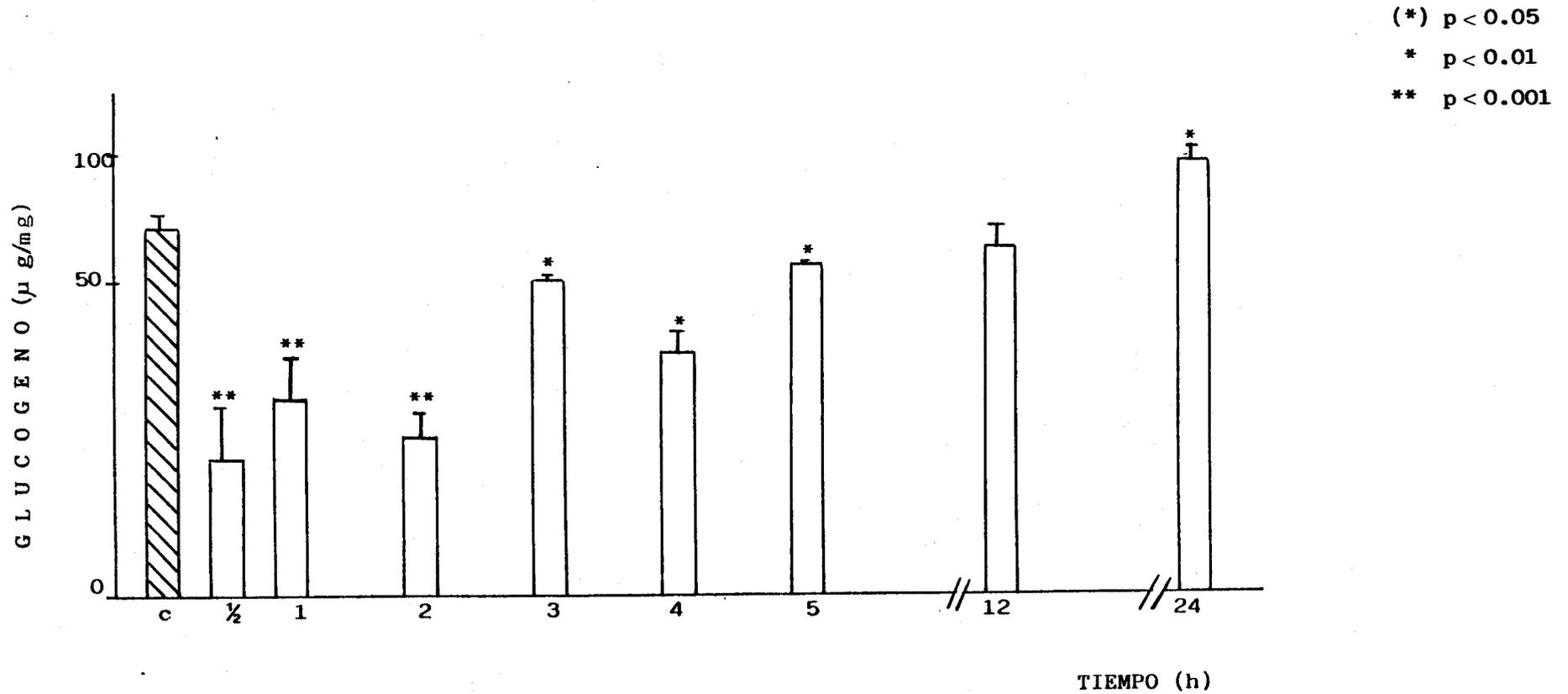


Fig.16.- EVOLUCION TEMPORAL DEL GLUCOGENO HEPATICO EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/Kg).

A continuación se comentan los resultados obtenidos en los niveles de glucosa hepática en los distintos tiempos del tratamiento.

Estos valores y su estudio estadístico quedan reflejados en las TABLAS 5.1 y 5.2 y representados en la Figura 19.

En la glucosa intrahepática se observan dos mínimos a lo largo del tiempo, comparando con la media de animales control. Uno ocurre a la 1 hora de tratamiento y representa un 30% de inhibición con un nivel de significación  $p < 0,05$  mientras que a las 24 horas existe un 40% de disminución y su significación es  $p < 0,001$ .

También observamos un máximo a las 3 horas del 24% cuyo nivel de significación es  $p < 0,05$ .

TABLA 5.1

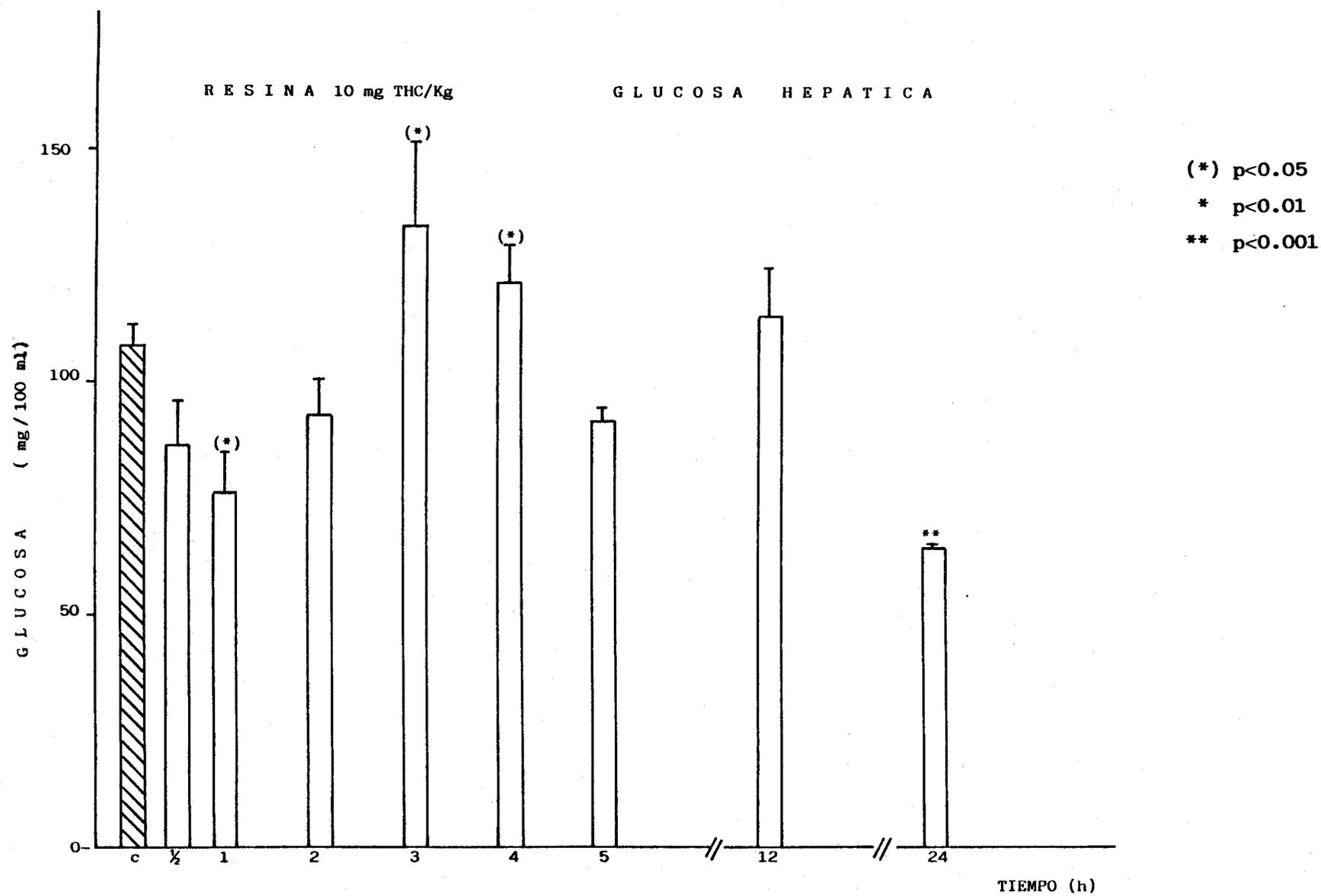
EVOLUCION DEL VALOR DE GLUCOSA EN LA FRACCION S9 DE HIGADO EN RATAS TRATADAS CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/2	85.80	20.61	9.22	24.02	5
1	75.60	18.95	8.48	25.07	5
2	92.50	10.61	7.50	11.47	4
3	133.50	24.75	18.54	17.50	4
4	121.00	11.31	8.00	9.35	4
5	91.00	4.24	3.00	4.66	4
12	113.50	14.85	10.50	13.08	4
24	64.00	0.00	0.00	0.00	4

TABLA 5.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE LA GLUCOSA HEPATICA. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/2	NS
1	S ( $p < 0.05$ )
2	NS
3	S ( $p < 0.05$ )
4	S ( $p < 0.05$ )
5	NS
12	NS
24	S ( $p < 0.001$ )



**Fig.19.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA GLUCOSA HEPATICA EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/Kg).**

Los valores de glucosa sérica de este estudio quedan recogidos en las TABLAS 6.1 y 6.2, con su estudio estadístico y gráficamente en la Figura 20.

Este parámetro se mantiene a lo largo del tiempo dentro de los márgenes de normalidad en ratas, que está establecido entre 60-120 mg/100 ml de suero para ratas Wistar machos y nosotros lo hemos establecido en nuestras condiciones de trabajo entre 98-142 mg/100 ml. (Ver TABLA 1).

TABLA 6.1

EVOLUCION DEL VALOR DE GLUCOSA SERICA EN RATAS TRATADAS s.c.  
 CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg). ESTADISTICA BASICA

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/2	105.60	5.68	2.54	5.38	5
1	113.91	21.52	6.49	18.89	11
2	100.00	8.48	6.00	8.48	4
3	112.5	3.53	2.50	3.14	4
4	106.50	13.43	9.50	12.61	4
5	115.00	2.83	2.00	2.46	4
12	92.50	9.19	6.50	9.94	4
24	124.00	15.56	11.00	12.54	4

TABLA 6.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE GLUCOSA SERICA.  
 COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA  
 CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/2	S ( $p < 0.01$ )
1	NS
2	S ( $p < 0.01$ )
3	S ( $p < 0.05$ )
4	S ( $p < 0.05$ )
5	NS
12	S ( $p < 0.01$ )
24	NS

RESINA 10 mg THC/Kg

GLUCOSA SERICA

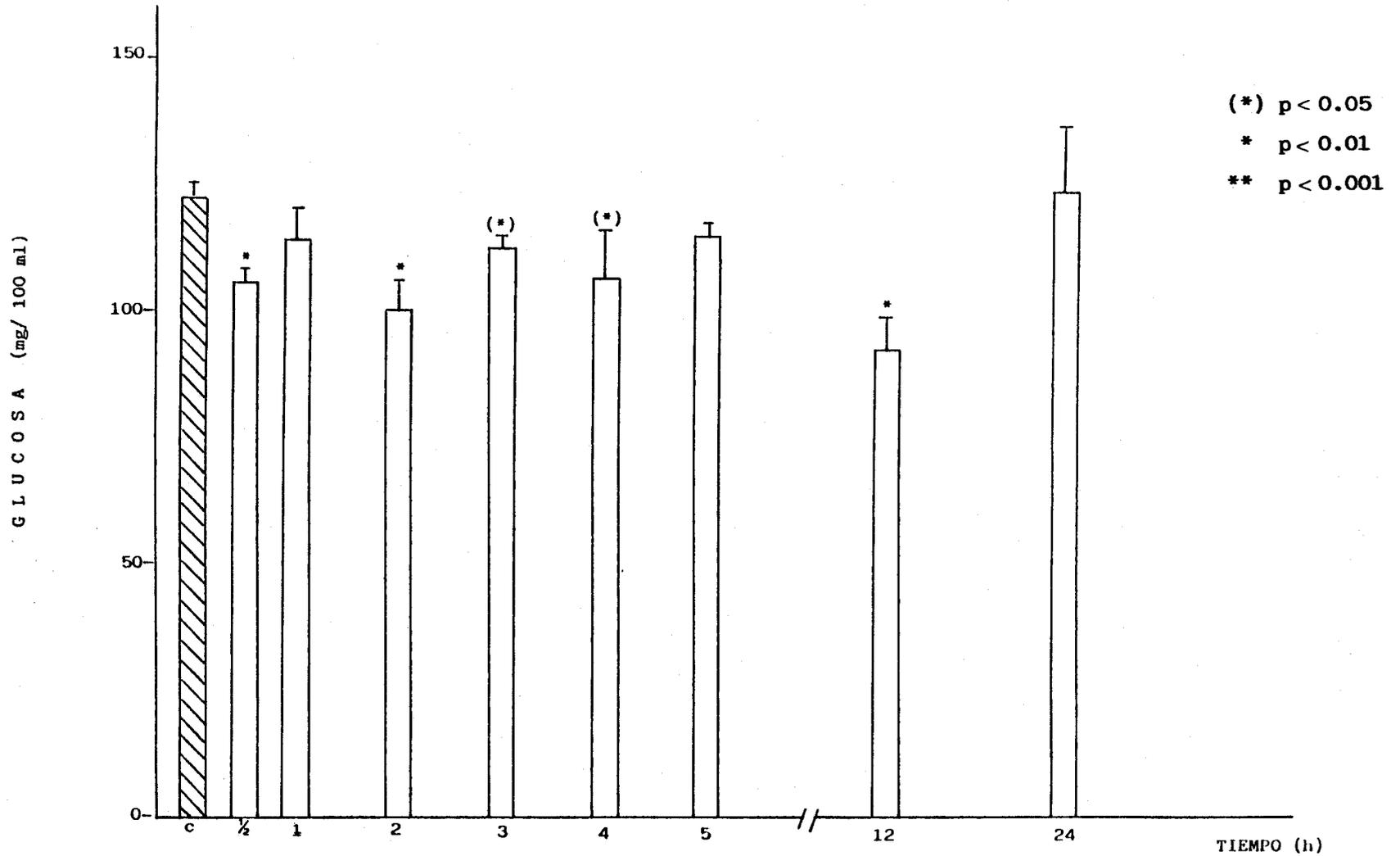


Fig. 20.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA GLUCOSA SERICA EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/Kg).

En las TABLAS 7.1 y 7.2 y Figura 21 se recogen todos los resultados con su significación estadística, obtenidos para la actividad de la PFK, en cada tiempo del tratamiento con resina de cannabis a dosis de 10 mg THC/Kg.

Se observa, que estos valores están por debajo del valor obtenido para los animales control, en todo momento. La inhibición más acusada se da a las 2 horas de tratamiento y resulta ser del 47% con un nivel de significación  $p < 0,001$ . Todos los decrementos representados en la gráfica poseen una alta significación estadística.

TABLA 7.1

EVOLUCION DEL VALOR DE PFK EN FRACCION S9 DE HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c. CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg). ESTADISTICA BASICA

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/2	26.49	3.40	1.29	12.85	7
1	35.75	9.86	2.26	27.59	19
2	23.05	1.41	0.71	6.14	4
3	30.33	3.28	1.64	10.81	4
4	35.17	7.73	3.87	21.98	4
5	26.36	0.36	0.18	1.38	4
12	34.94	4.63	2.32	13.26	4
24	30.97	0.94	0.47	3.03	4

TABLA 7.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE PFK.  
COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA  
CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/2	S ( $p < 0.001$ )
1	S ( $p < 0.05$ )
2	S ( $p < 0.001$ )
3	S ( $p < 0.001$ )
4	S ( $p < 0.05$ )
5	S ( $p < 0.001$ )
12	S ( $p < 0.05$ )
24	S ( $p < 0.001$ )

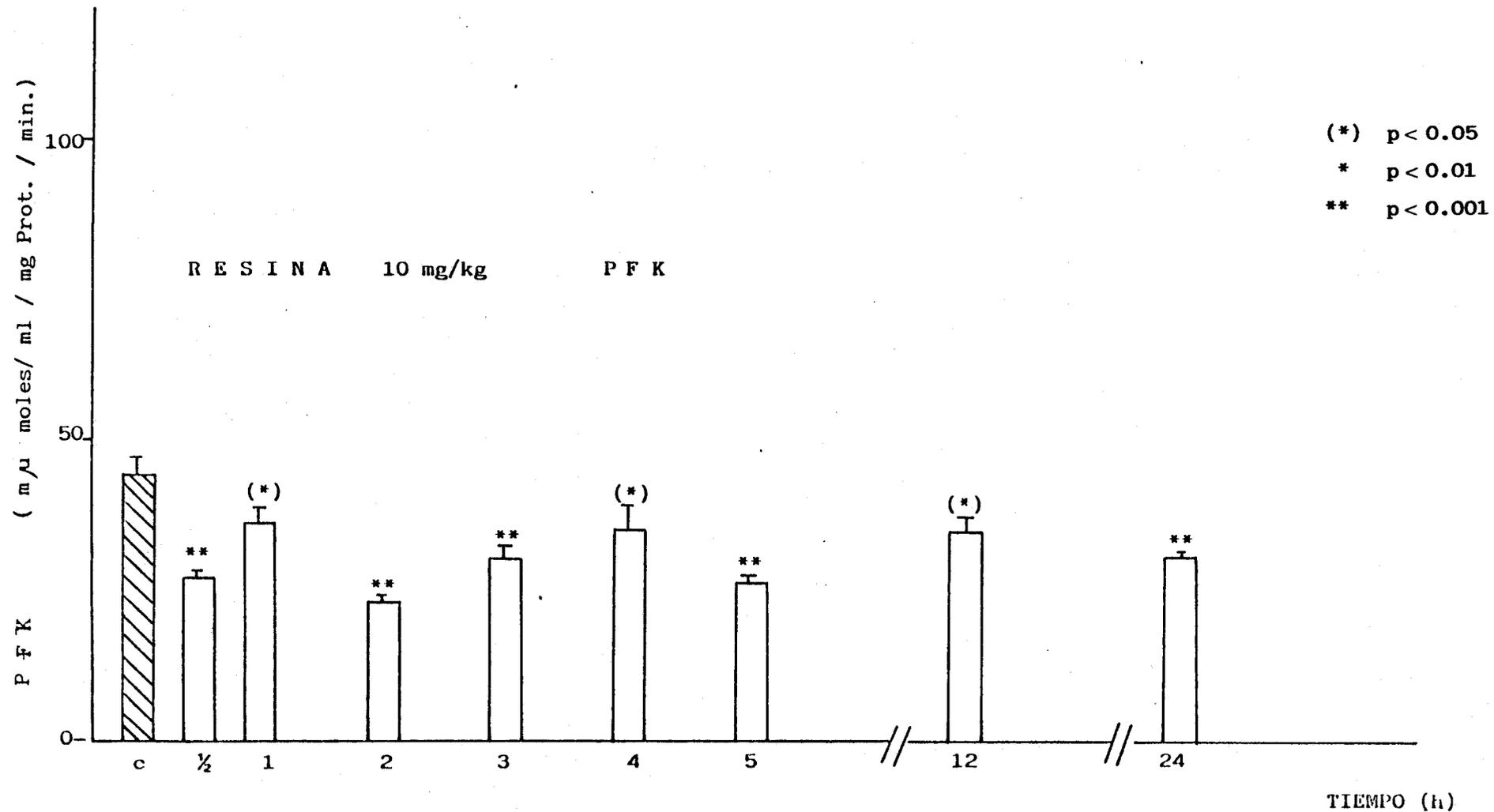


Fig.21.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD DE LA P F K EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/Kg).

La actividad de la G-6-P DH y su estudio estadístico, queda recogida en las TABLAS 8.1 y 8.2 y representada en el diagrama de barras de la Figura 22.

Esta enzima se encuentra a lo largo de todo el tratamiento por debajo de los valores normales y entre las 3 y las 5 horas presenta una inhibición que llegó a ser del 49%, con alto nivel de significación ( $p < 0,001$ ).

TABLA 8.1

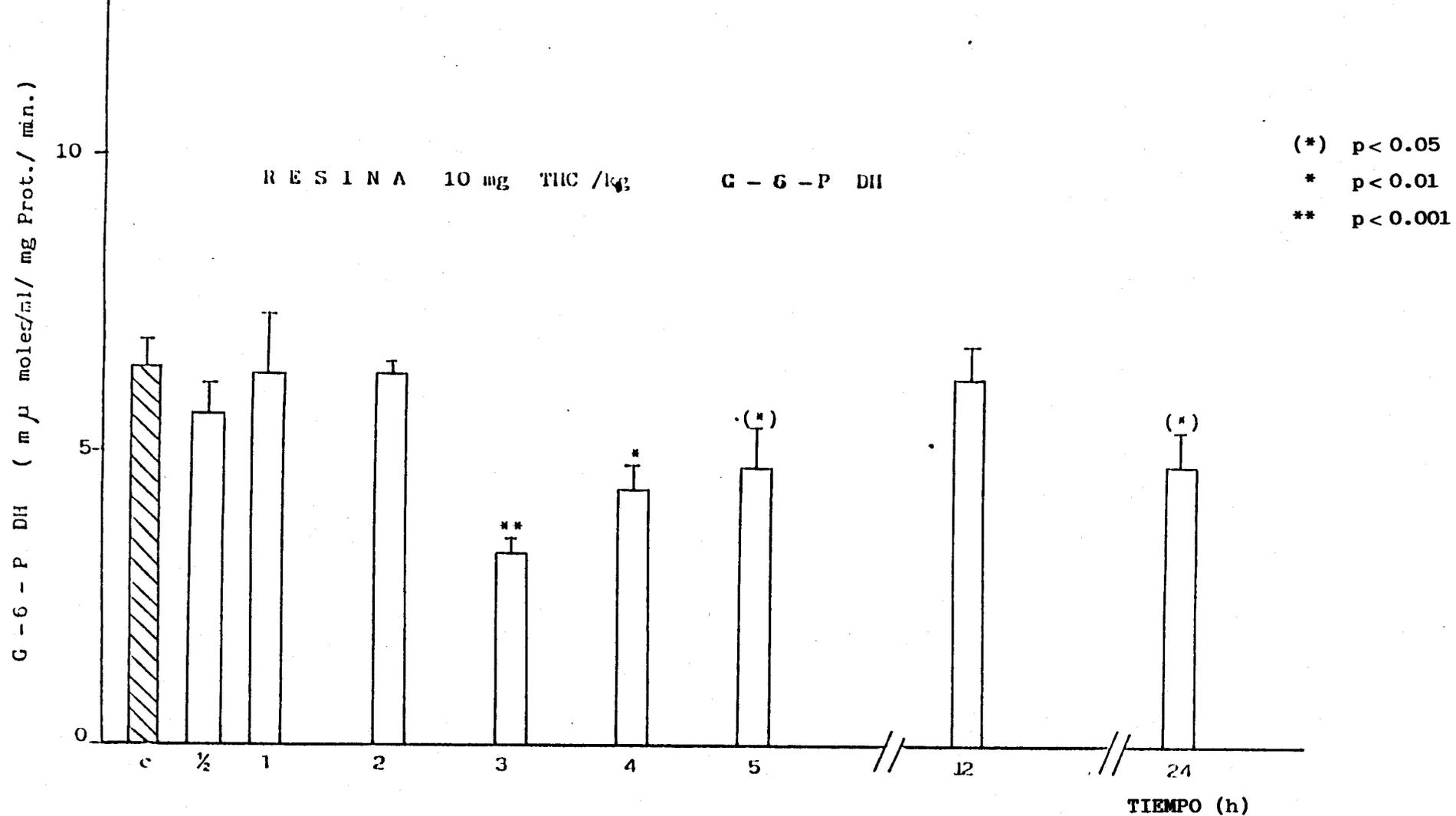
EVOLUCION DEL VALOR DE G-6-P DH EN FRACCION S9 DE HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c. CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/2	5.57	1.00	0.50	17.96	4
1	6.30	2.09	1.04	33.17	4
2	6.25	0.37	0.18	5.91	4
3	3.27	0.40	0.20	12.31	4
4	4.35	0.74	1.37	16.94	4
5	4.75	1.35	0.68	28.48	4
12	6.22	1.18	0.59	18.93	4
24	4.77	1.00	0.50	20.90	4

TABLA 8.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE G-6-P DH. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/2	NS
1	NS
2	NS
3	S ( $p < 0.001$ )
4	S ( $p < 0.01$ )
5	S ( $p < 0.05$ )
12	NS
24	S ( $p < 0.05$ )



**Fig.22.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD DE LA G - 6 - P DH EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s.c. DE RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/Kg).**

La evolución del nivel de amoníaco en sangre, a lo largo del tratamiento, con una dosis única s.c. de resina de cannabis (10 mg THC/Kg), se representa en las TABLAS 9.1 y 9.2, así como en la Figura 23.

Observamos que el amoníaco se encuentra por encima del valor de los controles en todo momento, con un máximo a las 4 horas que llega al 72-73% de incremento, con una significación estadística  $p < 0,001$ .

TABLA 9.1

EVOLUCION DEL VALOR DE AMONIACO EN SANGRE DE RATAS TRATADAS s.c.  
 CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/2	81.50	8.81	4.40	10.81	4
1	86.50	8.23	4.11	9.51	4
2	80.00	10.74	5.37	13.42	4
3	82.25	12.97	6.48	15.77	4
4	119.50	19.40	9.70	16.23	4
5	87.50	6.24	3.12	7.14	4
12	94.00	3.60	2.08	3.83	3
24	83.00	7.81	4.51	9.41	3

TABLA 9.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE AMONIACO. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/2	S ( $p < 0.01$ )
1	S ( $p < 0.01$ )
2	S ( $p < 0.05$ )
3	S ( $p < 0.01$ )
4	S ( $p < 0.001$ )
5	S ( $p < 0.01$ )
12	S ( $p < 0.01$ )
24	S ( $p < 0.01$ )

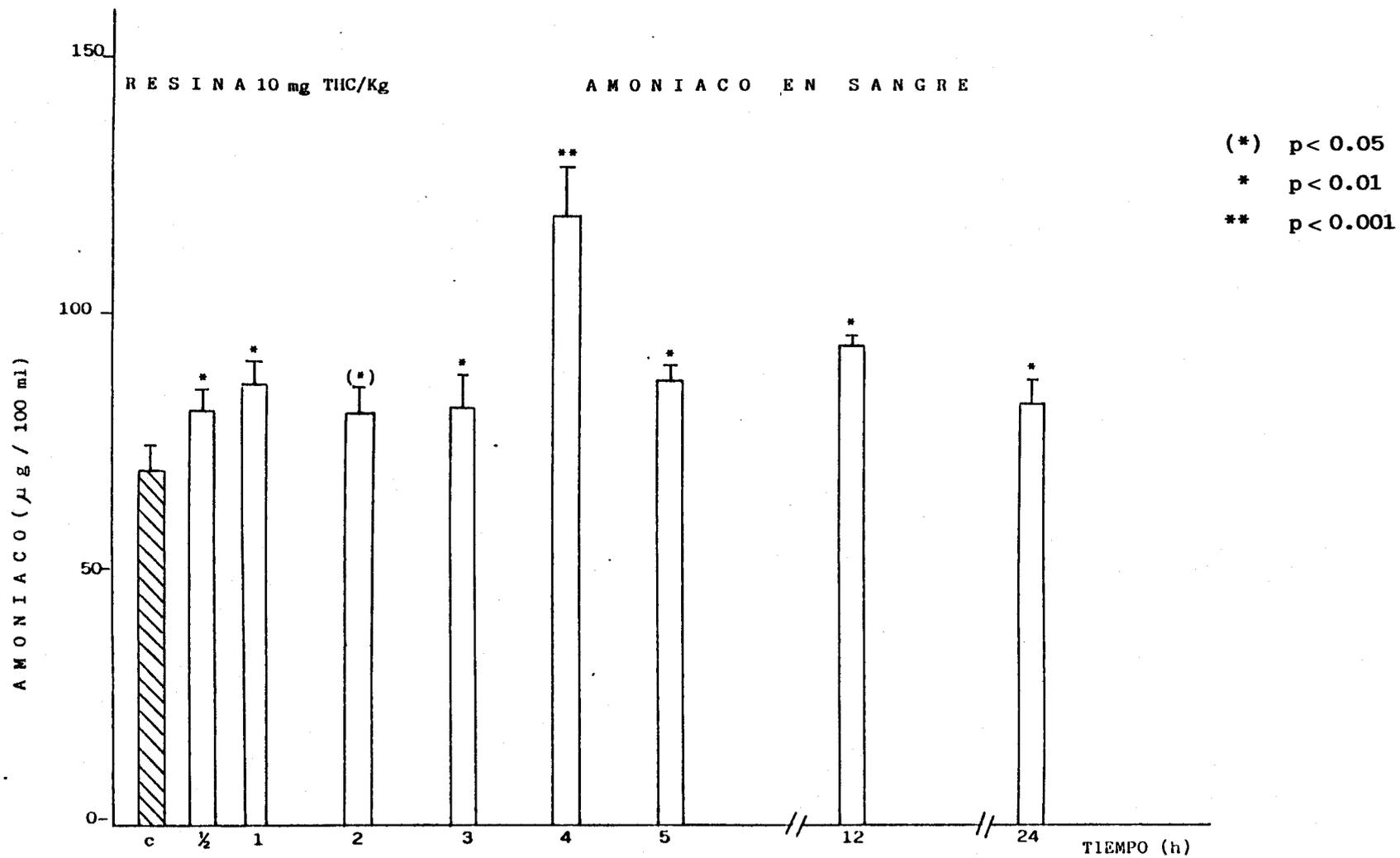


Fig.23.- EVOLUCION TEMPORAL DEL AMONIACO SANGUINEO EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/Kg).

La actividad de la Gln-sintetasa hepática a lo largo de cada tiempo considerado en este tratamiento, queda reflejada en las TABLAS 10.1 y 10.2 y esta evolución se presenta en la Figura 24.

Se observa que esta vía metabólica se encuentra activada entre las 2 y las 12 horas alcanzando un incremento del 45% entre las 5 y las 12 horas.

El estudio estadístico de esta enzima queda recogido tanto en las tablas como en el diagrama de barras.

TABLA 10.1

EVOLUCION DEL VALOR DE Gln-SINTETASA EN FRACCION S9 DE HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c. CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg).  
ESTADISTICA BASICA

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/2	24.94	12.82	4.84	51.39	7
1	27.05	13.18	3.65	48.73	13
2	39.09	3.06	1.53	7.83	4
3	28.23	4.84	2.42	17.16	4
4	32.25	4.92	2.46	15.26	4
5	44.03	3.10	1.55	7.04	4
12	46.35	2.92	1.46	6.29	4
24	31.42	9.95	4.98	31.67	4

TABLA 10.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE Gln-SINTETASA. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/2	NS
1	NS
2	S ( $p < 0.05$ )
3	NS
4	NS
5	S ( $p < 0.001$ )
12	S ( $p < 0.001$ )
24	NS

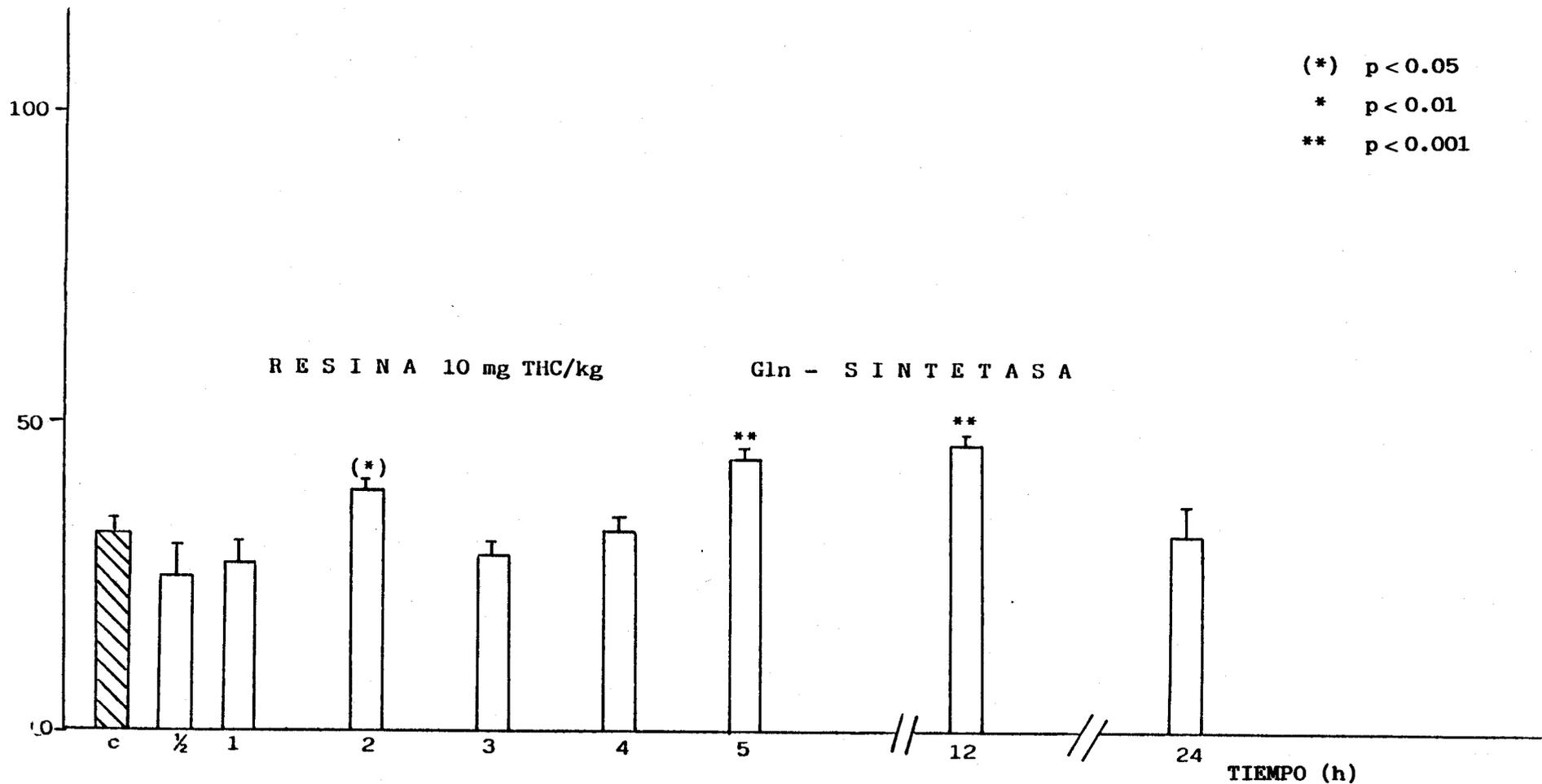


Fig.24.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA Gln - SINTETASA, EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS DE RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/Kg).

Las TABLAS 11 y 12 recogen un resumen de los resultados obtenidos para los parámetros bioquímicos considerados y las diferentes actividades enzimáticas, en el tratamiento de resina de cannabis (10 mg THC/Kg).

Este estudio estadístico consiste en una comparación de medias independientes en cada tiempo respecto al anterior.

TABLA 11

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES DE PARAMETROS BIOQUIMICOS EN EL TRATAMIENTO CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg) CONSIDERANDO CADA TIEMPO RESPECTO AL ANTERIOR.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION			
	GLUCOGENO	GLUCOSA HEPATICA	GLUCOSA SERICA	AMONIACO SANGUINEO
1 - 1/2	NS	NS	NS	NS
2 - 1	NS	NS	NS	NS
3 - 2	S(p<0.01)	S(p<0.001)	NS	NS
4 - 3	S(p<0.05)	NS	NS	S(p<0.001)
5 - 4	S(p<0.05)	S(p<0.01)	NS	S(p<0.001)
12 - 5	NS	S(p<0.01)	S(p<0.01)	NS
24 - 12	S(p<0.05)	S(p<0.001)	S(p<0.05)	NS

TABLA 12

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL TRATAMIENTO CON RESINA DE CANNABIS (10 mg THC/kg) CONSIDERANDO CADA TIEMPO RESPECTO AL ANTERIOR.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION		
	PFK	G-6-P DH	Gln-SINTETASA
1 - 1/2	S(p<0.01)	NS	NS
2 - 1	S(p<0.01)	NS	S(p<0.01)
3 - 2	S(p<0.01)	S(p<0.001)	S(p<0.01)
4 - 3	NS	S(p<0.05)	NS
5 - 4	S(p<0.05)	NS	S(p<0.01)
12 - 5	S(p<0.05)	NS	NS
24 - 12	NS	NS	S(p<0.05)

2.2.- Tratamiento con una sola dosis de 10 mg/Kg de tetrahidrocannabinol puro y su evolución temporal: A continuación se pasa a detallar los resultados obtenidos en esta parte del trabajo experimental, que quedan recogidos en las tablas y figuras que siguen.

En las TABLAS 13.1 y 13.2 y Figura 25 se reflejan los niveles de glucógeno obtenidos y su estudio estadístico para cada tiempo en animales tratados con una dosis única de THC puro (10 mg/Kg). A la vista de ellos se puede decir que este tratamiento produce, igual que la resina de cannabis, un fuerte decremento de glucógeno, con mínimos a los 45 minutos (65%) y a las 3½ horas (46%) siendo su nivel de significación  $p < 0,001$ . A las 24 horas el nivel de glucógeno resulta estar un 20% por encima del valor de los animales control.

TABLA 13.1

EVOLUCION DEL VALOR DE GLUCOGENO EN HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c.  
CON THC (10 mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	47.62	2.50	0.88	5.26	8
1/2	55.37	8.21	2.90	14.83	8
3/4	20.70	21.40	7.56	103.38	8 *
1	51.00	11.13	3.21	21.82	12
1 1/2	49.87	7.94	2.80	15.91	8
2	48.37	7.84	2.77	14.20	8
2 1/2	49.50	1.00	0.50	2.02	4
3	40.75	1.89	0.95	6.64	4
3 1/2	31.37	22.94	8.11	73.12	8
4	45.62	14.68	5.19	32.17	8
4 1/2	45.75	5.17	1.83	11.31	8
5	46.50	4.43	2.22	9.54	4
12	54.25	0.50	0.25	0.92	4
24	70.25	4.57	2.29	6.51	4

\* ALGUNOS VALORES POR DEBAJO EN EL LIMITE DE DETECCION

TABLA 13.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE GLUCOGENO HEPATICO.  
 COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA  
 CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	S (p<0.001)
1/2	NS
3/4	S (p<0.001)
1	NS
1 1/2	S (p<0.05)
2	S (p<0.01)
2 1/2	S (p<0.001)
3	S (p<0.001)
3 1/2	S (p<0.001)
4	S (p<0.01)
4 1/2	S (p<0.001)
5	S (p<0.01)
12	S (p<0.05)
24	S (p<0.01)

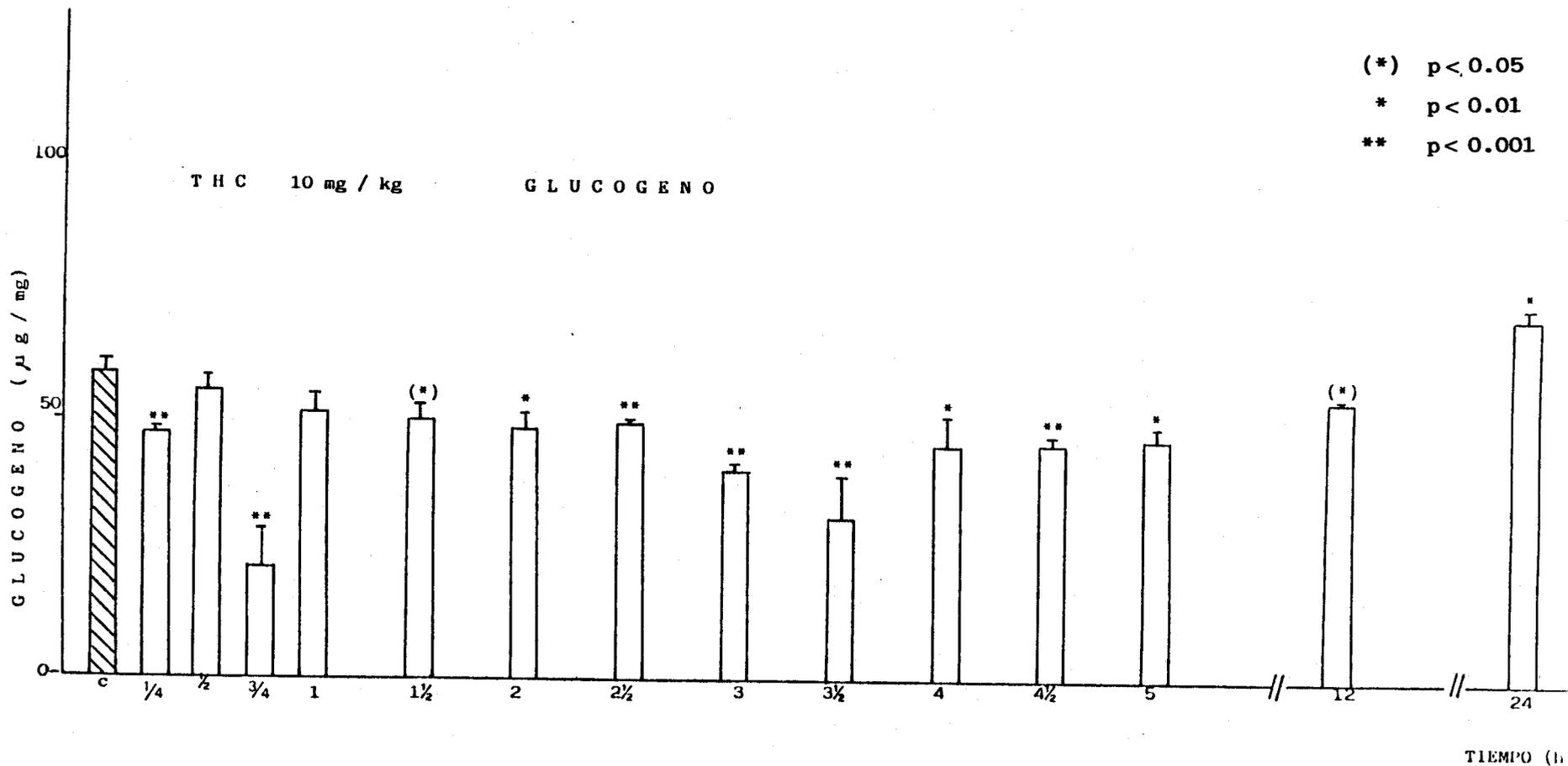


Fig.25.- EVOLUCION TEMPORAL DEL GLUCOGENO HEPATICO EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10 mg /Kg)

El decremento de glucógeno observado en los resultados anteriores, se confirmó mediante la determinación histoquímica de la actividad de la fosforilasa. Como toda técnica histoquímica es semicuantitativa, pero de gran sensibilidad. El reactivo de lugol produce en la preparación histológica color azul con el glucógeno de cadenas no ramificadas (formado por la fosforilasa activa,  $\alpha$ ) y color pardo caoba con el glucógeno ramificado (originado por la enzima ramificante, amilo (1,4  $\rightarrow$  1,6) - transglucosilasa); cuando se aprecia mezcla de colores, hablamos de actuación de "fosforilasa total".

La neoformación in vitro de glucógeno, a partir de G-1-P añadido, es indicadora de la actividad fosforilásica, que in vivo significa su función degradante; es decir, a más glucógeno neoformado in vitro, corresponde mayor degradación de glucógeno in vivo.

En la TABLA 14 se recogen los resultados obtenidos en la medida de la actividad de esta enzima a lo largo de los tiempos considerados en este estudio. Estos valores se basan en datos comparativos entre los cortes estudiados al microscopio, de animales controles y de los tratados.

A la máxima actividad observada a lo largo del tratamiento se le asigna +++, frente al - del control de incubación (explicado en el apartado 9 de Métodos) y (+) para los animales control.

Se observa, por tanto, que la actividad fosforilásica evoluciona de forma paralela al decremento de glucógeno in vivo. La máxima actividad aparece a los 45 minutos de tratamiento y también a las 3½ horas. A las 24 horas está igualada a la de los animales control.

TABLA 14

ACTIVIDAD FOSFORILASA EN HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c. CON  
THC (10 mg/kg) EN CADA TIEMPO CONSIDERADO.

TRATAMIENTO	TIEMPO (H)	ACTIVIDAD FOSFORILASA + ENZIMA RAMIFICANTE
CONTROL INCUBACION	-	-
CONTROL VEHICULO	-	(+)
THC 10 mg/kg	1/4	++
THC 10 mg/kg	1/2	++
THC 10 mg/kg	3/4	++++
THC 10 mg/kg	1	+
THC 10 mg/kg	1/2	++
THC 10 mg/kg	2	++
THC 10 mg/kg	2 1/2	++
THC 10 mg/kg	3	++
THC 10 mg/kg	3 1/2	+++
THC 10 mg/kg	4	++
THC 10 mg/kg	4 1/2	++
THC 10 mg/kg	5	++
THC 10 mg/kg	12	+
THC 10 mg/kg	24	(+)

La Figura 26 corresponde a un corte de hígado incubado sin el sustrato (G-1-P), por lo que la enzima no ha actuado y no se han sintetizado los polisacáridos correspondientes.

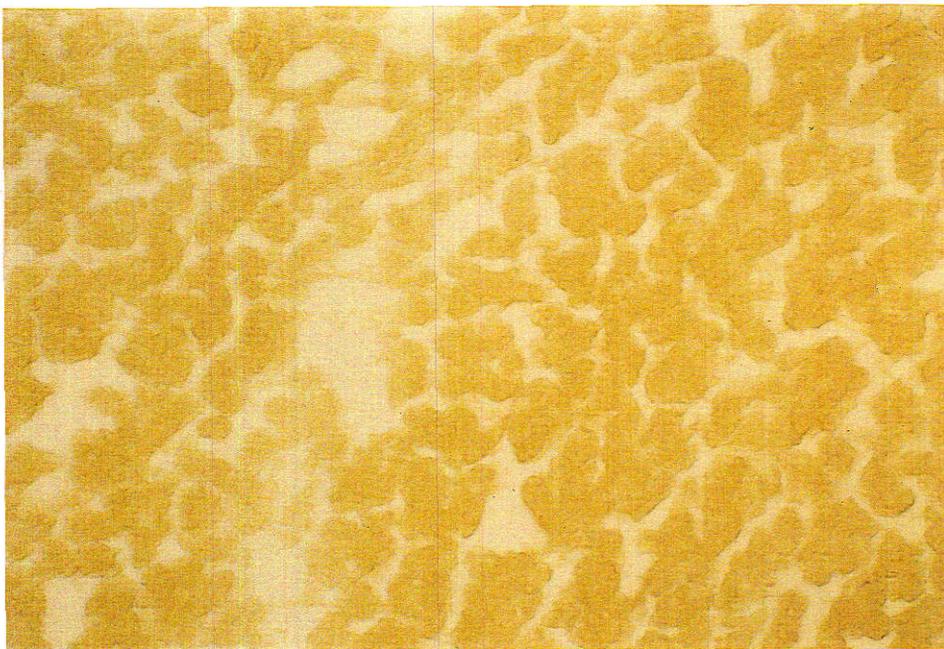


Fig. 26.- Corte de hígado correspondiente al control de incubación (x 200).

En la Figura 27 se aprecia en los hepatocitos un discreto precipitado de color pardo-azulado perteneciente al glucógeno sintetizado por la fosforilasa.

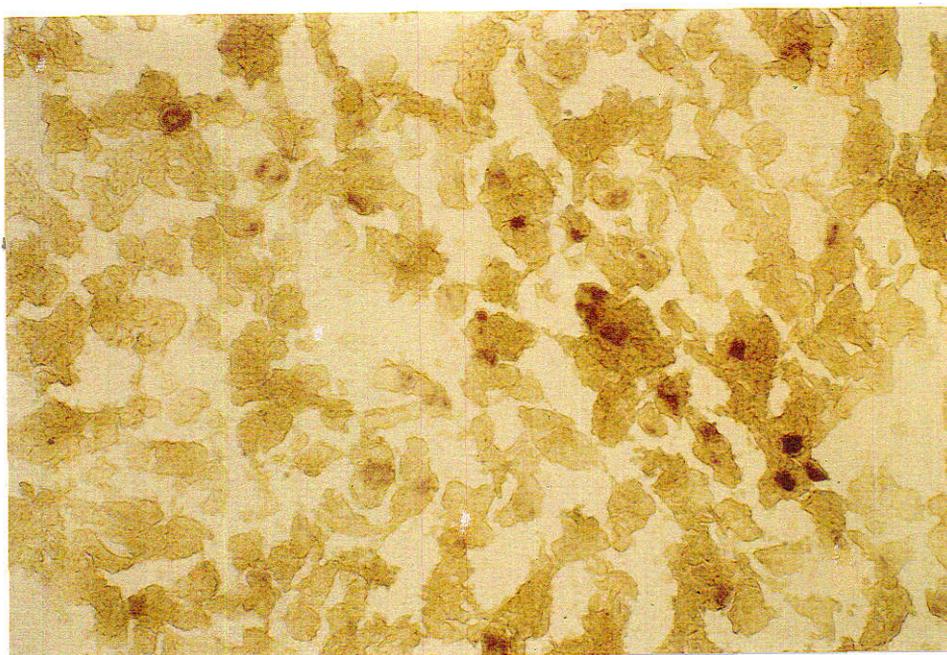


Fig. 27.- Actividad total de la enzima fosforilasa en corte de hígado de rata control (x 200).

Se observa una actividad media de esta enzima en la Figura 28 que muestra un corte de hígado de rata sacrificada a las 2 horas después del tratamiento.

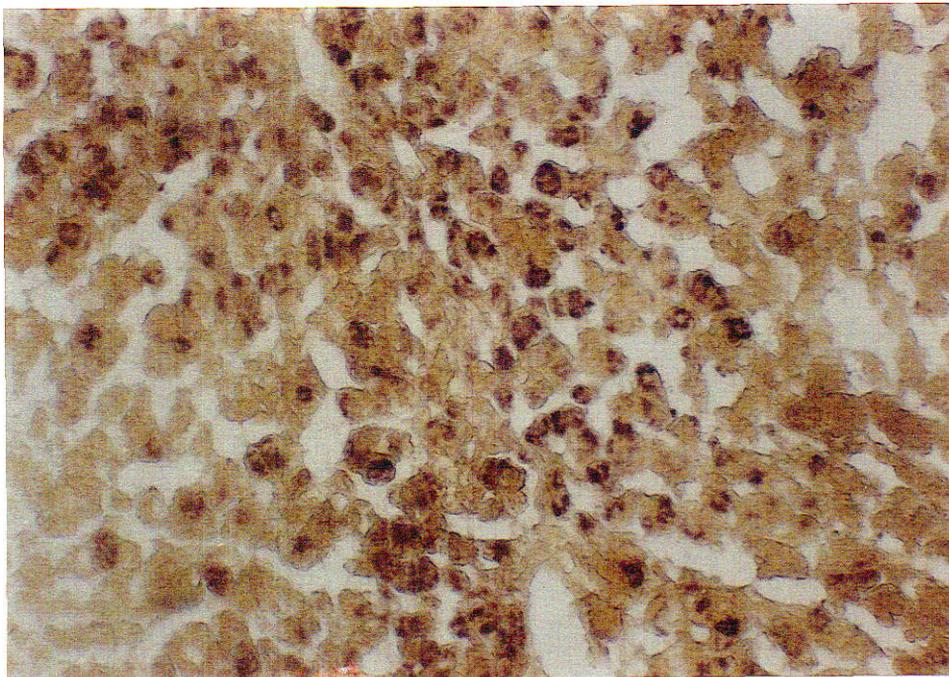


Fig. 28.- Actividad total de la enzima fosforilasa (x 200).

La máxima actividad fosforilásica se observa en animales sacrificados a los 45 minutos después del tratamiento, confirmado así el fuerte decremento de glucógeno ya reseñado. Esta gran actividad enzimática se aprecia en la Figura 29, donde los hepatocitos aparecen cargados de glucógeno neoformado.

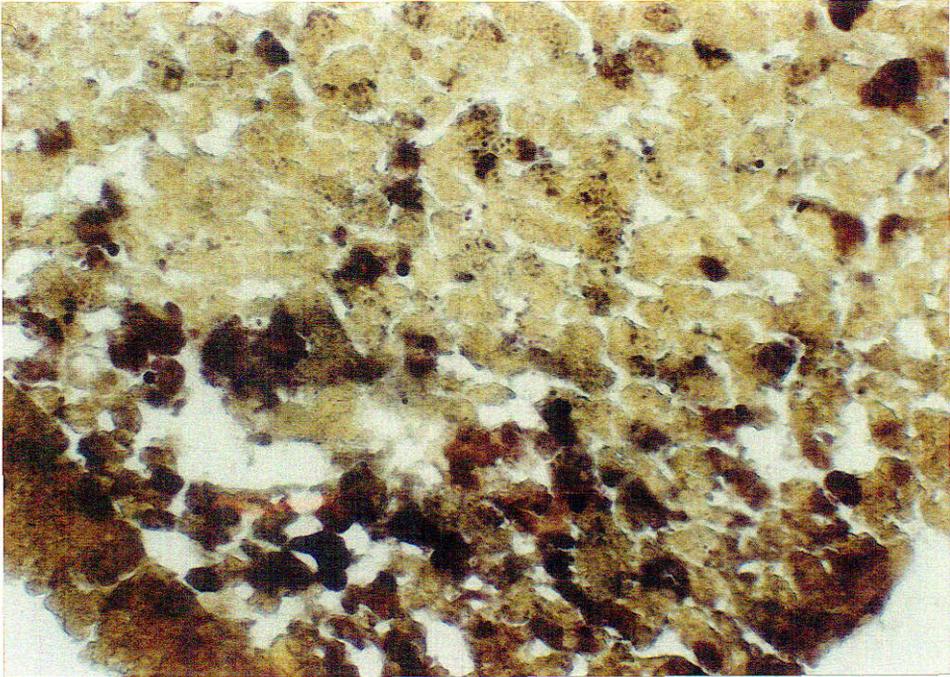


Fig. 29.- Actividad total de la enzima fosforilasa (x 200).

En las TABLAS 15.1 y 15.2 y Figura 30 se recogen los valores de glucosa intrahepática obtenidos en este tratamiento y su correspondiente estudio estadístico. Este parámetro se encuentra en todo momento por debajo de la normalidad, con mínimo a las 3 horas que llega a ser del 57% con alto nivel de significación ( $p < 0,001$ ). A las 24 horas sigue sin alcanzar el valor de los controles (30% de inhibición).

TABLA 15.1

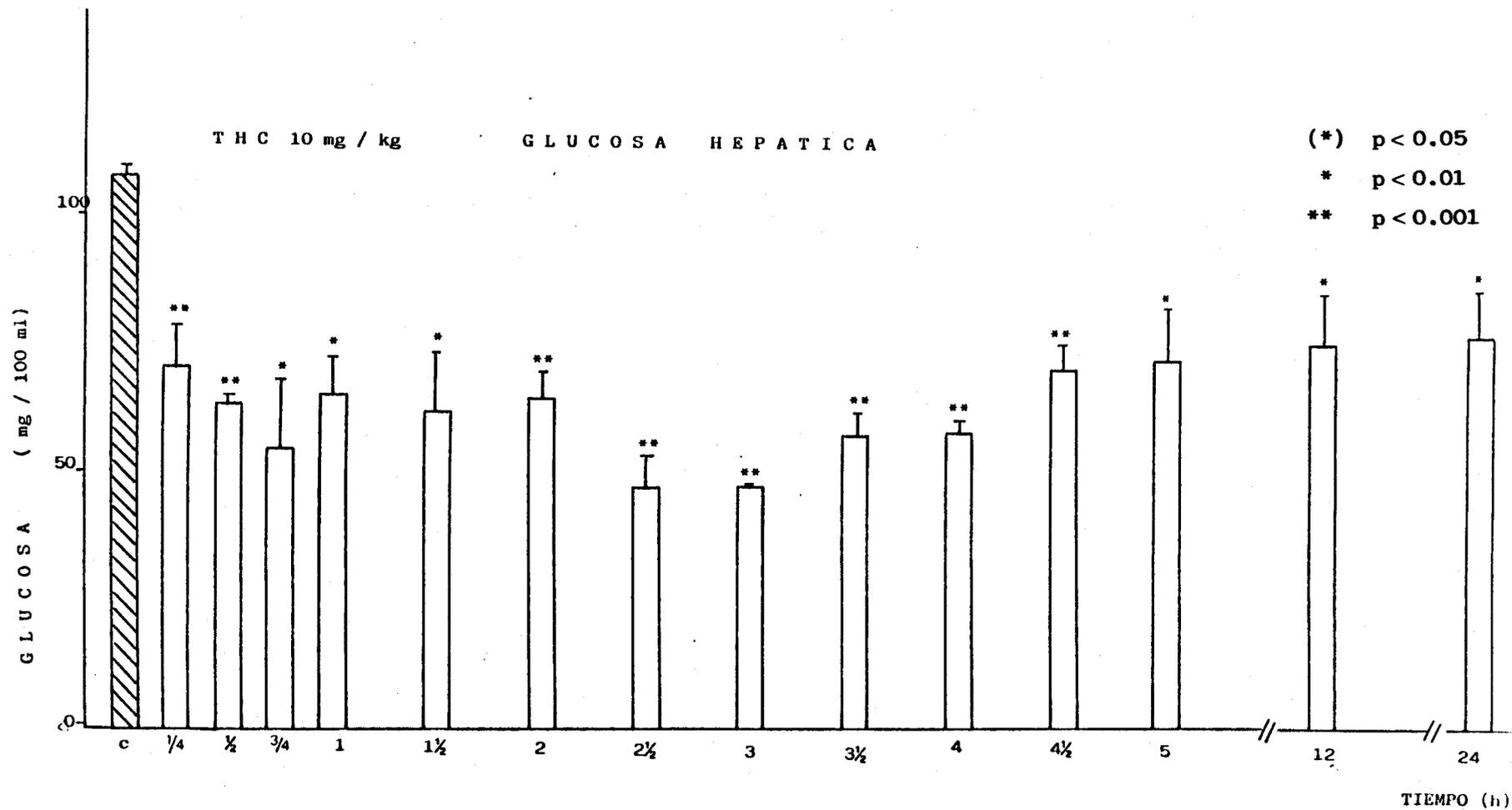
EVOLUCION DEL VALOR DE GLUCOSA HEPATICA EN FRACCION S9 DE HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c. CON THC (10 mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	70.50	5.74	8.15	2.87	4
1/2	63.00	4.08	2.04	6.48	4
3/4	54.25	27.94	13.97	51.51	4
1	65.00	17.75	7.25	27.31	6
1 1/2	61.75	23.38	11.69	37.87	4
2	64.00	10.45	5.23	16.33	4
2 1/2	47.00	8.48	6.00	18.05	4
3	47.00	0	0	0	4
3 1/2	57.00	6.63	3.32	11.64	4
4	57.75	4.27	2.14	7.39	4
4 1/2	69.50	10.34	5.17	14.88	4
5	71.50	14.85	10.50	20.77	4
12	74.50	14.84	10.50	19.93	4
24	76.00	12.73	9.00	16.75	4

TABLA 15.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE LA GLUCOSA HEPATICA. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	S ( $p < 0.001$ )
1/2	S ( $p < 0.001$ )
3/4	S ( $p < 0.01$ )
1	S ( $p < 0.01$ )
1 1/2	S ( $p < 0.01$ )
2	S ( $p < 0.001$ )
2 1/2	S ( $p < 0.001$ )
3	S ( $p < 0.001$ )
3 1/2	S ( $p < 0.001$ )
4	S ( $p < 0.001$ )
4 1/2	S ( $p < 0.001$ )
5	S ( $p < 0.01$ )
12	S ( $p < 0.01$ )
24	S ( $p < 0.01$ )



**Fig.30.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA GLUCOSA HEPATICA EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10 mg/Kg).**

Al contrario de lo que sucede con la glucosa intrahepática, la glucosa sérica se mantiene a lo largo de todos los tiempos considerados en este estudio. Estos resultados se reflejan en las TABLAS 16.1 y 16.2 y Figura 31. Se manifiestan máximos a los 45 minutos (17%) y a las 3 horas (31%), con significación estadística  $p < 0,05$  y  $p < 0,001$  respectivamente.

TABLA 16.1

EVOLUCION DEL VALOR DE GLUCOSA SERICA EN RATAS TRATADAS s.c. CON  
THC (10 mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	127.16	15.89	6.49	12.50	6
1/2	131.16	18.63	7.60	14.20	6
3/4	141.50	17.80	7.27	12.58	6
1	139.0	17.85	6.31	12.84	8
1 1/2	131.33	12.09	4.94	9.21	6
2	136.00	15.02	6.18	11.04	6
2 1/2	136.50	9.19	6.50	6.73	4
3	158.00	7.07	5.00	4.47	4
3 1/2	129.75	21.01	10.50	16.20	4
4	135.00	13.29	6.64	9.84	4
4 1/2	144.50	6.56	3.28	4.54	4
5	122.50	23.33	16.50	19.04	4
12	116.50	9.19	6.50	7.89	4
24	138.50	4.95	3.5	3.57	4

TABLA 16.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE GLUCOSA SERICA.  
 COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA  
 CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	NS
1/2	NS
3/4	S (p<0.05)
1	S (p<0.05)
1 1/2	NS
2	S (p<0.05)
2 1/2	S (p<0.05)
3	S (p<0.001)
3 1/2	NS
4	S (p<0.01)
4 1/2	S (p<0.001)
5	NS
12	NS
24	S (p<0.05)

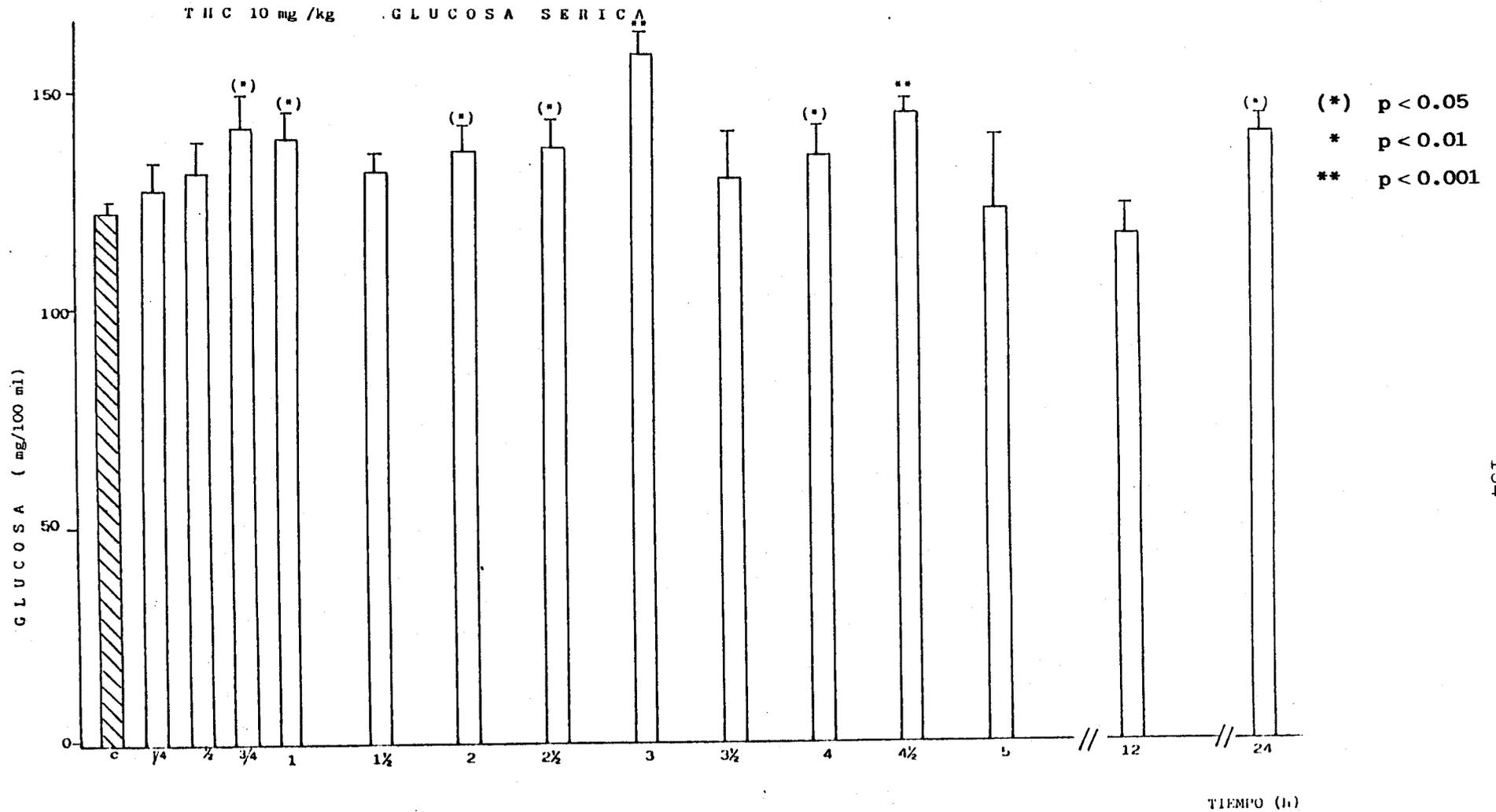


Fig.31.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA GLUCOSA SERICA EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10 mg/Kg).

La actividad de la PFK queda reflejada en las TABLAS 17.1 y 17.2 y Figura 32. Esta enzima se encuentra inhibida alrededor del 37% en las 2 primeras horas con alta significación estadística ( $p < 0,001$ ). A las 24 horas se mantiene aún el valor por debajo de la actividad normal considerada en los animales control.

TABLA 17.1

EVOLUCION DEL VALOR DE PFK EN FRACCION S9 DE HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c. CON THC (10 mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	27.95	5.52	1.95	19.74	8
1/2	27.83	6.88	2.43	24.71	8
3/4	34.64	12.31	4.35	35.55	8
1	31.33	5.49	1.58	17.51	12
1 1/2	29.88	1.90	0.67	6.37	8
2	32.45	1.76	0.62	5.43	8
2 1/2	43.48	10.20	5.10	23.47	4
3	49.79	4.73	2.36	9.50	4
3 1/2	35.21	10.73	3.79	30.49	8
4	38.36	10.79	3.82	28.13	8
4 1/2	38.94	9.36	3.31	24.03	8
5	34.62	0.52	0.26	1.50	4
12	37.40	2.31	1.15	6.17	4
24	36.18	1.95	0.97	5.38	4

TABLA 17.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE PFK.  
 COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA  
 CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	S ( $p < 0.001$ )
1/2	S ( $p < 0.001$ )
3/4	NS
1	S ( $p < 0.001$ )
1 1/2	S ( $p < 0.001$ )
2	S ( $p < 0.001$ )
2 1/2	NS
3	NS
3 1/2	NS
4	NS
4 1/2	NS
5	S ( $p < 0.01$ )
12	S ( $p < 0.05$ )
24	S ( $p < 0.05$ )

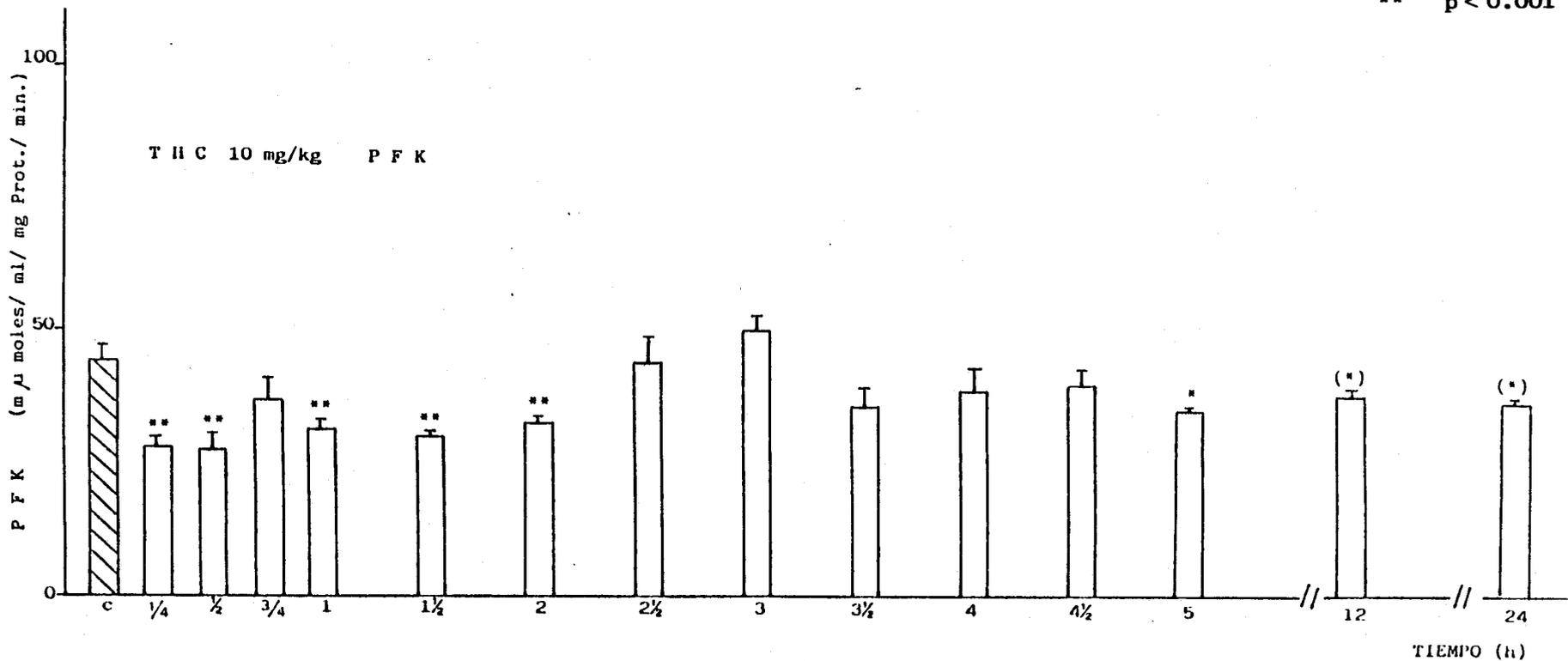


Fig. 32.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD DE LA P F K EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10 mg/Kg).

Los resultados obtenidos para la actividad de la G-6-P DH se expresan en las TABLAS 18.1 y 18.2 y se representan en la Figura 33. Se observa una inhibición de esta enzima en todos los tiempos, llegando alrededor del 45% en varios momentos (45 minutos, 3½ horas y 5 horas) y al 60% a las 24 horas. Estas comparaciones con animales tratados y control poseen un alto nivel de significación ( $p < 0,001$ ).

TABLA 18.1

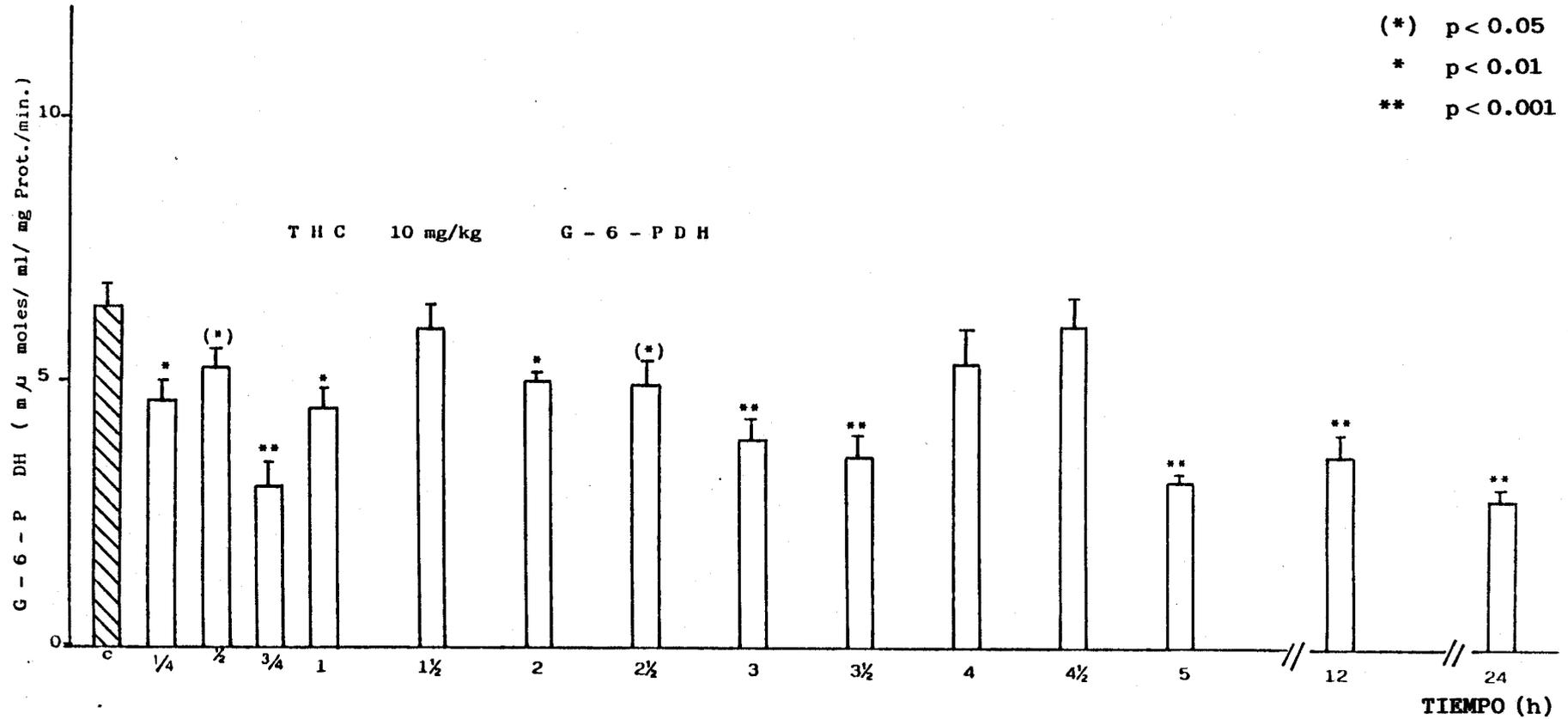
EVOLUCION DEL VALOR DE G-6-P DH EN FRACCION S9 DE HIGADO DE RATAS TRATADAS CON THC (10 mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	4.57	1.12	0.40	24.67	8
1/2	5.24	0.87	0.31	16.70	8
3/4	3.00	1.21	0.43	40.39	8
1	4.47	1.27	0.36	28.31	12
1 1/2	5.94	1.18	0.42	19.82	8
2	5.02	0.53	0.19	10.62	8
2 1/2	4.92	0.81	0.41	16.53	4
3	3.92	0.76	0.38	19.44	4
3 1/2	3.59	1.10	0.39	30.73	8
4	5.36	1.78	0.63	33.13	8
4 1/2	6.05	1.56	0.55	25.80	8
5	3.13	0.23	0.12	7.56	4
12	3.63	0.82	0.41	22.57	4
24	2.58	0.39	0.19	14.99	4

TABLA 18.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE G-6-P DH. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	S ( $p < 0.01$ )
1/2	S ( $p < 0.05$ )
3/4	S ( $p < 0.001$ )
1	S ( $p < 0.01$ )
1 1/2	NS
2	S ( $p < 0.01$ )
2 1/2	S ( $p < 0.05$ )
3	S ( $p < 0.001$ )
3 1/2	S ( $p < 0.001$ )
4	NS
4 1/2	NS
5	S ( $p < 0.001$ )
12	S ( $p < 0.001$ )
24	S ( $p < 0.001$ )



**Fig.33.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD DE LA G - 6 - P D H EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10mg/Kg).**

La evolución a lo largo de los tiempos considerados en este tratamiento, de la actividad de la UDPG DH queda reflejada en las TABLAS 19.1 y 19.2, así como en la Figura 34.

A la vista de estos resultados, sólo al principio del tratamiento, hay un ligero incremento de esta actividad, que estadísticamente no es significativo. A partir de los 45 minutos se observa una inhibición en todo momento, siendo más elevada a los 45 minutos, 12 y 24 horas, y un nivel de significación alto en el estudio estadístico.

TABLA 19.1

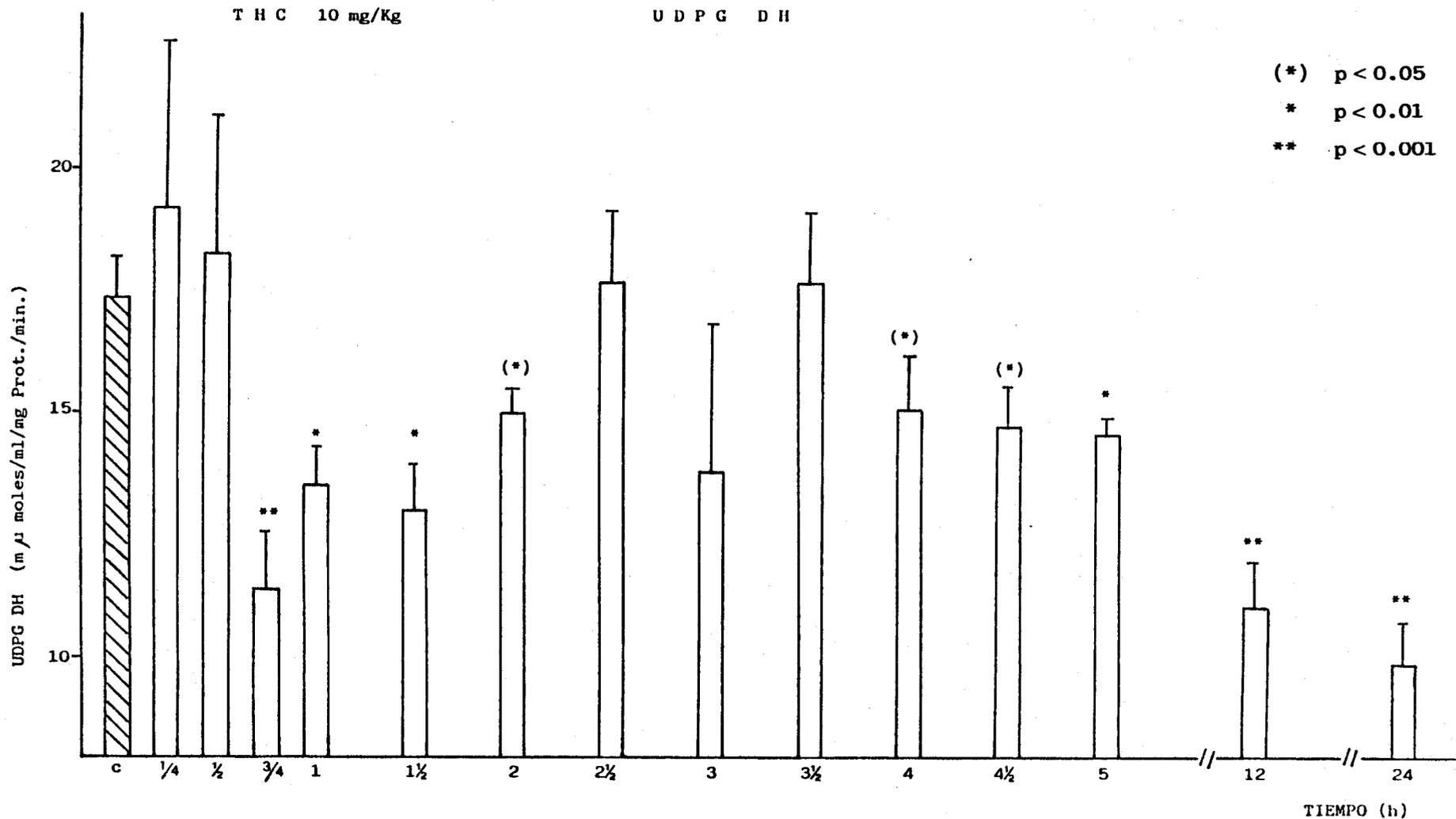
EVOLUCION DEL VALOR DE UDPG DH EN FRACCION S9 DE HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c. CON THC (10 mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	19.23	9.58	3.38	49.79	8
1/2	18.30	8.26	2.92	45.15	8
3/4	11.37	3.21	1.13	28.24	8
1	13.50	2.65	0.76	19.67	12
1 1/2	12.99	2.81	0.99	21.68	8
2	15.03	1.42	0.50	9.44	8
2 1/2	17.70	2.91	1.46	16.47	4
3	13.81	6.09	3.05	44.12	4
3 1/2	13.14	5.46	1.93	41.58	8
4	15.12	3.10	1.10	20.54	8
4 1/2	14.75	2.34	0.83	15.86	8
5	14.61	0.65	0.32	4.44	4
12	11.03	1.75	0.87	15.88	4
24	9.87	1.78	0.89	18.08	4

TABLA 19.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE UDPG DH. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	NS
1/2	NS
3/4	S ( $p < 0.001$ )
1	S ( $p < 0.01$ )
1 1/2	S ( $p < 0.01$ )
2	S ( $p < 0.05$ )
2 1/2	NS
3	NS
3 1/2	NS
4	S ( $p < 0.05$ )
4 1/2	S ( $p < 0.05$ )
5	S ( $p < 0.01$ )
12	S ( $p < 0.001$ )
24	S ( $p < 0.001$ )



**Fig. 34.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD DE LA U D P G D H EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10 mg/Kg).**

A continuación se exponen los resultados obtenidos y su estudio estadístico para el amoníaco sanguíneo en cada momento del tratamiento. Se recogen en las TABLAS 20.1 y 20.2, así como en la Figura 35.

Lo más llamativo a destacar es el aumento que se produce en este parámetro a la hora de tratamiento, que representa un 75% ( $p < 0,0001$ ) y a las 3 horas se observa otra subida aunque menor (27%).

TABLA 20.1

EVOLUCION DEL VALOR DE AMONIACO EN SANGRE DE RATAS TRATADAS s.c.  
 CON THC (10mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	75.08	27.63	7.97	36.80	12
1/2	67.67	22.68	6.54	33.51	12
3/4	79.40	15.64	4.95	19.70	10
1	120.67	47.84	13.81	39.65	12
1 1/2	61.58	13.63	3.94	22.14	12
2	61.00	27.09	7.82	44.41	12
2 1/2	73.50	11.21	5.60	15.25	4
3	88.25	26.16	13.08	29.64	4
3 1/2	61.00	15.08	5.33	24.72	8
4	69.50	22.06	7.80	31.74	8
4 1/2	68.75	15.25	5.39	22.18	8
5	81.25	10.62	5.31	13.08	4
12	74.75	16.66	8.33	22.29	4
24	71.25	14.43	7.21	20.25	4

TABLA 20.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE AMONIACO. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	NS
1/2	NS
3/4	NS
1	S ( $p < 0.001$ )
1 1/2	NS
2	NS
2 1/2	NS
3	S ( $p < 0.01$ )
3 1/2	NS
4	NS
4 1/2	NS
5	S ( $p < 0.05$ )
12	NS
24	NS

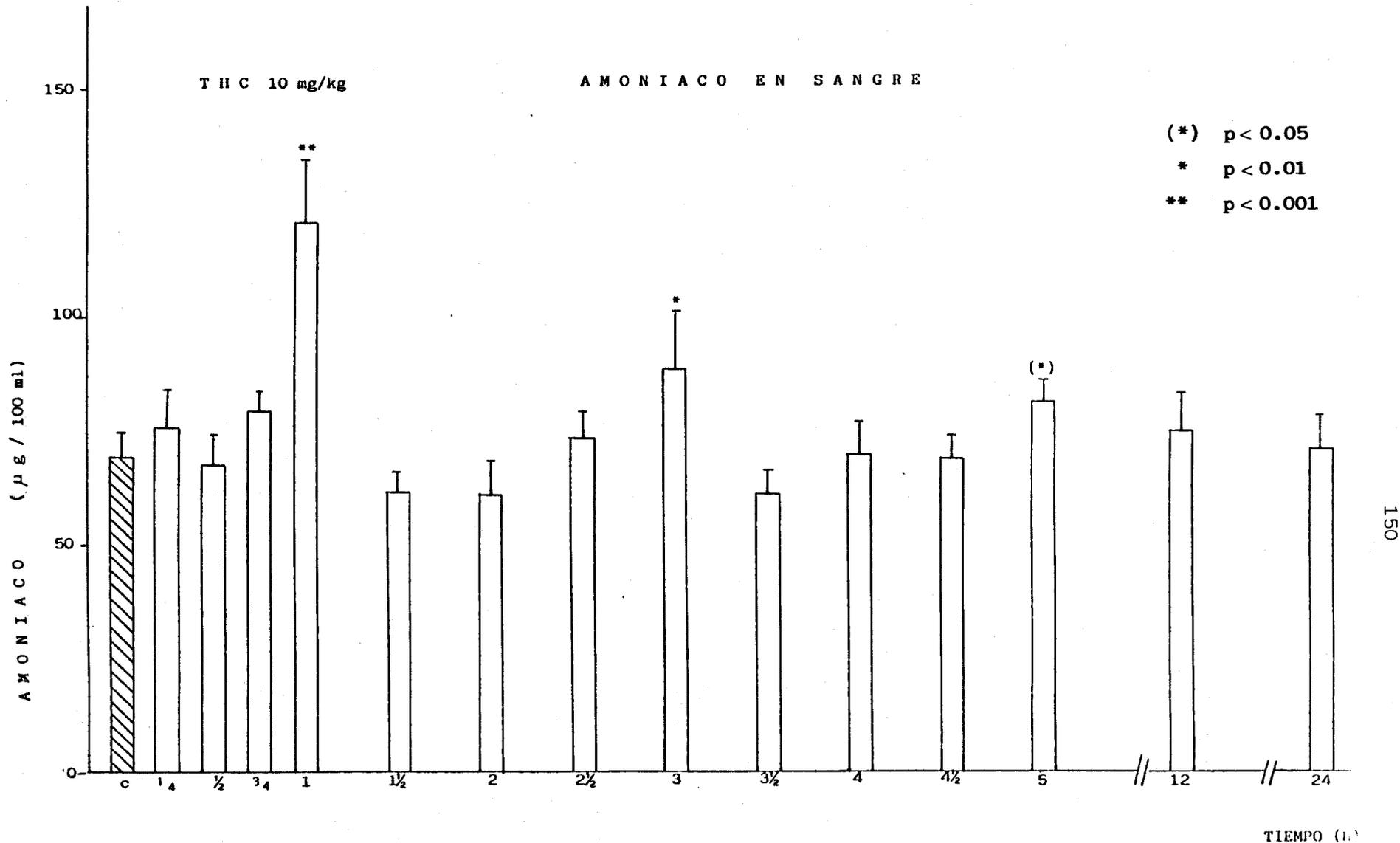


Fig.35.- EVOLUCION TEMPORAL DEL AMONIACO SANGUINEO EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10 mg/Kg).

En las TABLAS 21.1 y 21.2 y Figura 36 se detalla la evolución que sufre la actividad enzimática de la Gln-sintetasa. A la vista de los resultados y después del estudio estadístico se observa que existe una activación que llega hasta el 91% a las 2½ horas y que continúa por encima de la normalidad (52%) a las 24 horas de tratamiento.

TABLA 21.1

EVOLUCION DEL VALOR DE Gln-SINTETASA EN FRACCION S9 DE HIGADO DE RATAS TRATADAS s.c. CON THC (10 mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	42.96	4.03	2.01	9.38	4
1/2	42.16	4.60	2.30	10.92	4
3/4	42.98	5.07	2.54	11.81	4
1	50.39	9.20	3.75	18.25	6
1 1/2	45.68	10.66	5.33	23.32	4
2	55.71	15.04	7.52	26.99	4
2 1/2	61.20	3.71	2.63	6.07	4
3	42.65	1.27	0.90	2.98	4
3 1/2	43.23	5.35	2.67	12.38	4
4	44.59	10.26	5.13	23.00	4
4 1/2	51.75	7.65	3.82	14.79	4
5	48.48	1.14	0.80	2.35	4
12	47.90	15.75	11.14	32.89	4
24	48.79	3.26	2.30	6.68	4

TABLA 21.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE Gln-SINTETASA. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	S (p<0.01)
1/2	S (p<0.01)
3/4	S (p<0.05)
1	S (p<0.01)
1 1/2	S (p<0.05)
2	S (p<0.01)
2 1/2	S (p<0.01)
3	S (p<0.01)
3 1/2	S (p<0.05)
4	S (p<0.05)
4 1/2	S (p<0.01)
5	S (p<0.01)
12	S (p<0.05)
24	S (p<0.05)

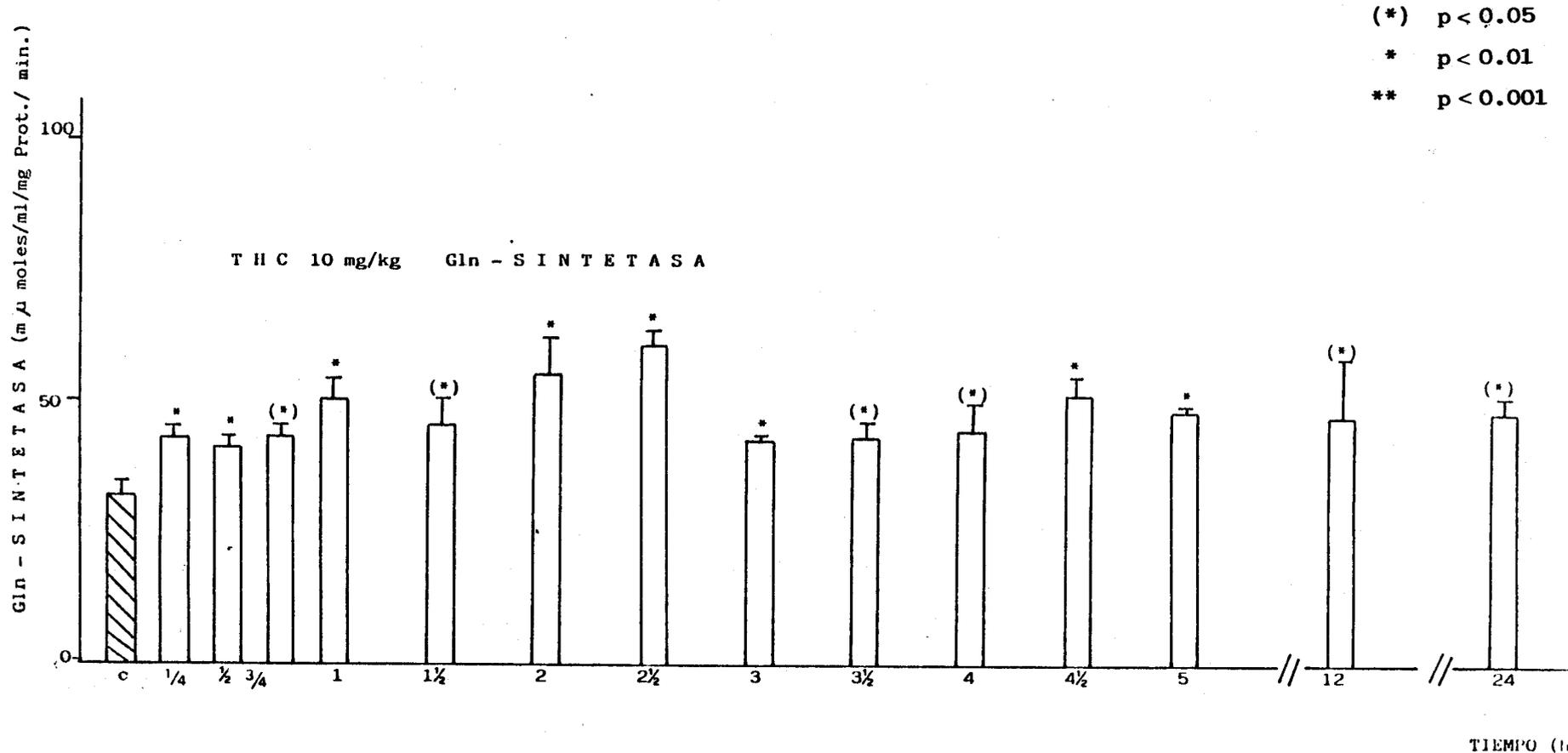


Fig.36.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA ACTIVIDAD DE LA Gln - SINTETASA EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10 mg/Kg).

En las TABLAS 22.1 y 22.2 y Figura 37 se exponen los valores de insulina sérica en cada momento del tratamiento. Como se puede observar existe una gran variabilidad en los resultados con un error estandar elevado, encontrándose siempre el valor por encima del de los animales control.

TABLA 22.1

EVOLUCION DEL VALOR DE LA INSULINA EN SUERO DE RATAS TRATADAS  
s.c. CON THC (10 mg/kg). ESTADISTICA BASICA.

TIEMPO (H)	MEDIA	DESVIACION TIPO	ERROR ESTANDAR	COEFICIENTE VARIACION	TAMAÑO
1/4	15.77	2.41	1.20	15.28	4
1/2	14.62	3.96	1.98	27.06	4
3/4	16.15	6.86	3.43	42.48	4
1	16.12	3.57	1.46	22.16	6
1 1/2	15.15	1.34	0.67	8.85	4
2	17.40	3.79	1.89	21.79	4
2 1/2	17.05	4.17	2.95	24.47	4
3	18.85	3.89	2.75	20.63	4
3 1/2	16.92	4.33	2.17	25.62	4
4	16.60	4.31	2.16	25.99	4
4 1/2	15.80	2.17	1.08	13.77	4
5	16.80	0.42	0.30	2.52	4
12	17.70	4.10	2.90	23.17	4
24	17.70	0.56	0.40	3.19	4

TABLA 22.2

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LOS VALORES DE INSULINA. COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES OBTENIDAS PARA CADA TIEMPO RESPECTO AL CONTROL.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION
1/4	NS
1/2	NS
3/4	NS
1	NS
1 1/2	NS
2	NS
2 1/2	NS
3	NS
3 1/2	NS
4	NS
4 1/2	NS
5	NS
12	NS
24	NS

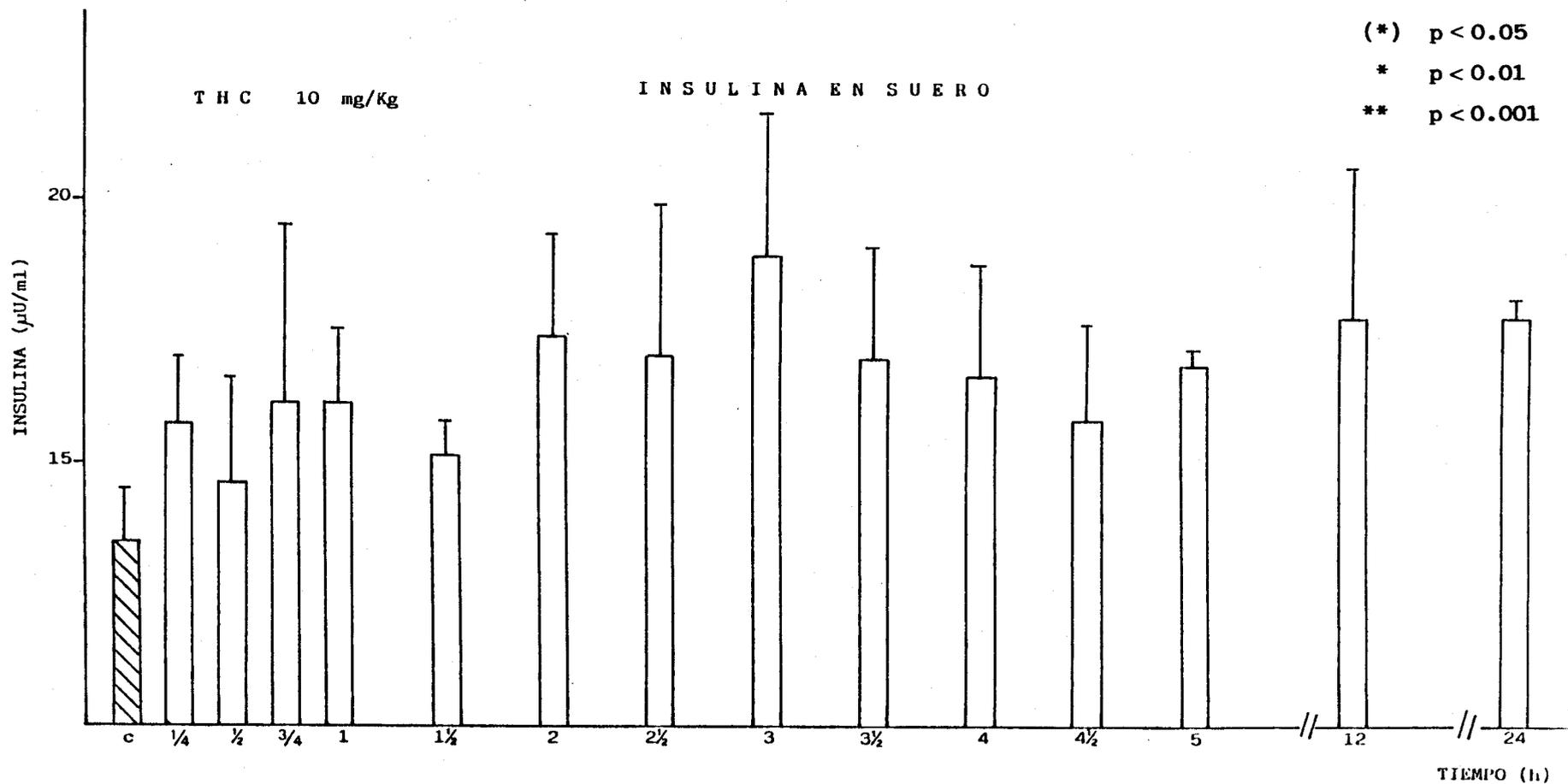


Fig.37.- EVOLUCION TEMPORAL DE LA INSULINA SERICA EN RATAS TRATADAS CON UNA DOSIS s. c. DE THC PURO (10 mg/Kg).

Por último se incluyen las TABLAS 23 y 24 en las cuales se recoge el estudio estadístico del tratamiento con THC puro y su evolución a lo largo de 24 horas.

Se realizó una comparación de medias independientes de los distintos parámetros bioquímicos y actividades enzimáticas estudiadas, considerando cada tiempo respecto al anterior.

TABLA 23

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES DE PARAMETROS BIOQUIMICOS EN EL TRATAMIENTO CON THC (10 mg/kg) CONSIDERANDO CADA TIEMPO RESPECTO AL ANTERIOR.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION				
	GLUCOGENO	GLUCOSA HEPATICA	GLUCOSA SERICA	AMONIACO SANGUINEO	INSULINA SERICA
1/2-1/4	S(p<0.05)	NS	NS	NS	NS
3/4-1/2	S(p<0.001)	NS	NS	NS	NS
1 -3/4	S(p<0.01)	NS	NS	S(p<0.01)	NS
1 1/2-1	NS	NS	NS	S(p<0.01)	NS
2-1 1/2	NS	NS	NS	NS	NS
2 1/2-2	NS	S(p<0.001)	NS	NS	NS
3-2 1/2	S(p<0.001)	NS	S(p<0.01)	S(p<0.05)	S(p<0.05)
3 1/2-3	S(p<0.05)	NS	S(p<0.01)	S(p<0.05)	S(p<0.05)
4-3 1/2	S(p<0.05)	NS	NS	NS	NS
4 1/2-4	NS	S(p<0.05)	NS	NS	NS
5-4 1/2	NS	NS	S(p<0.01)	NS	NS
12 - 5	S(p<0.05)	NS	NS	NS	NS
24 - 12	S(p<0.01)	NS	S(p<0.01)	NS	NS

TABLA 24

RESUMEN DE LOS RESULTADOS DE LA COMPARACION ESTADISTICA DE MEDIAS INDEPENDIENTES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL TRATAMIENTO CON THC (10 mg/kg) CONSIDERANDO CADA TIEMPO RESPECTO AL ANTERIOR.

TIEMPO (H)	NIVEL DE SIGNIFICACION			
	PFK	G-6-P DH	UDPG DH	Gln- SINTETASA
1/2-1/4	NS	NS	NS	NS
3/4-1/2	NS	S(p<0.001)	S(p<0.01)	NS
1 - 3/4	NS	S(p<0.05)	S(p<0.05)	NS
1 1/2-1	NS	S(p<0.05)	NS	NS
2-1 1/2	S(p<0.05)	S(p<0.05)	S(p<0.05)	NS
2 1/2-2	S(p<0.05)	NS	S(p<0.05)	NS
3-2 1/2	NS	NS	S(p<0.01)	S(p<0.01)
3 1/2-3	S(p<0.05)	NS	S(p<0.01)	NS
4-3 1/2	NS	S(p<0.05)	S(p<0.05)	NS
4 1/2-4	NS	NS	NS	NS
5-4 1/2	NS	S(p<0.001)	NS	NS
12 - 5	NS	NS	S(p<0.01)	NS
24 - 12	NS	NS	S(p<0.05)	NS

## DISCUSSION

## DISCUSION

Se sabe que uno de los efectos moleculares más llamativos y precoces de los productos cannábicos en la célula hepática, es la producción de un fuerte decremento en la reserva de glucógeno (El-Souroy y col., 1.966; Sprague y col., 1.973; Repetto y col., 1.979, 1.981 b). Este no suele venir acompañado de modificaciones significativas en la glucosa intrahepática o circulante (Hollister y col., 1.968; Weil y col., 1.969; Repetto y col., 1.979, 1.981 b), aunque algunos autores hayan citado hipoglucemia (Beringer y col., 1.932; Lindeman, 1.933) o hiperglucemia más o menos transitoria (Carbonaro e Imbasi, 1.948; El-Sourogui y col., 1.966).

En trabajos anteriores con ratas a las que administrábamos, s.c., una dosis única de resina de cannabis correspondiente a 200 mg THC/Kg habíamos observado que este efecto es máximo a las 4 horas (Rodríguez-Vicente, 1.981), alcanzándose un 54'39% de reducción. A las 24 horas el contenido en glucógeno parecía estar recuperándose, aunque los valores estaban todavía un 20-30% por debajo de los normales.

La glucosa intrahepática no se alteraba de forma estadísticamente significativa, ni tampoco la glucosa sérica. Dado que el decremento de glucógeno no se corresponde con un incremento de la glucosa se deduce que debe haber una activación del metabolismo intracelular de ésta. Inicialmente habíamos investigado la vía de la glucólisis, que si bien encontramos algo incrementada (27'31% de activación de la aldolasa a las 12 horas del tratamiento agudo), no quedaba totalmente explicada la desaparición inmediata de la glucosa intracelular.

Por el contrario, el hecho de que no apareciera glucosa circulante se achacó a que observamos deteriorada la actividad de la G-6-Pasa de membrana y por tanto su transporte extracelular. Esto está de acuerdo con los conocimientos que se tienen sobre la acción de los cannabinoides en otros mecanismos de membrana (Nahas, 1.978; Dolby y Kleinsmith, 1.977 y Repetto y col., 1.981 a).

Nuestros resultados actuales, que se exponen en esta memoria, confirmaron en primer lugar el efecto máximo a las 4 horas sobre la

reserva de glucógeno hepático (58% de reducción) sin modificación estadística significativa de la glucosa intra y extrahepáticas a las mismas dosis que habíamos utilizado con anterioridad. Hemos comprobado asimismo que la vía glucolítica no se encuentra activada ya que otra enzima clave de esta vía, la PFK, sólo manifestó un ligero incremento a las 4 horas (12%), estadísticamente no significativo.

Por lo tanto no parece que el metabolismo energético de la glucosa intervenga en su rápida desaparición.

Tampoco hemos detectado una participación de la vía de las pentosas-fosfato ya que la G-6-P DH, que rige el primer paso de ésta, si bien mostró una activación que alcanzó un 35% a las 4 horas, biológicamente no parece plausible el que este incremento sea suficiente para justificar un tan rápido consumo de la glucosa liberada en la destrucción del glucógeno. No obstante se puede aceptar un ligero aumento del suministro intracelular de piridin-nucleótidos reducidos, que actualmente no podemos explicar ya que tenemos comprobado que los productos cannábicos inhiben de forma también muy llamativa las oxidaciones microsómicas (NADPH oxidasa y citP-450-oxido-reductasa) (Bartova y Birmingham, 1.976; Sanz y col., 1.988). Consecuentemente, se hace necesario investigar en el futuro si la célula hepática afectada por los productos cannábicos a estas dosis pudiera tener aumentados sus requerimientos de carácter reductor.

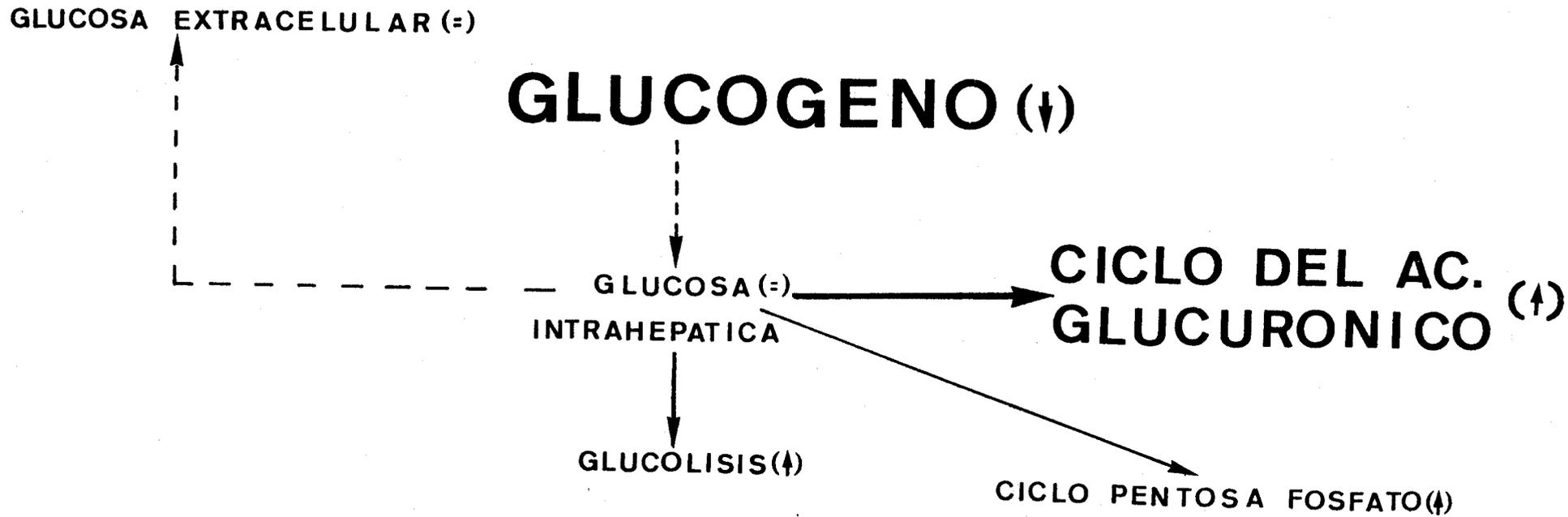
Por el contrario, hemos observado un incremento del 69% a las 4 horas del tratamiento en la actividad de la enzima UDPG DH. Por tanto, parece evidente que la glucosa se consume en la producción de ácido glucurónico para favorecer los mecanismos de eliminación de este tóxico. Dado que este resultado parece aclarar el destino de la glucosa, completamos los experimentos con un seguimiento de lo que ocurre con esta actividad enzimática a lo largo del tiempo. A las 12 y hasta al menos las 24 horas del tratamiento, con esta misma dosis s.c. de resina, la actividad de UDPG DH aparece duplicada (94% por encima de los controles sin tratamiento).

Para aclarar la participación del THC en los efectos observados con la resina, realizamos un estudio en idénticas condiciones, en el que se administró 200 mg/Kg del producto puro.

En él, observamos de nuevo un decremento de glucógeno (24%) aunque menos intenso, con una apreciable disminución de glucosa hepática (33,5%) sin modificación de la glucosa extracelular. Así mismo resulta que: a) El incremento de la PFK (14,8%), escasamente significativo muestra de nuevo que no parece haber modificación en la vía glucolítica. b) Al igual que ocurrió con la resina, la UDPG-DH sufre un incremento del mismo orden (67%). c) Se detectan algunas diferencias entre el efecto de la resina y del THC puro en cuanto al incremento de G-6-P DH, que fue mayor con el THC (74%) que con la resina (35%).

Por tanto podemos deducir que el THC es, al menos en parte, el responsable de la activación del metabolismo glucídico observado, aunque: podría ocurrir que componentesla resina, cannábicos o no, enmascaren algo el efecto del THC.

A la vista de lo expuesto, se propone por tanto el esquema que aparece en la figura 38 como mecanismo de acción de los productos cannábicos a dosis de 200 mg de THC/Kg.



**FIG. 38:** ESQUEMA RESUMEN DE LA AFECTACION DEL METABOLISMO HEPATICO DE LA GLUCOSA EN RATA TRATADA CON RESINA DE CANNABIS (200MG THC/KG)

La dosis que habíamos administrado se considera una dosis alta de cannabis. Aunque no hay acuerdo sobre la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) de este tóxico, el equivalente a 200 mg de THC/Kg que nosotros suministramos puede encontrarse entre 1/3-1/4 de la  $DL_{50}$  s.c. en ratas. Dado que está demostrado para algunas de las acciones del cannabis un efecto bifásico entre dosis alta y baja de los productos cannábicos (acción sobre los complejos lípido-protéicos de las membranas, sobre el AMPc y adenilciclase, etc.), estimamos de interés estudiar como se afecta el metabolismo hepático de la glucosa con dosis baja de resina a lo largo de las 24 horas siguientes a una única administración. Elegimos para ello la correspondiente al contenido de un sólo cigarrillo (10 mg THC/Kg), y repetimos los experimentos en idénticas condiciones con la misma dosis de THC puro, que es el cannabinoide al que se adjudica la acción principal. Con ello pretendíamos conocer si las alteraciones observadas pueden ser achacadas a este cannabinoide o si contribuyen los otros (CBD, CBN, etc.) o los constituyentes no cannábicos presentes en la resina.

De los resultados obtenidos cabe deducir un claro paralelismo en los efectos producidos en ratas por la resina y por el THC puro, a la dosis baja ensayada, sobre los parámetros considerados del metabolismo de la glucosa.

Se repitió el fuerte decremento del glucógeno observado con la dosis alta. Con la resina a dosis baja apareció ya entre los 30 y 60 minutos primeros una disminución del 50%, aunque se repitió una segunda bajada algo más pequeña a las mismas 4 horas (35%) que en el tratamiento a dosis alta. A las 24 horas el contenido hepático estaba restablecido e incluso un poco por encima de los valores normales, con significación estadística, (17%). El THC produjo un efecto aún mayor que la resina (65%) y los máximos aparecieron a los 45 minutos y a las 3½ horas de la administración. A las 24 horas se encontraron los niveles igualmente restablecidos e incluso ligeramente superiores a los controles (20%).

En los tratamientos llevados a cabo con el THC, la evolución de la desaparición de glucógeno se confirmó con la que sufrió la actividad fosforilásica. Esta originó un comportamiento paralelo al de los niveles de glucógeno, manteniéndose elevada, con un máximo a los mismos 45

minutos y 3½ h. A las 24 horas en que el glucógeno ya estaba normalizado, la actividad de la fosforilasa es muy semejante a la de los animales control.

Esta precocidad en la acción del THC puro respecto a la resina se ha repetido en prácticamente todos los demás parámetros y actividades enzimáticas estudiadas, como veremos más adelante, y la cuantía del efecto ha sido semejante o mayor.

Solamente hemos observado un comportamiento algo diferente en el contenido en glucosa intrahepática y extracelular. La glucosa hepática mostró oscilaciones a lo largo del tiempo tras la administración de resina, con dos mínimos a la hora y a las 24 horas con un 30% y un 40% de reducción, respectivamente, y un máximo a las 3 horas (24% de aumento). Con el THC se mantuvieron, en todos los tiempos considerados, unos valores bajos, con dos mínimos, uno amplio que se prolongó desde las 2½ hasta las 4½ y que llega al 50% de reducción y otro a las 24 horas de un 30%. En ningún momento se detectó el máximo observado con el tratamiento con resina.

A pesar de la ligera discrepancia entre efectos de resina y THC, en este parámetro se encuentra todavía más acusado el fenómeno observado con la dosis alta de resina, de la desaparición de glucógeno sin que se manifieste aumento de glucosa hepática puesto que ésta incluso disminuye significativamente.

La glucosa sérica se mantuvo dentro de los márgenes de normalidad o algo por debajo con la resina, mientras que con el THC estuvo siempre ligeramente por encima, con un máximo a los 45 minutos y otro a las 3 horas con valores que sobrepasaron a los normales en un 17% y 31% respectivamente.

Para valorar el significado biológico de estos aumentos sería necesario conocer también la actuación sobre las enzimas implicadas en el transporte extracelular (G-6-Pasa), que no habíamos considerado en este trabajo y que será objeto de estudios posteriores.

El comportamiento enzimático fué también totalmente paralelo con resina y THC, a dosis bajas, pero contrario a lo que ocurrió con la dosis alta. Tanto la PFK como la G-6-P DH estuvieron en todo momento por

debajo de los valores normales con mínimos que llegaron al 47% con resina y al 37% con THC para la primera enzima y al 49% y 43% respectivamente para la segunda.

Por lo tanto en este caso, ni la vía de la glucólisis ni la de las pentosas fosfato contribuyen en absoluto a explicar el consumo de la glucosa intracelular, como en parte ocurría con la dosis alta.

La mayor discrepancia entre dosis alta y dosis baja se da en la UDPG DH. Mientras que la vía metabólica regida por esta enzima parecía aclarar el destino de la glucosa con la resina de 200 mg THC/Kg, la dosis de 10 mg THC/Kg no solamente no la incrementó sino que su actividad incluso se mantuvo por debajo de la normalidad.

A la vista de los resultados, se hacía necesario buscar nuevas posibilidades de alteración que pudieran repercutir en el metabolismo de la glucosa. Habíamos encontrado en la bibliografía un trabajo en el que Pasquale y col. (1.978) habían estudiado en perro el efecto de dosis bajas únicas de resina sobre la glucorregulación. Estos autores observaron que aparecía en suero una hiperglucemia inicial transitoria acompañada de un aumento de amoníaco, igualmente transitorio y una disminución de insulina. Consideramos pues de interés comprobar si en rata se producía este mismo efecto, ya que nosotros también habíamos observado con la misma dosis de THC el aumento de glucosa sérica. Además, si el incremento de amoníaco tenía lugar, cabía la posibilidad de que éste produjera un incremento metabólico en hígado, en la vía de síntesis de glutamina que es una de las formas de transporte de amoníaco en el organismo. A su vez, la síntesis de glutamina está conectada a la glucólisis puesto que la glutamina y la F-6-P están relacionadas mediante una reacción de transaminación en una de las vías de transformación de la F-6-P.

Efectivamente, observamos un fuerte incremento del amoníaco en sangre, tanto con resina como con THC a dosis baja. Este aumento transitorio alcanza un valor del 72-73% que ocurre a las 4 horas con resina y a la hora con THC, y está de acuerdo con los resultados de Pasquale y col. (1.978). Con THC se da un segundo incremento más pequeño

a las 3 horas (27%). De nuevo en este parámetro el efecto del THC puro es más precoz que el de la resina.

La determinación de Gln-sintetasa hepática mostró que esta enzima se encuentra activada en ambos tratamientos entre las 2 horas y las 12 horas para la resina con un 45% de incremento y hasta las 24 horas con el THC, alcanzándose hasta un 91% de aumento a las 2 $\frac{1}{2}$  y manteniéndose en un 52% a las 24 horas. El THC por tanto ejerce de nuevo una acción mayor, más temprana y más prolongada que la resina.

Pese a que es necesario ahondar en este tema, el incremento de la glutamina sintetasa nos permite deducir, de acuerdo con nuestra hipótesis, la posibilidad de un incremento de la vía de transformación de F-6-P a través de la formación de glucosamina. Ello explicaría además que si la F-6-P se consume por esta vía, provocaría un déficit como sustrato intermedio de la glucólisis y de ahí la inactivación de la PFK así como la de la G-6-P DH, tal como hemos observado.

Este mecanismo no se había considerado cuando se realizaron los primeros experimentos con dosis alta. Dado que existen actualmente grandes dificultades para obtener resina de buena calidad en cantidad suficiente como para repetir dicho experimento, sólo pudimos hacer algunas determinaciones de Gln-sintetasa en fragmentos de hígado mantenidos en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , restantes de los experimentos anteriores. Los resultados indicaron una inhibición a las 4 horas del 46% de esta enzima y no se encontró variación respecto a los resultados controles cuando el tratamiento se realizó con THC puro a la misma dosis. Si bien es necesario hacer constar que habrá que confirmar este hecho en cuanto sea posible, de nuevo, no obstante, parece manifestarse una acción contraria entre dosis alta y baja. En el esquema de la figura 39 se resume el mecanismo de acción de los productos cannábicos a dosis bajas.

GLUCOSA EXTRAHEPATICA(=)

**GLUCOGENO(↓)**

GLUCOSA (↓)  
INTRAHEPATICA

CICLO DEL ACIDO  
GLUCURONICO (↓)

( F-6-P )

CICLO PENTOSA FOSFATO (↓)

GLUCOLISIS(↓)

**VIA ELIMINACION  
DEL AMONIACO (↑)**

FIG.39: ESQUEMA RESUMEN DE LA AFECTACION DEL METABOLISMO HEPATICO DE LA GLUCOSA EN RATA TRATADA CON UNA DOSIS DE 10 MG THC/KG. DE RESINA DE CANNABIS O THC

Por último y sólo en el tratamiento con THC, realizamos un estudio de tanteo de los niveles séricos de insulina, para contrastar lo observado por Pasquale y col. (1.978).

Pese a la gran variabilidad en los resultados obtenidos en la determinación de insulina y aunque las diferencias no son estadísticamente significativas, se observa una tendencia a estar en todo momento por encima de los límites de normalidad dados por nuestros animales control. Esto estaría en desacuerdo con los autores citados.

Puesto que a las dos dosis consideradas se puede afirmar que existe un notable paralelismo en los efectos encontrados tanto con la resina como con el THC puro, podemos deducir que las alteraciones aparecidas en el metabolismo hepático de la glucosa son imputables en gran medida a este compuesto activo y no a otros componentes de la resina. Sería necesario, no obstante, confirmar en trabajos posteriores si los otros cannabinoides administrados separadamente, en forma pura, y siguiendo el mismo modelo experimental, tienen o no una acción semejante. A priori quizás pudiéramos adelantar que en los parámetros estudiados por nosotros no parece que exista un efecto aditivo ya que en todo caso la acción del THC puro suele ser mayor o más precoz que la de la resina y tampoco parece probable que existe, en términos generales, un efecto antagónico, aunque como hemos señalado pudiera darse un cierto enmascaramiento en la dosis alta, en la que otros componentes se encuentran también en mayor cantidad total.

Por otra parte, aunque el decremento de glucógeno es una constante, independiente de la dosis, en los efectos producidos por el cannabis, la repercusión en el metabolismo de la glucosa que se deriva de esta degradación es diferente según la dosis considerada, estimulándose aparentemente vías diferentes. Por lo tanto esto sería uno más de los efectos bimodales, mal llamados bifásicos, citados para este tóxico.

A dosis altas parece evidente que la glucosa se consume en la producción de ácido glucurónico para favorecer los mecanismos de eliminación de este tóxico. Por lo tanto, aunque el decremento de glucógeno es un fenómeno que ocurre de forma precoz e intensa tras la administración aguda de una dosis alta, no parece que esté implicado en

su mecanismo molecular se acción, sino que sería un proceso secundario dependiente de la puesta en funcionamiento de los procesos de desintoxicación celular.

A dosis bajas, podemos deducir que los cannabinoides afectan al metabolismo glucídico del hepatocito, y que el efecto bioquímico primario podría ser un incremento de amoníaco intracelular que desequilibraría el metabolismo normal de la célula hacia la vía de eliminación de este tóxico.

Sabemos además, que los cannabinoides deterioran el metabolismo oxidativo microsomal (Sanz y col., 1.988). Nos encontramos por lo tanto ante dos fenómenos, uno de aumento de ión amonio y otro de decremento de las vías de destoxicación oxidativa, y ambos están clínicamente relacionados con los mecanismos moleculares de las encefalopatías hepáticas. (Zieve, 1.981), que pudieran intervenir en el deterioro neurológico de los adictos a esta droga.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

- 1.- Existe un notable paralelismo de los efectos producidos en ratas por el extracto de cannabis y por el tetrahidrocannabinol (THC) puro, sobre el metabolismo hepático de la glucosa.
- 2.- A dosis bajas el efecto del THC puro es mayor y más precoz que el de la resina; a dosis alta se aprecia un cierto enmascaramiento de efectos por los otros productos presentes en la resina.
- 3.- Se confirma el fuerte decremento de glucógeno como efecto más inmediato e independiente de la dosis. Este efecto es reversible, recuperándose en 24 horas.
- 4.- El decremento de glucógeno no se acompaña de modificación significativa del contenido de glucosa intracelular o circulante.
- 5.- En los tratamientos con THC puro a dosis baja se ha comprobado que la desaparición del glucógeno es simultánea al aumento de la actividad fosforilásica.
- 6.- Las vías para el consumo de la glucosa procedente de la degradación del glucógeno son diferentes a dosis bajas y a dosis altas, lo que representa un efecto tipo bimodal de los productos cannábicos.
- 7.- A dosis alta se halla incrementada la vía de detoxicación por glucuronación, lo que interpretamos como una manifestación secundaria no directamente implicada en el mecanismo de acción molecular.
- 8.- A dosis baja aparece activada la vía de transaminación de la F-1-6-diP implicada en los procesos de eliminación de  $\text{NH}_3$ . Este efecto puede formar parte del mecanismo primario de acción.
- 9.- Los productos cannábicos, por tanto, afectan al metabolismo hepático de la glucosa en rata, siendo el THC el responsable de esta acción, sin, al parecer, efectos sinérgicos de los otros componentes, cannabinoides o no.

## BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ABEL, E.L. (1.979)  
Behavioural teratology of marihuana extract in rats.  
Neurobehav. Toxicol. 1, (4), 285-287.
- ABEL, E.L. (1.980)  
Prenatal exposure to Cannabis: A critical review of effects on growth development and behaviour.  
Behav. Neural. Biol. 29, (2), 137-156.
- ABEL, E.L. (1.981)  
Marihuana and sex: A critical survey.  
Drug. Alcohol. Depend. 8, (1), 1-22.
- ABEL, E.L. (1.984)  
Effects of  $\Delta^9$ -THC on pregnancy and offspring in rats.  
Neurobehav. Toxicol. Teratol. 6, (1), 29-32.
- Adams, R. (1.940)  
J. Am. Chem. Soc. 62, 2208.  
En: "Marijuana, Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Chemical Effects".  
Ed. R. Mechoulam, Ac. Press, New York and London (1.973).
- ADAMS, R. y BAKER, B.R. (1.940)  
Structure of cannabidiol VII. A Method of synthesis of a tetrahydrocannabinol which possesses marihuana activity.  
J. Amer. Chem. Soc. 62, 2405-2408.
- ADAMS, R.; SMITH, C.M. y LOEWE, S. (1.941)  
Tetrahydrocannabinoles homólogos y análogos con actividad marihuánica X.  
J. Am. Chem. Soc. 63, 1973.
- ADAMS, R.; LOEWE, S.; SMITH, C.M. y Mc PHEE, W.D. (1.942)  
Tetrahydrocannabinol homologs and analogs with marihuana activity.  
J. Amer. Chem. Soc. 64, 694-697.
- AGURELL, S. (1.970)  
Chemical and Pharmacological Studies of Cannabis.

En: "Botany and Chemistry of Cannabis".

Proc. Conf. 1969. Ed. Joyce and Churchill, London 175-191.

- AGURELL, S.; NILSSON, I.M.; OHLSSON, A. y SANDBERG, F. (1.970)  
Elimination of tritium-labelled cannabiniols in the rat with special reference to the development of tests for identification of cannabis users.  
Biochem. Pharmacol. 19, 1933.
- AGURELL, S. y LEANDER, K. (1.971)  
Metabolism of Cannabis VIII. Stability, transfer and absorption of cannabinoid constituents of cannabis (Haschish) during smoking.  
Acta Pharm. Svecice 8, (4), 391-402.
- AGURELL, S.; EDWARD, C. y HALLDIN, M. (1.979)  
Chemical synthesis and biological occurrence of carboxylic acid metabolites of  $\Delta^1(6)$ -tetrahydrocannabinol.  
Drug. Metab. Disposition 7, (3), 155-161.
- ALOZIE, S.O.; MARTIN, B.R.; HARRIS, L.S. y DEWEY, W.L. (1.978)  
 $H^3$ - $\Delta^9$ -THC,  $H^3$ -CBN y  $H^3$ -CBD: Penetration and regional distribution in rat brain.  
Pharmacol. Biochem. Behav. 12, (3), 217-221.
- AMERICAN MEDICAL ASSOCIATION (1.981)  
Marijuana. Its health hazards and therapeutic potentials.  
J. AM. Med. Assoc. 246, (16), 1823-1827.
- ASTOLFI, E. (1.975)  
La Marihuana.  
Colección Toxicomaníade D.E.N.I.A. Tox. 2, 16.
- AVICO, U.; PACIFICI, R. y ZUCCARO, P. (1.985)  
Variation de la teneur en tétrahydrocannabinol des plantes de cannabis permettant de distinguer les plantes de type á fibre des plantes de type á drogue.  
Bull. Stup. 37, (4), 63-69.
- BABERS, R.G.; GONG, H. Jr.; TASHKIN, D.P. y col. (1.987)  
Differential examination of bronchoalveolar lavage cells in tobacco cigarette and marijuana smokers.

- Am. Rev. Respir. Dis. 135, (6), 1271-1275.
- BACZYNSKY, W.O.T. y ZIMMERMAN, A.M. (1.983 a)  
Effects of  $\Delta^9$ -THC, cannabiniol and cannabidiol on the immune system in mice. I. In vivo investigation of the primary and secondary immune response.  
Pharmacology 26, (1), 1-11.
  - BACZYNSKY, W.O.T. y ZIMMERMAN, A.M. (1.983 b)  
Effects of  $\Delta^9$ -THC, cannabiniol and cannabidiol on the immune system in mice. II. In vitro investigation using cultured mouse splenocytes.  
Pharmacology 26, (1), 12-19.
  - BAKER, P.B.; GOUGH, T.A. y TAYLOR, B.J. (1.983)  
The physical and chemical features of Cannabis plants grown in the United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland from seeds of Known origin. Part II: second generation studies.  
Bull. Narc. 35, (1), 51-62.
  - BARNETT, G. y CHIANG, C.W.N. (1.983)  
Effects of marijuana on testosterone in male subjects.  
J. Theor. Biol. 104, (4), 685-692.
  - BARNI COMPARINI, I.; FERRI, S. y CENTINI, F. (1.984)  
Cannabinoid level in the leaves as a tool for the early discrimination of cannabis chemovariants.  
Forensic. Sci. Int. 24, (1), 37-42.
  - BARR, H.M.; STREISSGUTH, A.P.; MARTIN, D.C. y HERMAN, C.S. (1.984)  
Infant size at 8 months of age: Relationship to maternal use of alcohol, nicotine, and caffeine during pregnancy.  
Pediatrics. 74, (3), 336-341.
  - BARTOVA, A. y BIRMINGHAM, M.K. (1.976)  
Effect of  $\Delta^9$ -THC on mitochondrial NADH-oxidase activity.  
J. Biol. Chem. 251, (16), 5002-5006.
  - BEN-ZVI, Z.; MECHOULAM, R. y BURSTEIN, S. (1.970)  
Identification through synthesis of an active  $\Delta^1(6)$ -tetrahydrocannabinol metabolite.  
J. Amer. Chem. Soc. 92, 3468-3469.

- BEN-ZVI, Z.; MECHOULAM, R.; EDERY, H.; PARATH, G. (1.971)  
6- $\beta$ -hydroxy- $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol synthesis and biological activity.  
*Science* 174, (4012), 951.
- BEN-ZVI, Z.; BERGEN, J.R. y BURSTEIN, S. (1.974)  
Cannabinol 7-oic acid: a metabolite of  $\Delta^1$ -THC in the Rhesus monkey.  
*Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol.* 9 (1), 201-204.
- BEN-ZVI, Z. (1.980)  
Epoxide-diol pathway of  $\Delta^1$ -THC in the rat in vitro.  
*Xenobiotica* 10 (11), 805-809.
- BERCHT, C.A.L. y SALEMINK, C.A. (1.969)  
Cannabis.  
*Bull. Stup. UUNN.* 10, 1974.
- BERINGER, K.; BAEYER, W. von y MARX, H. (1.932)  
Zur Klinik des haschisch chrausches.  
*Nevernarzt* 5, 337-350.
- BERTOL, E. y MARI, F. (1.980)  
Observations on cannabinoid content in Cannabis sativa L. grown in  
Tuscany, Italy.  
*Bull. Narc.* 32, (4), 55-60.
- BESCH, N.F.; SMITH, C.G.; BESCH, P.K. y DAUFMAN, R.H. (1.977)  
The effect of marihuana ( $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol) on the  
secretion of luteinizing hormone in the ovariectomized Rhesus monkey.  
*A.M.J. Obstet. Gynecol.* 128, (6), 635-642.
- BHATTACHARYA, S.K.; GHOSH, P. y SANYAL, A.K. (1.980)  
Effects of prostaglandins on some central pharmacological actions of  
cannabis.  
*J. Med. Res.* 71, (6), 955-960.
- BLEVINS, R.D. y REGAN, J.D. (1.976)  
 $\Delta^9$ -THC: Effect on macromolecular synthesis in human and other  
mammalian cells.  
*Arch. Toxicol.* 35, (2), 127-135.
- BLOOM, A.S. (1.982)

- Effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on the synthesis of dopamine and norepinephrine in mouse brain synaptosomes.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **221**, (1), 97-103.
- BOEREM, E.G.; ELSOHLY, M.A. y TURNER, C.E. (1.979)  
 Cannabiripsol: A novel Cannabis constituent.  
*Experientia* **35**, (10), 1278-1279.
  - BOUQUET, T. (1.950)  
Cannabis  
*Bull. Narc. Cot.* **2**, (4), 14-30.
  - BRADFORD, M. (1.976)  
 A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the principle of Protein-Dye Binding.  
*Anal. Biochem.* **72**, 248.
  - BRAUNSTEIN, G.D.; BUSTER, J.E.; SOARES, J.R. y GROSS, S.J. (1.980)  
 Pregnancy hormone concentrations in marijuana users.  
*Life Sci.* **33**, (2), 195-199.
  - BURNEY, L.J.; BOBBIE, B.A. y SEPP, L.A. (1.986)  
 GC/MS and Emit Analysis of  $\Delta^9$ -THC metabolites in plasma and urine of human subjects.  
*J. Anal. Toxicol.* **10**, (2), 56.
  - Burstein, S. y MECOULAM, R. (1.963)  
*J. Am. Chem. Soc.* **90**, 2420.  
 En: "Marijuana Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects"  
 Ed. R. Mechoulam. Ac. Press, New York and London 1.973.
  - BURSTEIN, S.; MENESES, F.; WILLIAMSON, E. y MECOULAM, R. (1.970)  
 Metabolism of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol and active marihuana constituent.  
*Nature* **225**, 87-88.
  - BURSTEIN, S. y KUPFER, D. (1.971)  
 Hydroxylation of trans- $\Delta^1$ -THC by hepatic microsomal oxigenase.  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.* **191**, 61-67.
  - BURSTEIN, S. y RAZ, A. (1.972)

- Inhibition of biosynthesis by  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol.  
Prostaglandins, 2, 369.
- BURSTEIN, S; HUNTER, S.A. y OZMAN, K (1.983)  
Prostaglandins and cannabis XII. The effect of cannabinoid structure on the synthesis of prostaglandins by human lung fibroblasts.  
Mol. Pharmacol. 23, (1), 121-126.
  - CAHN, R.S. (1.930)  
Cannabis indica Resin. I. The Constitution of Nitrocannabinolactona.  
J. Chem. Soc. (London), 986.
  - CAHN, R.S. (1.931)  
Cannabis indica Resin. II.  
J. Chem. Soc. (London), 630.
  - CAHN, R.S. (1.932)  
Cannabis indica Resin. III. The Constitution of Cannabinol.  
J. Chem. Soc. (London), 1342.
  - CAHN, R.S. (1.933)  
Cannabis indica Resin. IV. The synthesis of some 2,2-dimetildibenzopirans and confirmation of the structure of cannabinoids.  
J. Chem. Soc. (London), 1400.
  - Carbonaro, G. e Imbasi, A. (1.948)  
Archiv. Farmacol. Sper. Sc. affini 77, 119.
  - COHEN, S. (1.976)  
The 94 day cannabis study.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 282, 211-220.
  - COHEN, S. y STILLMAN, R. (1.976)  
"The therapeutic potential of marihuana".  
Plenum Medical Book Company. New York. London.
  - COLLS, B.M. (1.980)  
Cannabis and cancer chemotherapy.  
Lancet 1, (8179), 1187-1188.
  - CORTIS, G.; LUCHI, P. y PALMAS, M. (1.985)

Culture expérimentale de plantes de cannabis dans la région méditerranéenne.

Bull. Stup. 37, (4), 69-77.

- COUPAR, I.M. y TAYLOR, D.A. (1.982)  
Alteration in the level of endogenous hypothalamic prostaglandine induced by  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in the rat.  
J. Pharmacol. 76, (1), 115-119.
- COZENS, D.; HARVEY, D.; HARDY, N. y NAHAS, G. (1.980).  
Fetotoxic effects of cannabis extracts in the New Zealand rabbit.  
Fed. Proc. 39, (3 II), 3072.
- CHAKRAVARTY, J.; SEGUPTA, D.; BHATTACHARYA, P. y GHOSH, J.J. (1.976)  
Effect of cannabis extract on the uterine monoamine oxidase activity of normal and estradiol treated rats.  
Biochem. Pharmacol. 25, (4), 377-378.
- CHAKRAVARTY, J. y GHOSH, J.J. (1.981)  
Influence of cannabis and  $\Delta^9$ -THC on the biochemistry of the male reproductive organs.  
Biochem. Pharmacol. 30, (4), 273-276.
- CHAKRAVARTY, J. (1.982)  
Enzymatic changes in the male reproductive organs by  $\Delta^9$ -THC.  
Biochem. Pharmacol. 31, (3), 415-418.
- CHAKRAVARTY, J. (1.983)  
Action of delta-9-tetrahydrocannabinol on the binding of estradiol to uterine and other tissues in rats.  
Biochem. Pharmacol. 32, (2), 253-256.
- CHAN, M.Y. y TSE, A. (1.978)  
The effect of cannabinoids ( $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^8$ -THC) on hepatic microsomal metabolism of testosterone in vitro.  
Biochem. Pharmacol. 27, (13), 1725-1728.
- CHARI-BITRON, A. (1.976)  
Effect of  $\Delta^1$ -THC on red blood cell membranes and on alveolar macrophages.  
En: "Marihuana Chemistry, Biochemistry and Cellular Effects".

- Ed. G.G. Nahas. Springer-Verlag, New York (1.976).
- CHEONGTON, J.M.N.; GERHARDT, G.A.; FRIEDMANN, M. y col. (1.988)  
The effects of  $\Delta^9$ -THC on potassium evoked release of dopamine in the rat caudate nucleus: an in vivo electrochemical and in vivo microdialysis study.  
Brain. Res. 451, (1-2), 59-68.
  - COHEN, S. y STILLMAN, R. (1.976)  
"The therapeutic potential of marihuana".  
Plenum Medical Book Company. New York. London.
  - CHOPRA, I.C. y CHOPRA, R.N. (1.957)  
The use of cannabis drugs in India.  
Bull. Narcot. 9, (1), 4-29.
  - CHRISTENSEN, H.D.; FREUDENTHAL, R.I.; GIDLEY, J.T.; ROSENFELD, R. y col. (1.971)  
Activity of  $\Delta^1$  and  $\Delta^9$ -THC and related compounds in the mouse.  
Science 172, 165-167.
  - DALTERIO, S.L.; BARTKE, A. y BURSTEIN, S. (1.977)  
Cannabinoids inhibit testosterone secretion by mouse testes in vitro.  
Science 196, (4297), 1472-1473.
  - DALTERIO, S.L.; BARTKE, A. (1.979)  
Perinatal exposure to cannabis alters male reproductive function in mice.  
Science 205, (4413), 1420-1422.
  - DALTERIO, S.L. (1.980)  
Perinatal or adult exposure to cannabinoids alters male reproductive functions in mice.  
Pharmacol. Biochem. Behav. 12, (1), 143-153.
  - DALTERIO, S.L.; BARTKE, A.; HARPER, M.J.K. y col. (1.981)  
Effects of cannabinoids and female exposure on the pituitary testicular axis in mice. Possible involvement of prostaglandins.  
Biol. Reprod. 24, (2), 315-322.
  - DALTERIO, S.L.; BARTKE, A. y MAYFIELD (1.982)  
 $\Delta^9$ -THC increases plasma testosterone concentrations in mice.

- Science 213, (4507), 581-583.
- DALTERIO, S.L.; BARTKE, A. y MAYFIELD, D. (1.983)  
Cannabinoids stimulate and inhibit testosterone production in vitro and vivo.  
Life. Sci. 32, (6), 605-612.
  - DALTERIO, S.L.; STAGER, R.; MAYFIELD, D. y BARTKE, A. (1984)  
Early cannabinoid exposure influences neuroendocrine and reproductive functions in male mice: I Prenatal exposure.  
Pharmacol. Biochem. Behav. 20, (1), 107-113.
  - DALTERIO, S.L.; MICHAEL, S.D. y THOMFORD, P.J. (1.986)  
Perinatal cannabinoid exposure: Demasculinization in male mice.  
Neurobehav. Toxicol. Teratol. 8, (4), 391-397.
  - Da Silva, B. (1.967)  
Rev. Fac. Farm. y Bioq. Univ. Sao Paulo 5, 205.
  - DAUL, C.B. y HEATH, R.G. (1.975)  
The effect of chronic marijuana usage on the immunological status of Rhesus monkeys.  
Life Sci. 17, (6), 875-881.
  - DAVIS, T.W.M.; FARMILLO, C.G. y OSADCHUK, M. (1.963)  
Identification and original determinations of cannabis by gas and paper chromatography.  
Anal. Chem. 35, 751-755.
  - DE LAURENTIS, M.J.; Mc NEIL, MANN, A.J., CLARK, S. y GREENWOOD, H.M. (1.982).  
Emit assay for cannabinoid metabolites in urine.  
En: "The Analysis of Cannabinoids in Biological Fluids R.L. Hawks.  
Ed. Nida Research. Monograph. 42, 69-84.
  - DEWEY, L.H. (1.914)  
Hemp.  
Ann. Dept. Agr. EE.UU., 283-346.
  - DOLBY, T.W. y KLEINSMITH, L.J. (1.974)  
Effects of  $\Delta^9$ -THC on the levels of AMPc in mouse brain.

- Biochem. Pharmacol. 23, (13), 1817-1825.
- DOLBY, T.W. y KLEINSMITH, L.J. (1.977)  
Cannabinoid effects on adenylatecyclase and phosphodiesterase activities in mouse brain.  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 55, 934-942.
  - EEC (1.987)  
Council Directive 87/18/EEC on the harmonization of the laws regulations and administrative provisions relating to the application of the Principles of Good Laboratory Practices and the verification of their application for test on chemical substances.  
OJEC 15, 17.1.1.87. Bressels.
  - ELSOHLY, M.A. y STANFORD, D.F. (1.985)  
Analysis of the major metabolite of  $\Delta^9$ -THC in urine VI. Specificity of the assay with respect to indole carboxylic acids.  
J. Anal. Toxicol. 9, (4), 190.
  - El-Souroy, M.; MALEK, A.Y.; FARAG, H.H. y EL-SHILBY (1.966)  
J. Egypt. Med. Ass. 49, 626.  
En: "Cannabinoid effects on liver glycogen stores".  
Life. Sci. 12, (2), 409-416.
  - EMBERGER, L. (1.960)  
"Traité de Botanique Systématique". II. Les végétaux vasculaires.  
Ed. Masson et Cie, 561-562.
  - EMBODEN, W.A. (1.972)  
Ritual use of C. sativa L.: a historical ethnographic survey.  
En: "Flesh of the Gods".  
Ed. Furst P.T. Praegen, New York 214-236.
  - ERANKO, O. y PALKAMA, A. (1.961).  
Improved localization of phosphorylase by the use of polyvinyl pyrrolidone and high substrate concentration.  
J. Histochem. Cytochem. 9, 585.
  - ERDOLU, C.; SAGLAM, R.; HARMAN KAYA, C. y col. (1.985)  
The effects of marihuana and tranquilizers on male sexual functions.

- Bull. Gulhane Mil. Med. Acad. 27 (1), 77-82.
- ESSMAN, E.J. (1.984)  
 Marijuana intoxication in rats: Interruption of recent memory and effect on brain concentration of  $\Delta^9$ -THC.  
 Psy. Chol. Rep. 55, (2), 563-567.
  - ESTEVEZ, V.S.; ENGLERT, L.F. y HO, B.T. (1.974).  
 Effect of SKF-525-A on the metabolism of (-) $\Delta^9$ -THC in the rat brain and liver.  
 Res. Comm. Chem. Path. Pharm. 8, (2), 389-392.
  - FARNSWORTH, N.R. (1.969)  
 Pharmacognosy and Chemistry of Cannabis sativa.  
 J. A. Pharm. Assoc. 29, 410-414.
  - FARRE, F.J. (1.866)  
 Manual of Materia Medica and Therapeutics.  
 Publ. H.C. Lea, Philadelphia.
  - FELBY, S. y NIELSEN, E. (1.985)  
 Teneur en cannabinoïdes du cannabis cultivé dans l'île danoise de Bornholm.  
 Bull. Stup. 37, (4), 91-99.
  - FENNESSY, M.R.; LEWIS, S.J.; TAYLOR, D.A. y VERBERNE, A.J.M. (1.983)  
 $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol reduces brain regional histamine concentrations.  
 J. Pharmacol. 78, (3), 452-454.
  - FIELD, E. y TYREY, L. (1.984)  
 Delayed sexual maturation in the female rat during chronic exposure to  $\Delta^9$ -THC.  
 Life Sci. 35, (17), 1725-1730.
  - FILIPOVIC, N. y TRKOVNID, M. (1.980)  
 Effect of single and repeated administration of  $\Delta^9$ -THC on 5-hydroxytryptamine, noradrenaline, dopamine and tryptophan levels in the brain of Wistar rats.  
 Arch. Hig. Rada Tokikol. 31, (4), 293-297.
  - FLEISCHER, S. y DERVINA, M. (1.974)

- Subcellular Fractionation of Rat Liver.  
 En: "Methods in Enzymology".  
 Ed. Academic Press. Colowick Kaplan. 31, 6-41.
- FOLTZ, R.L.; FENTIMAN, A.F. y TRUITT, E. (1.970)  
 Metabolite of (-)-trans- $\Delta^9$ -THC indentification and synthesis.  
 Science 168, 844-845.
  - FONSEKA, K. y WIDMAN, M. (1.977)  
 Dihydroxylated metabolites of cannabiniol formed by rat liver in vitro.  
 J. Pharm. Pharmacol. 29, (1), 12-14.
  - FONT QUER, P. (1.973)  
 "Plantas Medicinales (Dioscórides renovado)".  
 Ed. Labor S.A., 2ª Ed., 127-129.
  - FRIED, P.A.; INNES, K.S. y BARNES, M.V. (1.984)  
 Soft drug use prior to and during pregnancy: A comparison of samples  
 over a four-year period.  
 Drug. Alcohol. Depend. 13, (2), 161-176.
  - FRIEDMAN, M.A. (1.976)  
 Inhibition of arylhydrocarbonhydroxylase induction in BALB/C mouse  
 liver by  $\Delta^9$ -THC.  
 Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 15, (3), 541-552.
  - FRIEDMAN, M.A. y WRENN, J.M. (1.977)  
 Suppression by  $\Delta^9$ -THC of induction of hepatic aminotrasferase and  
 tryptophan oxigenase.  
 Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, (2), 345-352.
  - FURR, M. y MAHLBERG, P.G. (1.981)  
 Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in  
Cannabis sativa.  
 J. Nat. Prod. (Lloydia) 44, (2), 153-159.
  - GAINNEY, P.A. y PHELPS, C.F. (1.972)  
 Induction of UDPG dehidrogenase by phenobarbital in mouse.  
 Biochem. J. 128, 215-224.
  - GAONI, Y. y MECHOULAM, R. (1.966)  
 Tetrahedron 28, 1481.

En: "Marijuana Chemistry Pharmacology Metabolism and Clinical Effects".

Ed. R. Mechoulam Ac. Press (1.973).

- GHOSH, R.; TODD, A.R. y WILKINSONS, S. (1.940)  
Cannabis indica. The synthesis of Cannabinol.  
J. Chem. Soc. (Londres), 1933.
- GHOSH, J.J.; MITRA, G; PODDAR, M.K. y CHATERJEE, D.K. (1.977)  
Effect of  $\Delta^9$ -THC administration on hepatic functions.  
Biochem. Pharmacol. 26, (19), 1797-1801.
- GHOSH, P. y BHATTACHARYA, S.K. (1.980 a)  
Role of putative neurotransmitters in cannabis induced analgesia in rats.  
Indian J. Med. Res. 72, (3), 449-453.
- GHOSH, P. y BHATTACHARYA, S.K. (1.980 b)  
Cannabis-induced catalepsy in mice: role of putative neurotransmitters.  
Indian J. Med. Res. 72, (4), 605-609.
- GIBSON, G.T.; BAGHURST, P.A. y COLLEY, D.P. (1.983)  
Maternal alcohol, tobacco and cannabis consumption and the outcome of pregnancy.  
Aust. N. 2. J. Obstet. Gynaecol. 23, (1), 15-19.
- GILL, E.W.; PATON, W.D.M. y PERTWEE, R.G. (1.970)  
Preliminary experiments on the chemistry and pharmacology of cannabis.  
Nature 228, 134-136.
- GODLEWSKI, H.G. (1.963)  
Are active and inactive phosphorylases histochemical distinguishable.  
J. Histochem. Cytochem. 11, 108-112.
- GOLLA, G.; NEGRI, G.; CAPELLETI, C. (1.965)  
"Tratado de Botánica".  
Ed. Labor 2ª ed. Barcelona 898-901.
- GOLDSTEIN, H.; HARCLERODES, J. y NYQUIST, S.E. (1.977)

- Effects of chronic administration of  $\Delta^9$ -THC and CBD on rat testicular esterase isozymes.  
Life Sci. 20, (6), 951-954.
- GONG, H. Jr.; FLIGIEL, S.; TASHKIN, D.P. y BARBERS, R.G. (1.987)  
Tracheobronchial changes in habitual heavy smokers of marijuana with and without tobacco.  
Am. Rev. Respir. Dis. 136, (1), 142-149.
  - GREEN, K.; BIGGER, J.F.; KIM, K. y BOWMAN, K. (1.977 a)  
Cannabinoid action on the eye as mediated through the central nervous system and local adrenergic activity.  
Exp. Eye. Res. 24, (2), 189-196.
  - GREEN, K.; y BIGGER, J.F.; KIM, K. y BOWMAN, K. (1.977 b)  
Cannabinoid penetration and chronic effects in the eye.  
Exp. Eye. Rev. 24, (2), 197-205.
  - GREEN, K. y ROTH, H. (1.980)  
Marijuana in the medical management of glaucoma.  
Perspect. Ophthalmol. 4, (2), 101-105.
  - GREENLAND, S.; STAISCH, K.J.; BROWN, N. y GROSS, S.J. (1.982)  
Effects of marijuana on human pregnancy, labor, and delivery.  
Neurobehav. Toxicol. Teratol. 4, (4), 447-450.
  - GREENLAND, S.; RICHWALD, G.A. y HONDA, G.D. (1.983)  
The effects of marijuana use during pregnancy II. A study in a low-risk home delivery population.  
Drug. Alcohol. Depend. 11, (3-4), 359-366.
  - GRLIC, L.J. (1.962)  
A comparative study of some Chemical and Biological characteristics of various samples of Cannabis Resin.  
Bull. Narcotic, 14, (3), 37-46.
  - GRUNFELD, Y. y EDERY, H. (1.969)  
Activity of the active constituents of hashish and some related cannabinoids.  
Phychophenmacology 14, 200.
  - GUNBY, P. (1.981)

- Many cancer patients receiving THC as antiemetic.  
 J. Am. Med. Assoc. 245, (15), 1515-1518.
- GUNNAR, T.; JAN, D. y JENS, S. (1.976)  
 Changes in the Metabolism of  $\Delta^9$ -THC caused by other cannabis constituents.  
 En: "Marihuana Chemistry, Biochemistry and Cellular Effects".# Ed. G.G. Nahas. Springer-Verlag, 1976.
- HAAVIK, C.O. y HARDMAN, H.F. (1.900)  
 An investigation of the hypothermic action of  $\Delta^9$ -THC by use of pharmacological blocking agents.  
 Res. Common. Subst. Abuse 1, (4), 353-379.
- HAAVIK, C.O.; HARDMAN, H.F.; COLLINS, F.G. y SKIBBA, J. (1.900)  
 The effect of  $\Delta^9$ -THC on oxygen consumption, body temperature, and heart loss.  
 Res. Common. Subst. Abuse 1, (4), 381-405.
- HALIKAS, J.; WELLER, R. y MORSE, C. (1.982)  
 Effects of regular marijuana use on sexual performance.  
 J. Psychoact. Drugs. 14, (1-2), 59-70.
- HALLDIN, M.M.; CARLSSON, S. y KANTER, S.L. (1.982)  
 Urinary metabolites of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol in man.  
 Arzneim-Forsch 32, (7), 764-768.
- HANSON, V.W.; BUONARATI, M.H.; BASELT, R.C. y col. (1.983)  
 Comparison of  $^3\text{H}$  and  $^{125}\text{I}$ -RIA and CG/Mass Spectrometry for the determination of  $\Delta^9$ -THC and Cannabinoids in Blood and Serum.  
 J. Anal. Toxicol. 7, (2), 96.
- HARCLERODE, J. (1.984)  
 Endocrine effects of marijuana in the male: Preclinical studies.  
 Nida. Res. Monogr. Ser. No 44, 46-64.
- HARVEY, D.J. y PATON, W.D.M. (1.976)  
 Characterization of three monohydroxyacid and two dihydroxyacid metabolites of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol in mouse liver.  
 Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 13, (4), 585-599.
- HARVEY, D.J. y PATON, W.D.M. (1.980)

Identification of in vivo liver metabolites of  $\Delta^6$ -tetrahydrocannabinol produced by the mouse.

Drug. Metab. Disposition 8, (3), 178-186.

- HARVEY, D.J.; MARTIN, B.R. y PATON, W.D.M. (1.980 a)  
Identification of in vivo liver metabolites of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol, and cannabinol produce by the guinea-pig.  
J. Pharm. Pharmacol. 32, (4), 267-271.
- HARVEY, D.J.; LEUSCHNER, J.T.A. y PATON, W.D.M. (1.980 b)  
Influence of 6- $\beta$ -hydroxylation on the metabolism of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol: Switching of the major site of biotransformation from C-7 to the sidechain.  
Res. Common. Subst Abuse 1, (2), 159-167.
- HARVEY, D.J.; GILL, E.W. Slater, M. y PATON, W.D.M. (1.980 c)  
Identification of the in vivo liver metabolites of (-)  $\Delta^7$ -tetrahydrocannabinol produced by the mouse.  
Drug Metab Disposition 8 (6), 439-445.
- HARVEY, D.J. (1.984)  
Marihuana'84. Abstracts, Third Satellite Symposium on Cannabis.  
Oxford, Oxford University, Dep. Pharmacology.
- HATCH, E.E. y BRACKEN, M.B. (1.987)  
Effect of marijuana use in pregnancy on fetal growth.  
Am. J. Epidemiol. 124, (6), 986-993.
- HAZAN, S.; BEAMIER, P.; Mc BURNEY, L. y BOBBIE, B. (1.980)  
THC metabolites in urine.  
Proceedings of the Joint Meeting of Canadian Society of Forensic Science and the Society of Forensic Toxicologists. Toronto.
- HEMPHILL, J.K., TURNER, J.C. y MAHLBERG, P.G. (1.980)  
Cannabinoid content of individual plant organs from different geographical strains of Cannabis sativa L.  
J. Nat. Prod. (Lloydia) 43, (1), 112-122.
- HENRY, J. y CASSIDY, S. (1.986)  
Membrane stabilising activity.

- The Lancet 21, 1416-1317.
- Heyndrickx, A.; Scheiris, C.H. y Schepens, P. (1.969)  
J. Pharm. Bel. 7, (37)
  - HILLAR, C.J. y BLOOM, A.S. (1.983)  
Possible role of prostaglandins in the effects of the cannabinoids on  
adenylatecyclase activity.  
J. Pharmacol. 91, (1), 21-27.
  - HINGSON, R.; ALPERT, J.J.; DAYN y col. (1.982)  
Effects of maternal drinking and marihuana use on fetal growth and  
development.  
Pediatrics 70, (4), 539-546.
  - HO, B.T.; FRITCHIE, E.G.; DRALIK, P.H.; ENGLERT, L.F.; ISAAC, W.M. y  
INDANPAAN-HEIKKILA, J. (1.970)  
Distribution of H<sup>3</sup>-Δ<sup>9</sup>-THC in rat tissues after inhalation.  
J. Pharm. Pharmacol. 22, (7), 538-539
  - HO, B.T.; FRITCHIE, G.E.; ENGLERT, L.F.; Mc ISAAC, W.M. y INDANPAAN-  
HEIKKILA, J.E. (1.971)  
Marihuana: importance of the route of administration.  
J. Pharm. Pharmacol. 23, (4), 309-310.
  - HOLLISTER, L.E.; RICHAROS, R.K. y GILLESPIE, B.A. (1.968)  
Comparison of THC and synhexil in man.  
Clin. Pharmacol. Ther. 9, 783-791.
  - HOLLISTER, L.E. (1.970)  
Tetrahydrocannabinol isomers.  
Nature 227, 968.
  - HOLLISTER, L.E. (1.988)  
Cannabis 1988  
Acta Psychiatr. Scand 78 (suppl. 45), 108-118.
  - HUGHES, J.,E. (1.970)  
Marihuana and the diabetic coma.  
J. Amer. Med. Assoc. 214, 1113-1114.
  - HUGHES, C.L.; EVERETT, J.W. y TYREY (1.981)

- $\Delta^9$ -THC suppression of prolactin secretion in the rat: lack of direct pituitary effect.  
Endocrinology 109, (3), 876-880.
- HUGHES, C.L. Jr. y TYREY, L. (1.982)  
Effects of (-)-trans- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on serum prolactin in the pseudopregnant rat.  
Endocr. Res. Commun. 9, (1), 25-36.
- HUOT, J. (1.976)  
Cellular and biochemical alterations induced in vitro by  $\Delta^1$ -THC: Effects on cell proliferation, nucleic acids, plasma cell membranes ATP-ase and adenylate-cyclase.  
En: "Marihuana: Chemistry, Biochemistry and Cellular Effects".  
Ed. G.G. Nahas Springer Verlag 313.
- HUSAIN, S. y KHAN, I. (1.985)  
Etat actuel des recherches sur le Cannabis.  
Bull. Narcotics. 37, (4), 3-14.
- ISBELL, H.; GORODETSKY, C.W.; JASINSKY, D.; CLAUSSEN, U. von; SPULAK, F. y KORTE, F. (1.967).  
Effects of (-) $\Delta^9$ -trans-THC in man.  
Psychopharmacologia 14, 115-123.
- JACOB, A. y TODD, A.R. (1.940)  
Cannabidiol and cannabinol, constituent of Cannabis indica Resin.  
Nature 145, 350.
- JAKUBOVIC, A. y Mc GEER, P.L. (1.972)  
Inhibition of rat brain proteins by cannabinoids in vitro.  
Can. J. Biochem. 50, 654-662.
- JAKUBOVIC, A. y Mc GEER, P.L. (1.974)  
Intracellular distribution of  $H^3$   $\Delta^9$ -THC in rat organs after i.v. administration.  
Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 9, (1), 197-200.
- JAKUBOVIC, A. y Mc GEER, P.L. (1.976)  
In vitro inhibition of protein and nucleic acid synthesis in rat testicular tissue by cannabis.

En: "Marihuana: Chemistry, Biochemistry and Cellular Effects".  
Ed. G.G. Nahas y col. Springer Verlag, New Yor.

- JANISCHEVSKY, D.E. (1.924).  
Forma Konopli na sornykh mestakyngo-vostochnoi Rossii.  
Uchenye zapiski 2, (2), 3-17.
- JAMES, M. y FUJIMOTO, J.M. (1.973)  
Certain aspects of metabolism of  $\Delta^9$ -THC.  
Essays in Toxicology 4, 47-49.
- JOHNSON, K.M.; DEWEY, W.L. y BLOOM, A.S. (1.981)  
Adrenalectomy reverses the effects of  $\Delta^9$ -THC on mouse brain 5-HT turnover.  
Pharmacology 23, (4), 223-229.
- JONES, A.B. (1.985)  
A discussion of unusually high cannabinoid concentrations in urine.  
J. Anal. Toxicol. 9, (4), 188.
- JOYCE, C.R.B. y CURRY, S.H. (1.970)  
The botany and chemistry of Cannabis.  
Ed. Joyce and Churchill, London.
- KANTER, S.L.; HOLLISTER, L.E.; MOORE, F. y GREENE, D. (1.972)  
Cannabinoids in the urine of man after single and subchronic oral doses of marihuana.  
Int. Pharmacol. Psychiat. (Basel) 7, (1-4), 205-213.
- KANTER, S.L.; HOLLISTER, L.E.; MOORE, F. y GREENE, D.E. (1.974)  
Marihuana metabolites in the urine of man II. Undescribed metabolites following oral ingestion of  $\Delta^9$ -THC.  
Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 7, (1), 79-84.
- 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  $\Delta^9$ -THC.  
Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 10, (2), 215.
- KANTER, S.L. y HOLLISTER, L.E. (1.977)

Marihuana metabolites in urine of man VII. Excretion patterns of acidic metabolites detected by sequential thin layer chromatography.

Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 17, (3), 421-431.

- KAWAKAMI, Y.; KLEIN, T.W.; NEWTON, C. y col. (1.988)  
Suppression by cannabinoids of a cloned cell line with natural killer cell activity.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 187, (3), 355-359.
- KAWASAKI, H.; WATANABE, S. y VEKI, S. (1.980)  
Effect of chronic administration of  $\Delta^9$ -THC on the cardiovascular system, and pressor and behavioral responses to brain stimulation in freely moving cats.  
Env. J. Pharmacol. 65, (1), 63-69.
- KELLEY, J.A. y ARNOLD, K.P. (1.976)  
Detection of urinary Cannabis metabolites: a preliminary investigation.  
J. For. Sci. 21, (2), 252.
- KEPHALAS, T.A.; MICHAEL, C.M.; PAPADAKIS, D.P.; LIVANOUS, T.H. y MIRAS, C.J. (1.973)  
Effect de la resine de cannabis sur le rat diabetique.  
Recherches Scientifiques sur le Cannabis ST/SOA/SERS/42, junio 1.973.
- KLANSNER, H.A; WILCOX, H.G. y DINGELL, J.V. (1975)  
The use of zonal ultracentrifugation in the investigation of the binding of  $\Delta^9$ -THC by plasma lipoproteins.  
Drug Metab. Disposition 3, (4), 314-319.
- Klein, F.K.; Rapoport, H. y Elliot, H.W. (1971)  
Nature, London, 232, 258.  
En: "Marihuana: Chemistry, Biochemistry and cellular Effects".  
Ed. G.G. Nahas Spinger Verlag, New York.
- KLEIN, T.W.; NEWTON, C. y FRIEDMAN, H. (1.987)  
Inhibition of natural killer cell function by marijuana components.  
J. Toxicol. Environ. HEALTH. 20, (4), 321-332.
- KORNBERG, A. y HORECKER, B.L. (1.955)  
Glucose-6-phosphate dehydrogenase.

- En: "Methods in Enzymology".  
Colowick Kaplan 1, 323-325. Academic Press.
- KOSTELLOW, A.B.; ZIEGLER, D.; KUMAR, J. y col. (1.980)  
Effect of cannabinoids on estrous cycle ovulation and reproductive capacity of female A/J mice.  
Pharmacology 21, (1), 68-75.
  - KORTE, F.; DLUGOSCH, E. y CLAUSSEN, U. (1.966)  
Synthese von D1 Cannabidiol und seinen Methyl-homologen.  
Liebigs Ann. Chem. 693, 165.
  - KRANER, J. y BEN-DAVID, M. (1.978)  
Prolactin suppression by (-) $\Delta^9$ -THC involvement of serotonergic and dopaminergic pathways.  
Endocrinology 103, (2), 452-457.
  - KUMAR, M.S.A. y CHEN, C.L. (1.983)  
Effect of an acute dose of  $\Delta^9$ -THC on hypothalamic luteinizing hormone releasing factor , and met-enkephalin content and serum levels of testosterone and corticosterone in rats.  
Subst. Alcohol Actions Misure. 4, (1), 37-43.
  - KUMAR, M.S.A.; PATEL, V.; KREAM, R. y col. (1.985)  
Effect of early exposure to  $\Delta^9$ -THC on post-pubertad reproductive functions.  
Feed. Proc. 44, (5), NO 6204.
  - KUPFER, D.; LEVIN, E. y BURSTEIN, S.H. (1.973)  
Studies on the effects of  $\Delta^1$ -THC and DDT on the hepatic microsomal metabolism of  $\Delta^1$ -THC and other compounds in the rat.  
Chem. Biol. Interect. 6, 59.
  - KUSHIMA, H.; SHOYAMA, Y. y NISHIOKA, I. (1.980)  
Cannabis XII. Variations of cannabinoid contents in several strains of Cannabis sativa L. with life-age, season and sex.  
Chem. Pharm. Bull. 28 (2), 594-598.
  - LAMBERKOVICS, E.; VESZKI, P.; VERZAR-PETRI, G. y TRKA, A. (1.979)  
Contributions to the essential oil composition of the flowers and leaves of Cannabis sativa L.

- Biochim. Biophys. Acta 569, (1), 271-272.
- LAMBERKOVICS, E.; VESZKI, P.; VERZAR-PETRI, G. y TRKA, A. (1.981)  
Studies on sesquiterpenes of the essential oil in the inflorescence and leaves of Cannabis sativa-vas. Mexico.  
Sci. Pharm. 49, (4), 401-408.
  - LAURENT, B.; ROY, P.E. y GAILIS, L. (1.974)  
Inhibition by  $\Delta^1$ -THC of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  transport ATP-ase from rat ileum.  
Canad. Physiol. 52, (6), 1110-1113.
  - LAURENT, B. y ROY, P.E. (1.975)  
Alteration of membrane integrity by  $\Delta^1$ -THC.  
Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. 12, (12), 262-266.
  - LAWRENCE, D.K. y GILL, E.W. (1.975)  
The effects of  $\Delta^1$ -THC and other cannabinoids on spin labeled liposomes and their relationship to mechanisms of general anesthesia.  
Molec. Pharmacol. (nº 4) 11, (5), 595-602.
  - LAYMAN, J.M. y MILTON, A.S. (1.971)  
Distribution of  $^3\text{H}$ - $\Delta^1$ -THC in the rat brain following intraperitoneal administration.  
Brit. J. Pharmacol. 42, (2), 308-310.
  - LEE, G.M. y OLMSTED, C.A. (1.976)  
Effects of cannabinoids on synaptic membrane enzymes II. In vivo studies of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  ATP-ase in synaptic membranes isolated from rat brain.  
Amer. Drug. Alcohol Abuse 3, (4), 629-633.
  - LEBROWITZ, S.S. y KLAGER, K. (1.978)  
Effect of  $\Delta^9$ -THC on in vitro sensitization of mouse splenic lymphocytes.  
Immunol. Commun. 7, (5), 557-566.
  - LEIGHTY, E.G. (1.973)  
Metabolism and distribution of cannabinoids in rats after different methods of administration.  
Biochem. Pharmacol. 22, (13), 1613-1621.
  - LEIGHTY, E.G.; FENTIMAN, A.F. Jr. y FOLTZ, R.L. (1.976)

- Long retained metabolites of  $\Delta^9$  and  $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinols identified as novel fatty acid conjugates.  
Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol. 14, (1), 13-28.
- LEIGHTY, E.G. (1.979)  
An in vitro rat liver microsomal system for conjugating fatty acids to 11-OH  $\Delta^8$ -THC.  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 23, (3), 483-492.
- LEIGHTY, E.G. (1.980)  
In vitro rat liver microsomal conjugation of several cannabinoids to fatty acids.  
Res. Commun. Subst. Abuse 1, (2), 169-175.
- LEMBERGER, L.; SILBERSTEIN, St. D.; AXELROD, J. y KOPIN, I.J. (1.970)  
Marihuana: Studies on the disposition and metabolism of  $\Delta^9$ -THC in man.  
Science 170, (3964), 1320-1322.
- LEMBERGER, L.; TAMARKIN, M.R.; AXELROD, J. y KOPIN, I.J. (1.971)  
 $\Delta^9$ -THC Metabolism and disposition in long-term marihuana smokers.  
Science 173, (3991), 72-74.
- LERNER, M. y ZEFFERT, J.T. (1.968)  
Determination of THC isomers in marihuana and Hashish.  
Bull. Stup. 20, (2), 53-54.
- LEUCHTEMBERGER, C. y LEUCHTEMBERGER, R. (1.972)  
Les anomalies de la mitose du metabolisme de l'ADN et de la croissance dans les cultures de cellules pulmonaires humaines exposées à la fumée de cigarettes de marijuana et leur analogie avec les alterations provoquées par la fumée de cigarettes de marijuana, et leur analogie avec les alterations provoquées par la fumée de cigarette de tabac.  
Nations Unies n° 37.
- LEUCHTEMBERGER, C. y LEUCHTEMBERGER, R. (1.973)  
Effects of marihuane and tobacco smoke on human lung physiology.  
Nature 241, 137-139.
- LEVY, S.; YAGEN, B. y MECHOULAM, R. (1.978)

- Identification of a C-glucuronide of  $\Delta^6$ -THC as a mouse liver conjugate in vivo.  
 Science 200, (4348), 1391-1392.
- LEVY, J.A. y HEPPNER, G.H. (1.980)  
 Immunosuppression by marihuana and its cannabinoid constituents.  
 J. Immunopharmacol. 2, (2), 159-171.
  - LEVY, J.A. y HEPPNER, G.H. (1.981)  
 Alterations of immuno reactivity by Haloperidol and delta-9-THC.  
 J. Immunopharmacol. 3, (1), 93-109.
  - LINDAMOOD III, C. y COLASANTI, B.K. (1.980)  
 Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on high affinity choline uptake in rat hippocampus.  
 Fed. Proc. 39, (3), II, 3068.
  - LINDAMOOD III, C. y COLASANTI, B.K. (1.981)  
 Interaction between impulse-flow and  $\Delta^9$ -THC within the septal hippocampal cholinergic pathway of rat brain.  
 J. Pharmacol. Exp. Ther. 219, (2), 580-584.
  - LINDEMANN, E. (1.933)  
 The neurophysiological effects on intoxicating drugs.  
 Amer. J. Psychiat. 90, 1007-1037.
  - LING, K.H.; PEATKAU, V.; MARCUS, F. y LARDI, H.A. (1.966)  
 Phosphofructokinase  
 En: "Methods in Enzymology IX.  
 Colowick-Kaplan vol. 9, 425-426. Academic Press.
  - LIST, A.; NAZAR, B.; NYSQUIST, S. y HARCLERODE, J. (1.977)  
 The effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol and cannabidiol on the metabolism of gonadal steroids in the rat.  
 Drug Metab. Disposition 5, (3), 268-272.
  - LOSCALZO, B.; AGRUSTA, A.; AGRUSTA, M. y col. (1.984)  
 Stress, drugs, and pregnancy: Experimental studies on embryo-foetal toxicity.  
 Arch. Toxicol. 55 (suppl.) 499.
  - LUCAS, V.S. y LASZLO, J. (1.980)

$\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol para vómitos refractarios producidos por la quimioterapia anticancerosa.

Jama 243, 1241-1243.

- LUCHI, P.; BUCARELLI, A.; CORTIS, G. y PINTOR, L. (1.979)  
On the results of experimental planting of Cannabis sativa carried out in southern Sardinia.  
Rass. Med. Sarda 31, (2), 188-192.
- LUTHRA, Y.K. y ROSENKRANTZ, H. (1.974)  
Cannabinoids: neurochemical aspects after oral chronic administration to rats.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 27, (1), 158-168.
- LUTHRA, Y.K.; ROSENKRANTZ, H.; HEYMAN, I.A. y BRAUDE, M.C. (1.975)  
Differential neurochemistry and temporal pattern in rats treated orally with  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol for periods up to six months.  
Toxicology and Applied Pharmacology 32, 418-431.
- LUTHRA, Y.K.; ROSENKRANTZ, H. y BRAUDE, M.C. (1.976)  
Cerebral and cerebellar neurochemical changes and behavioral manifestations in rats chronically exposed to marijuana smoke.  
Toxicology and Applied Pharmacology 35, 455-465.
- LUTHRA, Y.K.; ESBER, H.J.; LARIVIEDE, D.M. y ROSENDRANTZ, H. (1.980)  
Assessment of tolerance to immunosuppressive activity of  $\Delta^9$ -THC in rats.  
J. Immunopharmacol. 2, (2), 245-256.
- LYLE, M.A.; PALLANTE, S.; HEAD, K. y FENSELEAU, C. (1.977)  
Synthesis and characterization of glucuronides of cannabinol, cannabidiol,  $\Delta^9$ -THC and  $\Delta^8$ -THC.  
Biochem. Mass. Sptr. 1, (3), 190-196.
- Mc BAY, A.J. (1.977)  
Marihuana: Current Assessment.  
J. For. Sci. 22 (3), 493.
- MACCAGNO, A. (1.975)  
La Marihuana.  
Colección "Toxicomanías" C.E.N.I.A. Tox. 2, 7-8.

- Mc LEAN, D.K. y ZIMMERMAN, A.M. (1.976)  
Action of  $\Delta^9$ -THC on cell division and macromolecular synthesis in division synchronized protozoa.  
Pharmacology 14, (4), 307-321.
- Mc LEAN, D.K. y LITTLETON, I.M. (1.977)  
Environmental stress as a factor in the response of rat brain catecholamins metabolism to  $\Delta^9$ -THC.  
Eur. J. Pharmacol. 41, (22), 171-182.
- MACHULA, A.J. y BARKOV, N.K. (1.983)  
Monoaminergic component in the effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on the conditioned reflexes (Russ).  
Farmakol. Toksikol. 46, (4), 23-27.
- Major's Committee in Marihuana (1.944)  
Report on the Marihuana problem in the City of New York.  
Lancaster, Pa. Tacques Cattell, 220.
- MANNO, J.E.; KIPLINGER, G.E.; HAINE, S.E.; BENNETT, I.F. y FORNEY, R.B. (1.970)  
Comparative effects of smoking marihuana or placebo on human motor and mental performance.  
Clin. Pharmacol. Ther. 11, (6), 808-815.
- MARCOTTE, J.; SKELTON, F.S.; COTE, M.G. y WITSCHI, H. (1.975)  
Induction of aryl rat lung by marijuana smoke.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 33, (2), 231-245.
- MARKIANOS, M. y STEFANIS, C. (1.982)  
Effects of acute cannabis use and short-term deprivation on plasma prolactin and dopamine- $\beta$ -hydroxylase in long-term users.  
Drug. Alcohol. Dependend. 9, (3), 251-255.
- MARKIANOS, M. y YAKIS, A. (1.985)  
Effects of acute cannabis use on urinary neuro-transmitter metabolites and cyclic nucleotides in man.  
Drug Alcohol Depend. 14, (2) 175-178.
- Martin, L.; Smith, D.M. y Farmilo, C.G. (1.961)  
Nature, London 191, 774.

- En: "Marijuana Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects".
- MARTIN, B.; AGURELL, S.; NORDQVIST, M. y LINDGREN, J.E. (1.976)  
Dioxigenated metabolites of cannabidiol formed by rat liver.  
J. Pharm. Pharmacol. 28, (8), 603-608.
  - MARTIN, B.R.; HARVEY, D.J. y PATON, W.D.M. (1.977)  
Biotransformation of cannabidiol in mice. Identification of new acid metabolites.  
Drug. Metab. Disposition 5, (3), 259-267.
  - MARTIN, B.R. (1.986)  
Cellular effects of cannabinoids.  
Pharmacol. Rev. 38, (1), 45-74.
  - MARTIN, B.R. (1.985)  
Structural requirements for cannabinoid induced anticonceptive activity in mice.  
Life Sci. 36, (16), 1523-1530.
  - MASON, A.P.; PEREZ-REYES, M.; Mc BAY, A.J. y FOLTZ, R.L. (1.983)  
Cannabinoids concentrations in plasma after passive inhalation of marijuana smoke.  
J. Anal. Toxicol. 7, (4), 172-177.
  - MECHOULAM, R. y SHVO, Y. (1.963)  
Hashish I. Structure of cannabidiol.  
Tetrahedron 19, 2073.
  - MECHULAM, R. y GAONI, Y. (1.965)  
A total synthesis of 1-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish.  
J. Am. Chem. Soc. 87, 3273.
  - MECHOULAM, R. y GAONI, Y. (1.967)  
Recent Advances in the chemistry of hashish.  
En: "Progress in the chemistry of organic Natural Products".  
Springer- Verlag, New York, 25.
  - MECHOULAM, R. (1.970)  
Marihuana Chemistry.

- Science 168, 1159-1166.
- MECHOULAM, R. (1.973)  
"Marijuana Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical Effects".  
Academic Press, New-York and London.
  - MECHOULAM, R. (1.976)  
Le Cannabis.  
La Recherche Z, (73), 1018-1026.
  - MECHOULAM, R.; LANDER, N.; VARKONY, T.M. y col. (1.980)  
Stereochemical requirements for cannabinoid activity.  
J. Med. Chem. 23, (10), 1068-1072.
  - MECHOULAM, R.; FEIGENBAUM, J.J.; LANDER, N. y col. (1.988)  
Enantiomeric cannabinoids: stereospecificity of psychotropic  
activity.  
Experientia 44, (9), 762-764.
  - MENDELSON, J.H. y MELLO, N.K. (1.984)  
Effects of marijuana on neuroendocrine hormones in human males and  
females.  
Nida Res. Monogr. Ser. N.O. 44, 97-114.
  - MENDELSON, J.H.; ELLIMBOE, J. y MELLO, N.K. (1.984)  
Acute effects of natural and synthetic cannabis compounds on prolactin  
levels in human males.  
Pharmacol. Biochem. Behav. 20, (1), 103-106.
  - MENDELSON, J.H.; MELLO, N.K. y ELLIMBOE, J. (1.985)  
Acute effects of marijuana smoking on prolactin levels in human  
females.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 232, (1), 220-222.
  - MERKUS, F.W.H.M. (1.971 a)  
Cannabivarin and Tetahydrocannabivarin, Two New Constituents of  
Hashish.  
Nature 232, 576-580.
  - MERKUS, F.W.H.M. (1.971 b)  
Cannabivarin in new Bestanddeel van Hashish.

- Phar. Weekblad, 106, 69-71.
- MIRAS, C.K.; KYRKOU, K.A. y MARKIDOU, S.G. (1.978)  
Anomalies chromosomiques chez les gros fumeurs des haschisch.  
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  $\Delta^9$ -THC on rat liver microsomes drug  
metabolizing enzymes.  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 35, (3), 523-530.
  - MOREAU DE TOURS, J. (1.845)  
"Du haschich et de l'aliénation mentale, études psychologiques"  
Paris, Masson.
  - MORISHIMA, A.; HENRICH, R.T.; SENJOV y NAHAS, J.J. (1.976)  
Effects of marihuana smoking, cannabinoids and olivetol on replication  
of human lymphocytes: formation of micronuclei.  
Pharmacology of Marihuana (M.C. Braude and S. Szara). New-York. Raven.  
Press.
  - MORRILL, G.A.; KOSTELLON, A.B.; ZIEGLER, D.H. y FUJIMOTO, G.I. (1.983)  
Effects of Cannabinoids on function of testis and secondary sex organs  
in the Fischer rat.  
Pharmacology 26, (1), 20-28.
  - NAHAS, G. (1.973)  
Toxicology and Pharmacology.  
Ob. cit. en Marijuana - deceptive weed, Raven, New-York, 104-149.
  - NAHAS, G. y DESOIZE, D. (1.974)  
Effet inhibiteur du 5-n-aril-resorcinol sur la transformation  
lymphoblastique.  
C.R. Acad. Sci. Resis. 279, 1607-1608.
  - NAHAS, G.G.; DESOIZE, B.; HSU, J. y MORISHIMA, A. (1.976)  
Inhibitory effects of  $\Delta^9$ -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, 299.

- NAHAS, G.G. (1.978)  
Symposium sur la Marihuana.  
Bull. Stup. 30, (3), 23-32.
- NAKAMURA, G.R. (1.969)  
Forensic Aspects of Cystolic hairs of Cannabis and other plants.  
J. Assoc. Anal. Chem. 52, (1), 5-16.
- NEUMEYER, J.L. y SHAGORY, R.A. (1.971)  
Chemistry and Pharmacology of Marijuana.  
Journal of Pharmaceutical Sciences, 60, (10), 1443-1457.
- NIDA, R. y COHEN, S. (1.980)  
Therapeutic Aspects.  
Usah Hum. 199-221.
- Nigam, M.C.; Handa, K.L.; Nigam, I.C. y Levi, L. (1.965)  
Can. J. Chem. 43, 3372.
- NILSSON, I.M.; AGURELL, S.; NILSSON, J.L.G.; OHLSSON, A.; SANDBERG, F.  
y WALQUIST, M. (1.970)  
 $\Delta^1$ THC: Structure of a major metabolite.  
Science 168, 1228-1229.
- NOIRFALISE, A. (1.968)  
Toxicological detection of allucinogens.  
J. Pharm. Belg. 23, 387-399.
- NORDQVIST, M.; AGURELL, S. y RYDBERG, M. (1.979 a)  
More acidic metabolites of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol isolated from  
rabbit urine.  
J. Pharm. Pharmacol. 31, (4), 238-243.
- NORDQVIST, M.; LINDGREN, J.E. y AGURELL, S. (1.979 b)  
Acidic metabolites of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol isolated from rabbit  
urine.  
J. Pharm. Pharmacol. 31, (4), 231-237.
- O'CONNELL, M.E.; MORRILL, G.A.; FUJIMOTO, G.I. y KOSTELLOW, A.B.  
(1.987)  
Factors affecting the response of the female rat reproductive system  
to cannabinoids.

- Toxicol. Appl. Pharmacol. 88, (3), 411-417.
- OECD (1.981)  
Decision of the Council Concerning to the Mutual Acceptance of Data  
in the Assessment of Chemicals.  
C, 81, 30 (final).
  - OKEY, A.B. y TRUANT, G.S. (1.975)  
Cannabis demasculinizes rats but is not estrogenic.  
Life Sci. 17, (7), 1113-1118.
  - OKUDA, K.; WATANABE, K.; TADA, K.; YAMADA, S. y YAMAO, Y. (1.978)  
A simplified and rapid screening test for blood ammonia.  
Japan J. Clin. Chem. 7, (2), 188-191.
  - OLMSTED, C.A. (1.976)  
Effects of cannabinoids on synaptic membrane enzymes. I. In vitro  
studies on synaptic membrane isolated from rat brain.  
Amer. J. Drug. Alcohol. Abuse. 3, (3), 485-505.
  - PACE, H.B.; DAVIS, M. y BORGEM, L.A. (1.971)  
Teratogenesis and marihuana.  
Ann. N. Acad. Sci. 191, 123.
  - PASQUALE, A.; COSTA, G. y TROVATO, A. (1.978)  
Influence du cannabis sur la glucoregulation.  
Bull. Stup. 30, (3), 33-41.
  - PATEL, V.; BORYSENKO, M. y KUMAR, M.S.A. (1.985)  
Effect of  $\Delta^9$ -THC on brain and plasma catecholamine levels as measured  
by HPLC.  
Brain Res. Bull. 14, (1), 85-90.
  - Paton, W.D.M. y Pertwee, R.G. (1.973)  
En: "Marihuana Chemistry, Pharmacology, Metabolism and Clinical  
Effects".  
Ed. Mechoulam, Academic Press, New-York.
  - PATON, W.D.M. (1.975)  
Pharmacology of Marijuana.  
Ann. Res. Pharm. 15, 191-220.

- PERSAND, T.V.N. y ELLINGTON, A.C. (1.967)  
Cannabis in early pregnancy.  
Lancet II, 1.306.
- PETRZILKA, T. y SIKEMEIER, C. (1.967)  
Components of hashish II. Synthesis of (-) 3-delta<sup>6</sup>,1 3-4 trans THC  
and (+) delta-9,1 3-4 trans THC.  
Helvetica. Chim. Acta 50, 1416-1419.
- PHILLIPS, R.M.; TURK, .E. y FORNEY, R.B. (1.971)  
Acute toxicity of  $\Delta^9$ -THC in rats and mice.  
Exp. Biol. Med. 136, (1), 260-263.
- PODDAR, M.K. y GHOSH, J.J. (1.972 a)  
Effects of cannabis extract,  $\Delta^9$ -THC and lysergic acid on rat liver  
enzymes.  
Biochem. Pharmacol. 21, (24), 3301-3303.
- PODDAR, M.K. y GHOSH, J.J. (1.972 b)  
Extrait de cannabis et  $\Delta^9$ -THC. Effets de leur administration sur les  
enzymes du foie.  
Recherches Scientifiques sur le cannabis. Naciones Unidas, 32.
- PODDAR, M.K. y GHOSH, J.J. (1.973)  
Cannabidiol: effet sur l'activité enzymatique du foie induite par le  
 $\Delta^9$ -THC.  
Recherches Scientifiques sur le cannabis. Naciones Unidas, 43.
- PODDAR, M.K. y DEWEY, W.L. (1.980)  
Effects of cannabinoids on catecholamine uptake and release in  
hypothalamic and striatal synaptosomes.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 214, (1), 63-67.
- PUDDER, M.; WEINDENFELD, J.; CHOWERS, I. y col. (1.982)  
Corticotrophin and corticosterone secretion following  $\Delta^1$ -  
tetrahydrocannabinol, in intact and in hypothalamic deafferented  
male rats.  
Exp. Brain Res. 46, (1), 85-88.
- QAZI, Q.H.; MARIANO, E.; MILMAN, D.H. y col. (1.985)

Abnormalities in offspring associated with prenatal marihuana exposure.

Dev. Pharmacol. Ther. 8, (2), 141-148.

- QUIMBY, M.W. (1.974)

Botany of Cannabis sativa.

Arch. Invert. Med. 5, (1), 127-134.

- RATNAIKE, R.N.; BUTTERY, J.E. y HOFFMANN, S. (1.984)

Blood ammonia measurement using a simple Reflectometer.

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 105-108.

- RAWUITCH, A.B.; ROHRER, R. y VARDARIS, R.M. (1.979)

Delta-9-tetrahydrocannabinol uptake by adipose tissue: Preferential accumulation in gonadal fat organs.

Pharmacol. 10, (6), 525-529.

- RENAUT, P.F.; SCHUSTER, CH.R.; HEINRICH, R. y FREEMAN, D.X. (1.972)

Marihuana standardized smoke administration and dose-effect curves on heart rate in humans.

Science 174, (4009), 589-591.

- REPETTO, M. y MENENDEZ, M. (1.972)

Contribución al estudio de la toxicomanía por Cannabis.

Rev. San. Hig. Pub. 46, 155-167.

- REPETTO, M. (1.974)

Interés de los metabolitos del cannabis.

II Jornadas Toxicológicas Españolas. Monografías LIADES, 37-40.

- Repetto, M. y Martinez, D. (1.975)

Comunicación personal.

- REPETTO, M.; SANZ, P. y PASTOR, T. (1.979)

Estudio experimental sobre la influencia del cannabis sobre cinco parámetros bioquímicos.

III Jornadas Toxicológicas Españolas. Monografías LIADES, 337-341.

- REPETTO, M., SANZ, P. y RODRIGUEZ-VICENTE, C. (1.981 a)

Effects of Cannabis on transport mechanism through liver cell membranes.

- En: Organ-Directed Toxicity. Ed. S.S. Brown IUPAC. Pergamon Press. New-York.
- REPETTO, M.; SANZ, P. y RODRIGUEZ-VICENTE, C. (1.981 b)  
Increase of glucose metabolism by Cannabis.  
En: Organ-Directed Toxicity. Ed. S.S. Brown IUPAC. Pergamon Press. New-York.
  - REPETTO, M.; CARRASCO, I.; DOMINGUEZ, C. y col. (1.985)  
"Toxicología de la drogadicción".  
Ed. Diaz de Santos S.A. Madrid y Barcelona.
  - REPETTO, M. y SANZ, P. (1.985)  
Crono y Cosmotoxicología.  
Sandorama II, 5-11.
  - REVUELTA, A.V. y CHENEY, D.L. (1.981)  
Simultaneous reduction in the turnover rates of septal GABA and Hippocampal acetylcholine following administration of nabilone.  
Neuropharmacology 20, (11), 1111-1114).
  - Robinson, A. (1.971)  
Bull. Stup. 23, (3), 41.
  - RODRIGUEZ-VICENTE, M.C. (1.981)  
Estudio experimental de la influencia del Cannabis sobre el transporte a través de membrana y metabolismo energético de la glucosa en el hígado.  
Tesina de Licenciatura.
  - ROSENKRANTZ, H. (1.978)  
Effets du cannabis sur le developpement du foetus chez les rongeurs.  
Symposium sur la marijuana. Reims (France). Bull Stup. 30, (3), 28-29.
  - ROSENKRANTZ, H. (1.980)  
The embryotoxic effects of cannabinoids in rats and mice.  
J. Environ. Path. Toxicol. 4, (1), 471-482.
  - ROSENKRANTZ, H.; GRANT, R.J.; FLEISCHMAN, R.W. y BAKER, J.R. (1.986)  
Marihuana induced embryotoxicity in the rabbit.  
Fundam. Appl. Toxicol. 7, (2), 236-243.
  - ROWE, B.W.; RONZIO, R.A.; WEELLNER, V.P. y MEISTER, A. (1.969)

Glutamine synthetase (Sheep Brain)

En: "Methods in Enzymology".

Colowick Kaplan, Academic Press, 17, 900- 903.

- SALLAN, S.E.; CRONIN, C.; ZELEM, M. y ZIMBERG, N.E. (1.980)  
Antiemetics in patients receiving chemotherapy for cancer. A randomized comparison of  $\Delta^9$ -THC and prochlorperazine. N. Engl. J. Med. 302, (3), 135-138.
- SAMRAH, H. (1.970)  
Documento de las Naciones Unidas ST/SOA/SER.S/27.
- SANZ, P.; MESA, A. y REPETTO, M. (1.979)  
Influencia del Cannabis en la adquisición de memoria. III Jornadas Toxicológicas Españolas. Monografía Médica LIADE 327-333.
- SANZ, P.; RODRIGUEZ-CONSUEGRA, M.A.; DOMINGUEZ, C. y REPETTO, M. (1.981)  
Efecto del Cannabis sobre el estro de la rata. IV Jornadas Toxicológicas Españolas. León.
- SANZ, P.; VILLAR, P. y REPETTO, M. (1.983)  
Effect of Cannabis on Enzyme Induction by Phenobarbital. Arch. Toxicol. 6, 115-120.
- SANZ, P.; RODRIGUEZ-VICENTE, M.C.; VILLAR, P. y REPETTO, M. (1.988 a)  
Incontrollable atmospheric conditions which can affect animal experimentation. Vet. Hum. Toxicol. 30, (5), 452-454.
- SANZ, P.; VILLAR, P. y REPETTO, M. (1.988 b)  
Estudio comparativo de la inhibición de la enzima NADPH-cit P<sub>450</sub>-reductasa por resina de cannabis y por dietilditiocarbamato. Rev. Toxicol. 5, 83-90.
- SASSENATH, E. (1.978)  
Effets de l'administration chronique de THC sur la reproduction et sur la progéniture chez les singes rhesus. Symposium sur la marijuana. Reims (France). Bull. Stup. 30, (3), 28-29.
- SAWER, M.A.; RIFKA, S.M.; HAWIKS, R.L. y col. (1.983)

- Marijuana: Interaction with the estrogen receptor.  
 J. Pharmacol. Exp. Ther. 224, (2), 404-407.
- SCHLEGEL, R.P. y NORRIS, J.E. (1.980)  
 Effects of attitude change on behavior for highly involving issues:  
 the case of marihuana smoking.  
 Addict. Behav. 5, (2), 113-124.
  - SCHULTES, R.E. (1.970)  
 Random thoughts and queries on the botany of Cannabis.  
 En: "The botany of Cannabis".  
 Ed. Joyce and Curry. Churchill (London). 11-38.
  - SCHULTES, R.E.; KLEIN, W.M.; PLOWMAN, T. and LOCKWOOD, T.E. (1.974)  
 Cannabis: an example of taxonomic neglect.  
 Bot. Mus. Leaflet. Harv. Univ. 23, 337-367.
  - SEIFTER, S.; SEYMOUR, S.; NOVIC, B. y MUNTIXIYLER, E. (1.957)  
 Determination of glycogen with anthrone reagent.  
 En: Methods in Enzymology.  
 Colowick-Kaplan. Ed. Academic Press. New York, 35-37.
  - SENGUPTA, D. y BHATTACHARYA, P. (1.973)  
 Effets de l'administration d'extraits de cannabis sur les  
 disaccharidases intestinales chez le rat.  
 Nations Unies. 39.
  - SHAFFNER, I.H. (1.923)  
 The influence of relative length of daylight on the reversal of sex in  
 hem.  
 Ecology 4, 323.
  - SIDNEY-COHEN, M.D. (1.976)  
 The 94 day cannabis study.  
 Ann. N.Y. Acad. Sci. 282, 211-220.
  - SIEMENS, A.J. y KALANT, H. (1.975)  
 Metabolism of  $\Delta^9$ THC by the rat in vivo and in vitro.  
 Biochem. Pharmacol. 24, (7), 755-62.
  - SMALL, E. (1.972)  
 Interfertility and chromosomal uniformity in Cannabis.

- Can. y Bot. 50, 1947-1949.
- SMALL, E. (1.975 a)  
Le problème des espèces du Cannabis au regard de la loi americaine: taxonomie et semantique.  
Bull. Stup. 27, (3), 1-19.
  - SMALL, E.; JUI, P. y LEFKOVITCH, L.P. (1.975 b)  
A numerical taxonomic analysis of Cannabis with special reference to species delimitation.  
Brittonia 27.
  - SMALL, E. (1.976)  
The Forensic Taxonomic debate on Cannabis: Sematic Hokum.  
J. For. Sci. 21, (2), 239-251.
  - SMITH, T. y SMITH, H. (1.847)  
On the Resin of Indian Hemp.  
Pharmac. J. and Trans. 6, 127.
  - SMITH, T. y SMITH, H. (1.847)  
Process for preparing cannabine or Hemp resin.  
Pharmac. J. and Trans. 6, 171.
  - SMITH, S.H.; HARRIS, L.S.; UWAYORH, I.M. y MUNSON, A.E. (1.978)  
Structure-activity relationships of natural and synthetic cannabinoids in supression of humoral and cell mediated immunity.  
J. Pharmacol. Exp. Ther 207, (1), 165-170.
  - SMITH, C.G. (1.983)  
Reproductive toxicity: hypotalamic-pituitary mechanism  
Am. J. Ind. Med. 4, (1-2), 107-112.
  - SMITH, C.G. y ASCH, R.H. (1.984)  
Acute short-term and chronic effects of marijuana on the female primate reproductive function.  
Nida Res. Monogr. Serv. No 44, 82-96.
  - SOFIA, R.D. y BARRY, H. (1.970)  
Depressant effect of  $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol enhanced by inhibition of its metabolism.

- Eur. J. Pharmacology 13, (1), 134.
- SPRAGUE, R.A.; ROSENKDRANTZ, H. y BRAUDE, M.C. (1.973)  
Cannabinoid effects on liver glycogen.  
Stors. Live Sci. 12, (2), 409-416.
  - STARK, P. y DEWS, P.B. (1.980)  
Cannabinoids II. Cardiovascular effect.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. 214, (1), 131-138.
  - STEGER, R.W.; SILVERMANN, A.Y.; SILERKHODR, T.M. y ASCH, R.H. (1.980)  
The effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on the positive and negative feedback control of luteinizing hormone release.  
Life Sci. 27, (20), 1911-1916.
  - STEGER, R.W.; DEPAOLO, L.; ASCH, R.H. y SILVERMANN, A. (1.983)  
Interactions of  $\Delta^9$ -THC with hypothalamic neurotransmitters controlling luteinizing hormone and prolactin release.  
Neuroendocrinology 37, (5), 361-370.
  - Stone, H. y Stevens, H. (1.969)  
J. For. Sc. Soc. 9, (1-2), 31.
  - STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H. y SCHIMPER, A.F.W. (1960)  
En: "Tratado de Botánica".  
Ed. Marin. Barcelona. 5ª ed. pag. 554.
  - SUTHEIMER, C.A.; YARBOROUGH, R.; HEPLER, B.R. y SUNSHINE, I. (1.986)  
Detection and confirmation of urinary Cannabinoids.  
J. Anal. Chem. 9, (4), 156.
  - TAKEUCHI, T. y KURIAKI, H. (1.955)  
Histochemical demonstration of phosphorylase in animal tissues.  
J. Histochem. Cytochem. 3, 153-160.
  - TAKEUCHI, T. (1.958)  
Histochemical demonstration of branching enzyme (amylo-1,4 1,6 transflucosidase) in animal tissues.  
J. Histochem. Cytochem. 6, 208-216.
  - TAYLOR, E.C. y STRONJNY, E.J. (1.960)

The synthesis of some model compounds related to tetrahydrocannabinols.

J. Am. Chem. Soc. 82, 5198.

- TAYLOR, D.A. (1.982)

Time course of the effects of chronic  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol on behavior, body temperature, brain amines on withdrawal like behavior in the rat.

J. Pharm. Pharmacol. 34, 240-245.

- TAYLOR, B.J.; NEAL, J.D. y GOUGH, T.A. (1.985)

Traits physiques et chimiques de plantes de Cannabis cultivées au Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord provenant de graines d'origine connue. Troisième partie: études relatives à la troisième et quatrième génération.

Bull. Stup. 37, (4), 77-85.

- TENNES, K. (1.984)

Effects of marijuana on pregnancy and fetal development in the human.

Nida. Res. Monogr. Ser. No 44, 115-123.

- TILAK, S.K. y ZIMMERMAN, A.M. (1.984)

Effects of cannabinoids on macromolecular synthesis in isolated spermatogenic cells.

Pharmacology 29, (6), 344-350.

- TUCKER, R.B. y GRAHAM, B.F. (1.981)

Cannabinoid content of Colombian Cannabis.

J. Can. Soc. Forensic Sci. 14, (2), 41-45.

- TURNER, C.E. y ELSOHLY, M.A. (1.979)

Constituents of Cannabis sativa L XVII. A possible decomposition pathway of  $\Delta^9$ -THC to cannabinol.

J. Heterocyclic Chem. 16, (8), 1667-1668.

- TURNER, C.E. (1.980)

Marijuana research and problems: An overview.

Pharm. Int. 1, (5), 93-96.

- TURNER, C.E.; ELSOHLY, M.A. y BOEREN, E.G. (1.980)

Constituents of Cannabis sativa L XVII. A review of the natural constituents.

J. Nat. Prod. (Lloydia) 43, (2), 164-234.

- TURNER, C.E.; MOLE, M.L.; HANUS, L. y ELSOHLY, H.N. (1.981)  
Constituents of Cannabis sativa XIX. Isolation and structure elucidation of cannabiglendol a novel cannabinoid from an Indian variant.  
J. Nat. Prod. (Lloydia) 44, (1), 27-33.
- USA (1.981)  
THC endorsed as antiemetic in chemotherapy.  
Us. J. Drug Alcohol Depend. 5, (6), 1-4.
- VAZIRI, N.D.; THOMAS, R.; STERLING, H. y col. (1.981)  
Toxicity with intravenous injection of crude marijuana extract.  
Clin. Toxicol. 18, (3), 353-366.
- VERDEJO RIVAS, A. (1.973)  
Cannabis sativa: Estudio botánico, químico, farmacológico, toxicológico, sociológico y legal.  
Arch. Inst. Aclimat. 18, 5-138.
- VINSON, J.A. y LOPATOFKY, D.J. (1.985)  
Semiautomated extraction and spotting system for drug analysis by TLC.  
I. Procedure for analysis of the major metabolites of  $\Delta^9$ -THC in urine.  
J. Anal. Chem. 9, (1), 6.
- WALL, M.E. (1.971)  
In vitro and in vivo metabolism of THC.  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 191, 23-29.
- WALQUIST, M.; NILSSON, I.; SANDBERG, F.; AGURELL, S. y GRNSTRAND, B. (1.970).  
Metabolism of Cannabis IV. Binding of  $\Delta^1$ -THC to human plasma proteins.  
Biochem. Pharmacol. 19, (9), 2579-2584.
- WEIL, A.T.; ZINBERG, N.E. y NELSEN, J.M. (1.969)  
Acute effect of marihuana on speech.  
Nature 222, 434-437.
- WERNER, W.; REY, H-G y WIELINGER, H. (1.970)

Über die Eigenschaften eines neuen chromogens für Blutzuckerbestimmung nach der GOD/POD Methode

Z. Analyt. Chem. 252, 224-228.

- WETZEL, C.D.; JANOWSKY, D.S. y CLOPTON, P.L. (1.982)  
Remote memory during marijuana intoxication.  
Psychopharmacology 76 (3), 278-281.
- WHITING, J.D. y MANDERS, W.W. (1.982)  
Confirmation of a THC metabolite in urine by Gas Chromatography.  
J. Anal. Toxicol. 6, (1), 49.
- WIDMAN, M.; NILSSON, I.M.; NILSSON, J.L.G.; AGURELL, S. y LEANDER, K. (1.971).  
Metabolism of cannabis on major metabolite formed in rat liver.  
Life Sci. 10, 3.
- WIDMAN, M y NILSSON, I.M. (1.973)  
Plasma protein binding of 7-OH- $\Delta^1$ -THC an active  $\Delta^1$ -THC metabolite.  
J. Pharm. Pharmacol. 25, (6), 453-457.
- WIDMAN, M.; AGURELL, S.; EHRNBO, M. y JONES, G. (1.974)  
Binding of (+) and (-)  $\Delta^1$ -THC and (-) 7OH- $\Delta^1$ -THC to blood cells and plasma proteins in man.  
Comm. J. Pharmacol 26, 914-916.
- WIDMAN, M.; NORDQUIST, M. y AGURELL, S. (1.974)  
Biliary excretion of  $\Delta^1$ -THC and its metabolites in the rat.  
Biochem. Pharmacol. 23, (7), 1163-1172.
- WINEK, C.L. (1.977)  
Some historical Aspects of Marihuana.  
Clin. Toxic. 10, (2), 243.
- WIRTH, Ph. W.; MURPHY, J.C.; EL-FERALLY, F.S. y TURNER, C.E. (1.981)  
Constituents of cannabis sativa L XXI. Estrogenic activity of a non-cannabinoid constituent.  
Experientia 37, (11), 1181-1182.
- WOOD, T.B.; SPIVEY, W.T.N. y EASTERFIELD, T.H. (1.896 a)  
Cannabinol, I.

- J. Chem. Soc. 64, 26.
- WOOD, T.B.; SPIVEY, W.T.M. y EASTERFIELD, T.H. (1.896 b)  
Charas, de Resin of Indian Hemp.  
J. Chem. Soc. 69, 539.  
En: "Marijuana".  
Academic Press, New-York and London, 1973.
  - YASHIA, M.D. y WATSON, R.R. (1.987)  
Minireview. Immunomodulation by morphine and marijuana.  
Life Sci. 41, (23), 2503-2510.
  - YISAK, W.; WIDMAN, M.; LINDGREN, J.E. y AGURELL, S. (1.977)  
Neutral in vivo metabolites of cannabiniol isolated from rat faeces.  
J. Pharm. Pharmacol. 29, (8), 487-490.
  - YISAK, W.; WIDMAN, M. y AGURELL, S. (1.978)  
Acidic in vivo metabolites of cannabiniol isolated from rat faeces.  
J. Pharm. Pharmacol. 30, (9), 554-557.
  - ZIEVE, L. (1.981)  
The mechanisms of hepatic coma.  
Hepatology 1, 360-365.
  - ZINBERG, M.E. y WEIL, A.T. (1.970)  
Comparison of marihuana-users and non-users.  
Nature 226, 119-123.
  - ZIMMERMAN, A.M. y ZIMMERMAN, S.B. (1.976)  
The influence of marihuana on eukaryote cell growth and development.  
En: "Marihuana: Chemistry, Biochemistry and cellular effects".  
G.G. Nahas y col. eds. New York: Springer-Verlag.
  - ZIMMERMAN, S.; ZIMMERMAN, A.M.; CAMERON, I.L. y LAURENCE, H.L. (1.977)  
 $\Delta^1$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol y cannabiniol effects on the  
immune response of mice.  
Pharmacology (Basel) 15, (1), 10-23.
  - ZIMMERMAN, A.M.; MURER-ORLANDO, M.L. y RICHER, C.L. (1.986)  
Effect of cannabinoids on spermatogenesis in vivo: A cytological  
study.  
Cytobios 45, (180), 7-15.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Resolución del Tribunal integrado por los abajo firmantes  
de la fecha para juzgar la Tesis Doctoral de  
«María del Carmen Rodríguez Vicente  
Mecanismo de acción del Cannabidiol sobre el  
metabolismo hepático de la glucosa en ratas»

Apto "sum laude"

Sevilla, 24 de abril 1990

El Vocal,

El Vocal,

A. Gelserra

El Secretario,

El Secretario,