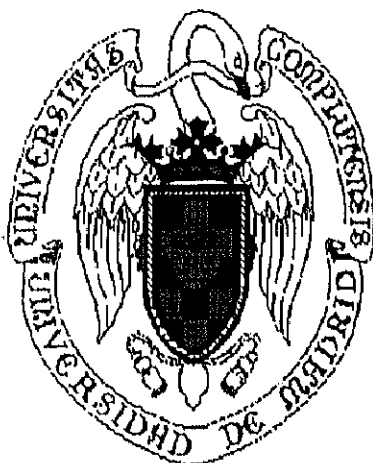


TESIS DOCTORAL



**NUEVAS APORTACIONES AL CONOCIMIENTO FARMACOLÓGICO
DEL CÁÑAMO INDIANO**

María Isabel Fernández Calvo

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

1995

"Lo que se sabe dobla su valor si al mismo tiempo se tiene el de confesar lo que no se sabe, pues así, lo que se sabe, está libre de la sospecha que recae sobre el que quiere hacer creer que sabe lo que no sabe."

Schopenhauer

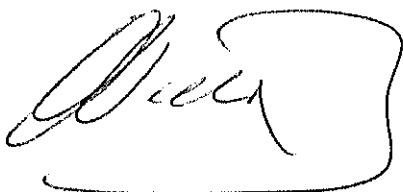
D. Angel María Villar del Fresno, Catedrático y Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, y Dña. Mª Pilar Martínez Honduvilla, Profesora Titular del citado Departamento,

CERTIFICAN:

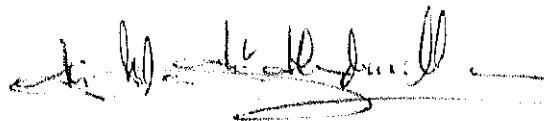
Que la Tesis Doctoral que lleva por título "*Nuevas aportaciones al conocimiento farmacológico del Cáñamo indiano*", presentada por la Licenciada en Farmacia Dña. María Isabel Fernández Calvo, ha sido realizada en este Departamento bajo su inmediata dirección y asesoramiento, reuniendo todos y cada uno de los requisitos necesarios para optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, se autoriza su presentación para que sea juzgado por el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, a los efectos oportunos, firmamos el presente en Madrid, Febrero de 1995.



Angel María Villar del Fresno
Director de la Tesis Doctoral



Mª Pilar Martínez Honduvilla
Directora de la Tesis Doctoral

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por una Beca de Formación de Personal Investigador de la Universidad Complutense de Madrid.

Al finalizar este trabajo, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que de alguna forma han intervenido en él.

Al Profesor Don Angel María Villar del Fresno, quien como Director del Departamento de Farmacología, me acogió hace ya cinco años, primero para la realización de la Tesina de Licenciatura, y después para la de esta Tesis Doctoral; gracias por su dirección y apoyo hasta el último momento.

A la Profesora Doña M^a Pilar Martínez Honduvilla, codirectora de la Tesis, por haberme introducido y orientado en el campo de la investigación. Durante estos años, muchas son las cosas que de ti he aprendido; gracias sobre todo por tu confianza y estímulo continuo.

Mi reconocimiento a Don Luis Domínguez Arqués, Jefe del Servicio de Restricción de Estupefacientes del Ministerio de Sanidad y Consumo, por sus atenciones y amabilidad.

Al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Provincial de Ávila, especialmente al Dr. López Bravo, por su colaboración e inestimable ayuda.

A Carmen, mi amiga y compañera de trabajo en todo este tiempo; por todos los buenos y malos momentos que hemos compartido. Tu amistad es el mejor fruto obtenido.

Hago extensivo mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Farmacología, porque cada uno de vosotros habéis contribuido en este trabajo. Pero mi recuerdo es especial para aquellos que lo habéis seguido y sufrido de cerca: a Jesús y a mis compañeros de módulo, gracias por soportarme.

A toda mi familia, por vuestra ayuda y comprensión; gracias por saber entender el poco tiempo que os he dedicado.

A todos vosotros.

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
DL₀	Dosis letal 0
DL₅₀	Dosis letal 50
DL₁₀₀	Dosis letal 100
DMHP	Dimetilheptilpirano
FSH	Hormona folículo estimulante
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenosa
LH	Hormona luteinizante
MEP	Máximo efecto posible
PRL	Prolactina
SNC	Sistema Nervioso Central
THC	Tetrahidrocannabinol
TRH	Hormona tiroidea

ÍNDICE

"Cannabis ha sido empleado en todo el mundo con distintos propósitos, y posee una larga historia caracterizada por su utilidad, eufórica o nociva, dependiendo del punto de vista..."

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE <i>CANNABIS SATIVA</i>	3
II.1.- <u>ALGUNOS DATOS HISTÓRICOS</u>	3
II.2.- <u>ASPECTOS LEGALES</u>	7
II.3.- <u>PREPARACIONES DE <i>CANNABIS</i></u>	9
II.4.- <u>ESTUDIOS BOTÁNICOS</u>	12
II.4.1.- HÁBITAT	12
II.4.2.- DESCRIPCIÓN	12
II.4.3.- TAXONOMÍA	13
II.4.4.- CLASIFICACIÓN SEGÚN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA . . .	14
II.5.- <u>PRINCIPIOS ACTIVOS: LOS CANNABINOIDES</u>	16
II.5.1.- GENERALIDADES	16
II.5.2.- ESTRUCTURA QUÍMICA	16
II.5.3.- PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	19
II.5.4.- RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	19
II.5.5.- FARMACOCINÉTICA	22
* Absorción y distribución	22
* Metabolismo y eliminación	23
II.5.6.- MECANISMOS DE ACCIÓN	24
* Interacciones inespecíficas con membranas biológicas	24
* Interacciones específicas con membranas biológicas	25
* Alteraciones enzimáticas	25
* Alteraciones en la síntesis de prostaglandinas	26
* Alteraciones del metabolismo macromolecular	27
* Interacción con hormonas esteroideas	27
* El receptor cannabinoide	27
II.6.- <u>FARMACOLOGÍA GENERAL</u>	34
II.6.1.- EFECTOS PSICOACTIVOS	34
II.6.2.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR	36
II.6.3.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RESPIRATORIO	36

II.6.4.- EFECTOS SOBRE SIST. REPRODUCTOR Y ENDOCRINO . . .	37
II.6.5.- EFECTOS SOBRE SISTEMAS NEUROQUÍMICOS	38
II.6.6.- EFECTOS SOBRE LA INGESTA	39
II.6.7.- EFECTOS SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL	39
II.6.8.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO	40
II.6.9.- EFECTOS SOBRE EL FETO Y EL RECIÉN NACIDO	40
II.6.10.- POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS	41
* Uso en glaucoma	41
* Antiasmático	42
* Anticonvulsivante	42
* Acción antiemética	43
* Actividad analgésica	43
* Acción antiinflamatoria	44
* Tratamiento en los espasmos musculares	45
* Acción sedante	45
* Otras acciones terapéuticas	46
II.6.11.- TOLERANCIA	46
II.6.12.- DEPENDENCIA	47
II.6.13.- EXPERIMENTACIÓN ANIMAL: EFECTOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO	48
II.7.- <u>DOSIS LETAL 50 (DL₅₀)</u>	49
II.8.- <u>TEST FARMACOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS CANNABINOIDES</u>	50
<hr/>	
PARTE EXPERIMENTAL	51
III.1.- <u>ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN</u>	51
III.2.- <u>PREPARCIÓN DE LAS MUESTRAS Y TRATAMIENTOS</u>	51
III.3.- <u>DOSIS LETAL 50</u>	54
III.3.1.- MATERIALES Y MÉTODOS	54
III.3.2.- RESULTADOS	54
III.3.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	58

III.4.- ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO	59
III.4.1.- MATERIALES Y MÉTODOS	59
III.4.2.- RESULTADOS	61
III.4.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	66
III.5.- BATERÍA FARMACOLÓGICA PARA CANNABINOIDES	67
III.5.1.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	67
III.5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS	67
DESARROLLO EXPERIMENTAL	74
A.- Curva dosis/efecto del <i>hashish</i>	75
A.1.- RESULTADOS	76
A.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	84
B.- Efecto del Tetrahidrocannabinol	87
B.1.- RESULTADOS	88
B.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	92
C.- Efectos del Cannabidiol y Cannabinol	95
C.1.- RESULTADOS	96
C.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	100
D.- Estudio del posible efecto de los otros componentes de la resina de <i>Cannabis</i>	102
D.1.- RESULTADOS	103
D.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	110
E.- Potenciación o inhibición del efecto del efecto farmacológico de los diferentes principios activos tras una administración conjunta	113
E.1.- RESULTADOS	114
E.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	121
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	125

Cannabaceae



Cannabis sativa L.

UNIVERSIDAD C...
CATEDRA DE ...
MATERIA ...
FACULTAD DE FARMACIA

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

"... Para los agricultores Cannabis es cosecha de fibra;..."

INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

Cannabis sativa es una de las drogas más tradicionales en el tráfico ilegal. El importante incremento experimentado en las últimas décadas por el consumo de los derivados del *Cannabis* (que se concentra fundamentalmente en los países occidentales), así como el conocimiento más profundo de sus efectos psicotrópicos y orgánicos, ha originado la proliferación de datos experimentales encaminados no sólo a su estudio analítico sino también a su proyección en terapéutica y mecanismo de acción de sus principios activos.

Entre las drogas que son objeto de uso indebido, y por lo tanto, de tráfico ilícito, es indudablemente el *Cannabis* la única que generalmente no contiene adulterantes y únicamente en alguna de sus preparaciones, como el aceite de *hashish*, se detectan algunas impurezas que suelen ser otros constituyentes del *Cannabis* o residuos de los disolventes de la extracción. No obstante, en casos contados se han detectado algunas adulteraciones con otras plantas, especialmente en la marihuana. Por otro lado, existen grandes plantaciones de Cáñamo indiano destinadas a la obtención de fibra textil, pues presentan baja proporción de principios activos. Sin embargo, muchas de estas plantaciones, paralelamente enmascaran cultivos con fines lucrativos, destinados a la extracción de su resina, por ser variedades con una riqueza importante en sustancias psicoactivas; por ello, toda aportación científica al estudio analítico de las muestras decomisadas, puede facilitar su identificación y clasificación de las misma como "droga" o "textil".

Desde el punto de vista terapéutico, esta planta fue en la antigüedad una de las empleadas para paliar muchas y muy diversas afecciones, como veremos en las páginas dedicadas a los datos históricos de *Cannabis*. Actualmente se conocen derivados sintéticos de los cannabinoides empleados en la terapia antiemética y para el glaucoma, y se están realizando importantes avances en el campo de los analgésicos. Esto, junto con el descubrimiento del receptor para cannabinoides y de la existencia de posibles ligandos endógenos para dicho receptor, ha situado en la cima de la investigación científica a este tipo de compuestos.

Por todo lo expuesto anteriormente, en la primera etapa de este trabajo experimental, nos propusimos evaluar los diferentes métodos analíticos cromatográficos para identificar de una manera rápida la presencia de compuestos psicoactivos en una muestra de cáñamo. Dicho estudio concluyó con la lectura de dos Tesinas de Licenciaturas basadas en métodos de

cromatografía en capa fina (TLC) (Fernández, 1993) y cromatografía de alta resolución (HPLC) (Recuenco, 1993).

Ahora nos proponemos completar esos trabajos con un estudio puramente farmacológico, empleando diferentes ensayos sobre animal de laboratorio que permiten caracterizar una sustancia como cannabimimética.

Los objetivos principales hacia los que se encaminó este proyecto fueron los siguientes:

- * Revisión bibliográfica de la especie desde el punto de vista botánico, fitoquímico y farmacológico.
- * Determinación de la toxicidad aguda del *hashish* mediante el empleo de la DL₅₀.
- * Estudio anatomopatológico de los órganos afectados tras la intoxicación.
- * Puesta a punto de los diferentes test farmacológicos para el estudio de cannabinoides.
- * Establecimiento de la curva dosis/efecto de la resina.
- * Ensayo de diversas muestras de resina de *Cannabis sativa* (*hashish*) con diferencias en su composición.
- * Comparación del efecto farmacológico mostrado tras la administración de dichas muestra, con el que se presenta tras la administración de cannabinoides puros empleados como patrones.
- * Potenciación o inhibición de los efectos de los diferentes principios activos tras una administración conjunta.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE *CANNABIS SATIVA*

"... para los médicos del siglo pasado era una panacea, y para los médicos de hoy en día, un enigma;..."

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE *CANNABIS SATIVA*

II.1.- ALGUNOS DATOS HISTÓRICOS

La historia de *Cannabis* se remonta aproximadamente a 5000 años atrás. El testimonio más antiguo de que el hombre haya hecho uso de la marihuana es una descripción de la droga en un compendio de medicina chino, el herbolario del emperador Shen Nung, que data del año 2737 a. de C. El cáñamo, se menciona ya en el 1200 a. de C. como fuente de fibra textil, y la primera referencia histórica a cerca de sus propiedades medicinales se encuentra en el antiguo tratado *Atharvaveda* en el año 1000 a. de C. (Singh *et al.*, 1981). Otros datos relacionados con esta droga aparecen en documentos asirios de unos 800 años a. de C. Por último, en un tratado chino de medicina del siglo II d. de C. se cita al cannabis por sus propiedades "narcóticas".

Según el Dr. Royle, "el calmante del dolor" (*Nepente* de Homero) que Helena ofrece Telémaco en honor de Menelao, puede ser *Cannabis*; según se narra, Helena consigue esta planta por medio de una mujer egipcia de Tebas. Dioscórides recomienda la hierba en forma de cataplasma para las inflamaciones y tumores. Paulus Aegineta dice que las semillas tienen propiedades carminativas y desecantes, y el zumo de la planta fresca es útil para el dolor y obstrucciones de oído (Millspaugh, 1974).

Muchas son las alusiones y menciones históricas que relacionan esta droga con hechos cotidianos. Incluso en tiempos antiguos, la marihuana fue tema de pródiga controversia social: estaban los que advertían que la planta del cáñamo orillaba el camino del infierno, y los que pensaban que conducía al Paraíso. Así en la era china pre-cristiana, se consideraba la marihuana como "libertador del pecado". Más tarde los Chinos la proclaman como "la planta donadora del deleite o embeleso". En la India, la marihuana se conoce por nombres que al traducirlos, hacen referencia a gran parte de sus cualidades: "guía celestial o divina" y "consolador o calmante de la pena o el dolor", "hierba de fakires", "cimentador de amistades", "hoja de la alucinación", "excitador del deseo", "provocador de risas"...

Según la leyenda de Zoroastrian, los Musulmanes usaban la marihuana durante las Cruzadas para endurecerse en los actos de terror contra los Cristianos (Turner, 1974). En Arabia, las preparaciones de *Cannabis*, conocidas como *hashish*, se suelen asociar con "cuentos increíbles" de Hasan y sus asesinos, los cuales cometieron toda clase de atrocidades bajo la influencia de la intoxicación por *Cannabis*. Probablemente la palabra *hashish* proceda

precisamente del uso que hacían las tribus dirigidas por Hasan, derivando posteriormente de ella el término "asesino" (*hashishin*).

Herodoto denominó a la planta *Κάναβινς ημερος* al conocer que los Tracios obtenían una clase de tejido de ella. Cuenta que la semilla de *Cannabis* se usaba para los baños de vapor en los ritos funerarios de los escitas, y se han encontrado grabados en vasijas de bronce procedentes de estas civilizaciones (Kettenes-van Denbosch, 1978).

Hemos visto cómo esta planta se empleaba de una forma u otra en todo el Medio Este; así, era bien conocida por asirios, egipcios, escitas, hindúes y griegos. Sin embargo no se encuentran indicaciones claras de que fuera utilizada por los antiguos Judíos. De hecho, el Antiguo Testamento menciona muy pocas drogas; incluso el opio, una medicina de alta reputación en la antigüedad, no aparece en la Biblia. ¿Cuál es la razón por la que un libro que detalla muchos aspectos de la vida, sagrados y profanos, no mencione drogas como opio y *Cannabis*?

Los Asirios utilizaban *Cannabis* en sus ritos religiosos (como droga que induce al éxtasis) y como una droga medicinal (principalmente en lo que hoy denominamos enfermedades neurológicas y psiquiátricas). Por otro lado, durante ciertos períodos de la historia, el comercio de Judea dependió de Asiria; el impacto cultural-religioso de la corte de Nínive ("ciudad cruenta, llena de mentiras y robo"), penetró no sólo en la clase real y prestigiosa de Jerusalén, sino también en las clases bajas. Se puede asumir que bajo estas condiciones, las drogas asirias fueran conocidas y utilizadas, por lo menos entre la clase dirigente, tanto como herramienta para ritos religiosos como de medicina. Después de la muerte del rey asirio Ashurbanipal (669-626 a.C.), el reinado hedonístico de Asiria desapareció con rapidez de la historia. El rey judío Josiah (628 a.C.), durante cuyo reinado resurgieron y se reescribieron algunos de los libros del Antiguo Testamento, hizo eliminar rápidamente toda la influencia pagana de las costumbres religiosas y de la vida judía. El *hashish*, símbolo de la relajada moral asiria, debió ser prohibido. Todo esto se ajusta al fondo histórico, y a las necesidades políticas de un estado Judío independiente y su rey. Esto explica la extraña ausencia de vocablos como *Cannabis* y opio en los libros sagrados judíos (Mechoulam *et al.*, 1991).

Cabe la posibilidad, sin embargo, que en una instancia el antiguo término *Cannabis* sea mencionado en la Biblia. Es probable que "pannag", un producto inidentificado, exportado desde Judea a Tiro y mencionado por el profeta Ezekiel (5, 22), fuera de hecho *Cannabis*. Probablemente el vocablo hebreo "pannag" fuera una de las denominaciones originales, en sánscrito "bhanga" y en persa "bang". En hebreo y en otras lenguas orientales, sólomente las consonantes forman la base de una palabra; las letras **p** y **b** frecuentemente se intercambian. El término "pannag", posiblemente, sufrió una metátesis en sirio ("qunnappa"), y árabe clásico ("kunnab"), llegando al final a "Cannabis" en griego.

Así, el empleo de *Cannabis* se fue extendiendo desde China hasta India, luego a Europa Meridional y al Norte de África, y desde allí, hacia el año 1800, a Europa Occidental, por medio de las tropas del ejército de Napoleón que volvía de la campaña de Egipto.

El interés del valor terapéutico de *Cannabis* en el Oeste, se despertó por el documento escrito de un cirujano irlandés, O'Shaughnessy, en 1842 (Formukong *et al.*, 1989). Este cirujano, empleaba la droga para tratar distintas afecciones, como espasmos musculares, alivio del dolor, convulsiones del tétanos, rabia, reumatismo y epilepsia. Su uso en medicina se fue extendiendo por el resto de Europa y América para combatir una amplia variedad de problemas, que iban desde las convulsiones y los calambres menstruales, hasta la amigdalitis, migrañas y dolor de cabeza. También se utilizó para aumentar las contracciones uterinas y reducir los dolores en el parto.

Tras esta gran difusión, el *hashish* se puso de moda en los círculos artísticos y literarios de mitad del siglo pasado. Moreau de Tours publicó unos estudios muy detallados en 1845, y también describieron los efectos de la droga en relatos llenos de colorido, figuras literarias como Gautier (1843) y Baudelaire (1858). Éstos, junto a Dumas y Balzac, se reunían bajo el signo del *Club des Haschischins* en París durante 1840-1860.

En la primera mitad del siglo XX, los preparados de *Cannabis* fueron disminuyendo, y su uso medicinal prácticamente desapareció. Así, fue retirado de la Farmacopea de Gran Bretaña en 1932 y de la estadounidense en 1942. Unos años más tarde, en 1950, desaparece de la lista del Index Merck. Sin embargo, en la Farmacopea india siguió hasta 1966 (Formukong *et al.*, 1989). El interés por sus propiedades terapéuticas ha dado lugar en la actualidad, a la síntesis de derivados del THC (principio activo mayoritario de la planta) con

un futuro prometedor. Por desgracia, desde finales de los años 50, este interés por la marihuana no ha sido sólo por las posibilidades terapéuticas, sino por el aspecto narcótico de la droga. Actualmente, *Cannabis* y sus derivados, son objetos de un tráfico ilícito considerable y existe un elevado número de personas, principalmente jóvenes, que lo consumen.

11.2.- ASPECTOS LEGALES

Desde el punto de vista legal, y dentro de la vertiente jurídico-penal, el consumo de drogas se encuentra regulado en nuestro país en los *Delitos de riesgo en general* y más concretamente en los artículos 340 bis a) y 344 del vigente Código Penal. En efecto, podemos leer textualmente:

"Los que promovieren, favorecieren o facilitaren el consumo ilegal de drogas tóxicas, estupefaciente y sustancias psicotrópicas mediante actos de cultivo, fabricación o tráfico, o las poseyeran con este último fin, serán castigados con la pena de prisión menor, y multa de 30.000 a 1.500.000 pesetas si se tratare de sustancias que causaren grave daño a la salud, y de arresto mayor en los demás casos. Se impondrán las penas superiores en grado cuando las drogas tóxicas, estupefacientes y sustancias psicotrópicas se difundan entre menores de dieciocho años, en centros docentes, unidades militares o establecimientos penitenciarios, cuando el culpable perteneciese a una organización que tuviera como finalidad difundirlas, así como cuando la cantidad poseída para traficar fuere de notoria importancia. Si los actos anteriores fueren realizados por facultativo o funcionario público con abuso de su profesión, se le impondrá, además, la pena de inhabilitación especial. La sanción del facultativo comprende a los médicos y personas con posesión de títulos sanitarios, al farmacéutico y sus dependientes. En los casos de extrema gravedad y cuando los hechos sean realizados en establecimiento público, o se trate de los jefes, administradores o encargados de una organización dedicada, aunque fuera parcialmente, a los fines del párrafo primero, los Tribunales, además de imponer la pena superior en grado, podrán decretar algunas de las medidas siguientes: a) Clausura definitiva de la empresa, sus locales o establecimiento, o disolución de la sociedad. b) Suspensión de las actividades de la empresa o sociedad por tiempo de seis meses a un año. c) Prohibición a la empresa de realizar actividades, operaciones mercantiles o negocios de la clase de aquéllas en cuyo ejercicio se ha cometido, favorecido o encubierto el delito, por tiempo de dos meses a dos años. Cuando alguna de estas medidas fuera aplicada, el Tribunal podrá proponer a la Administración que disponga la intervención de la empresa para salvaguardar los derechos de los trabajadores. Las condenas de Tribunales extranjeros por delitos de igual entidad a los previstos en el artículo, producirá ante los españoles los mismos efectos que las de éstos en cuanto lo establecido en el número 25 del artículo 10 de este Código".

La primera cuestión que se plantea es si el *Cannabis* se encuentra dentro de lo que se debe entender por droga tóxica, estupefaciente y sustancia psicotrópica, y si es así, si se trata de una sustancia que cause daño a la salud o no.

Desde el punto de vista médico, parece claro que *Cannabis* entre dentro de lo que entendemos por droga en el campo de las toxicomanías, ya que se consideran como tales a *"todo fármaco psicoactivo con acción reforzante positiva, capacidad para desarrollar dependencia psicológica, adicción, así como fenómenos de tolerancia y toxicidad"*.

Para la Administración de Justicia, la inclusión de los derivados cannábicos dentro del concepto de droga tóxica, estupefaciente o sustancia psicotrópica puede ser más dificultosa pues éstos no se encuentran definidos en Código Penal. Por ello, durante muchos años ha existido una gran controversia entre los penalistas respecto al *Cannabis*. La Fiscalía del Tribunal Supremo entiende como droga *"toda sustancia que introducida en el organismo, puede modificar, inmediatamente o no, una o varias de sus funciones. Característica común de toda droga, es que crea una sensación de bienestar y placer y causa una acusada dependencia en el organismo que, habituado a la droga, necesita de manera continua, en forma irresistible, para evitar la aparición de tensiones físicas y psíquicas de variada índole"* (Portero García, 1983). El Tribunal Supremo, según se desprende de numerosas sentencias, entiende por droga tóxica o estupefaciente, a las comprendidas en las listas I, II y IV del Convenio Único de 1961, y en éstas aparece claramente recogido *"Cannabis y su resina y los extractos y tinturas de la Cannabis"* (lista I) y el *"Cannabis y su resina"* (lista IV).

Queda claro, por tanto, que desde el punto de vista jurídico penal, *Cannabis* se encuentra perfectamente dentro de las sustancias a que se hace referencia en el artículo 344 del Código Penal y más en su actual redacción (*"drogas tóxicas, estupefacientes y sustancias psicotrópicas"*).

11.3.- PREPARACIONES DE CANNABIS

En general, en el tráfico ilícito *Cannabis* es una droga que se suele presentar de las tres formas siguientes (Ibañez, 1990):

- Como productos herbáceos (*marihuana*). Tradicionalmente se cree que solamente las sumidades floridas y con fruto contienen cantidades apreciables de compuestos psicoactivos. La presentación de la marihuana, como veremos más abajo, es variadísima dependiendo de la región de procedencia de la muestra. Los productos herbáceos pueden contener entre un 0,5-5% de THC.
- Productos de resina (*hashish*). La técnica empleada para la obtención de la resina varía también en función de la zona, siendo las más frecuentes el frotar la planta entre las manos o contra una superficie de goma a la cual se adhiere la resina. También puede pulverizarse la materia herbácea, para después exponer el polvo al sol derritiéndose la resina que luego es fácilmente moldeada. La resina de *Cannabis* suele contener entre un 2-10% de THC.
- *Cannabis* líquido (aceite de *hashish*). Es un extracto líquido obtenido de la hierba o de la resina. Se realiza una extracción continua mediante un soxhlet, siendo los disolventes empleados el etanol, metanol, acetona y éter de petróleo. Se obtiene así un aceite viscoso de coloración verde o castaño dependiendo de la procedencia y el grado de madurez de la materia. Aproximadamente estos productos suelen contener entre un 10-30% de THC.

Cannabis se consume principalmente fumado, pero también puede ingerirse como alimento o bebida. La India es el único país donde el consumo por vía oral es importante, en forma de bebida principalmente. También se consume en forma de las más diversas golosinas y productos alimenticios. Sin embargo, en la mayor parte de los países es más frecuente fumar la droga, que consumirla de este modo. Las preparaciones más fuertes, suelen fumarse en pipa. Las formas crudas menos activas, se fuman en pipa o en cigarrillos.

En ocasiones se mezclan otras drogas con *Cannabis*. Así, en la India, Pakistán y en otros países del mundo, el tabaco suele ser parte componente de la preparación a fumar. La mezcla con otro tipo de droga es más raro; en ocasiones se añade *datura*, que contiene escopolamina, atropina y otros alcaloides de la belladona.

El cáñamo indiano se cultiva principalmente en regiones cálidas y secas, como India, Egipto, África del Sur, Méjico, etc. Según las áreas, la composición y la forma de elaboración, los preparados reciben distintas denominaciones:

* En India:

- *Bhang*, conocido también como *siddhi*, *subji* ó *patti*. Está constituido por las hojas y las sumidades floridas masculinas y femeninas. Se fuma tal cual, o en ocasiones mezclado con tabaco y opio. Se puede encontrar también en preparados con mantequilla, bollería o pasteles, mezclado con afrodisíacos. Es poco activo como estupefaciente. A partir del *Bhang* se obtienen otras dos preparaciones, el *lutki* (por maceración en alcohol) y la *mudra* (mezclado con opio y estramonio).

- *Ganjah*, formada por las sumidades femeninas fecundadas, e introducidas en resina. Suele presentarse en masas aplanadas, "flat ganjah", o en husos redondos, "round ganjah". Es muy activa y se suele fumar en unas pipas especiales. También se ingiere en forma de bebida con leche y agua.

- *Charas*, llamado también *charras*, *charrus*, *chiras* o *manja*. Se trata de la resina obtenida por recolección manual. Es la droga más rica en principios activos. Se suele consumir fumado o ingerido en forma de dulces, que llevan miel, canela, azúcar, etc.

* En Egipto y Arabia:

- *Hashish*. Al igual que la anterior, es la resina, pero en estado casi puro. Se moldea en finos bastones que se incorporan a los cigarrillos comunes o bien se fuma en pipas especiales. También se le suele adicionar miel, mantequilla o ingredientes aromáticos de las Solanáceas. Como hemos dicho anteriormente, los musulmanes durante las Cruzadas, dirigidos por Hasan, fumaban una hierba (*hashish*), que les estimulaba durante las batallas; por ello, se les denominó *hashishin* o *hashashin*, de donde derivó el término "asesino" en árabe, pues bajo la influencia de esta droga, estas personas no dudaban en matar.

* En Turquía:

- *Hafiorum*. Son extractos acuosos de la planta, adicionados de otras plantas aromáticas y afrodisíacas.

* En África del Norte:

- *Kif*, en Marruecos y Argelia. Son las sumidades floridas femeninas del cáñamo, reducida a polvo grosero.

- *Takrouri*, en Túnez. Son las sumidades troceadas, tamizadas, y presentadas en forma de paquetes.

* En Méjico y el Sur de Estados Unidos:

- *Marihuana*. Probablemente, el origen de este vocablo provenga de la frase azteca "Milan-a-Huan", que posteriormente hubiera derivado en su pronunciación al término actual. También se conoce como *pot* y *grass*. Contiene sumidades floridas y se consume mezclada con tabaco, liada en papel de fumar, que se conoce vulgarmente como "porro". Otras denominaciones comunes típicas de Centroamérica son *juanita*, *marla*, etc.

* En Europa:

- La forma más frecuente de consumo es fumando las sumidades floridas tal cual, o bien, mezcladas con tabaco.

* Otras preparaciones son:

- *Hashish líquido* o *Aceite de Marihuana*, mucho más activo.

- *Esrar*, resina pura de la droga.

- *Dawamesk*, droga almizclada, para pistachos, almendras...

II.4.- ESTUDIO BOTÁNICO

II.4.1.- HÁBITAT

Cannabis sativa es originaria de las zonas templadas de Asia, extendiéndose su cultivo hacia China, India, Persia. Se supone que la planta entró en Europa durante el período Romano, estableciéndose después por todas las zonas templadas del globo.

Crece sin dificultad tanto en sitios desérticos como en tierras cultivadas, lo que ha facilitado su expansión. Florece en Julio y Agosto.

El verdadero cáñamo indiano, que posee propiedades narcóticas, crece a una altitud superior a 1800 m, principalmente en el Tíbet e Himalaya. Estas variedades no presentan grandes diferencias botánicas con las que crecen a bajos niveles de altitud, pero la variación en la composición química es notable.

II.4.2.- DESCRIPCIÓN

Se trata de una planta anual, herbácea, dioica de gran talla, que alcanza desde 1 hasta 3 m de altura. Presenta tallo erecto y estriado, leñoso en la base, simple o escasamente ramificado, y con una corteza interna fibrosa y viscosa.

El cáñamo posee hojas aserradas compuestas, siendo las inferiores opuestas, con 5-7 folíolos lanceolados y las superiores alternas, sencillas o con 3 segmentos; de color verde oscuro por el haz, pálidas y vellosas por el envés, presentan peciolo largos, finos y estipulados.

Las flores masculinas están constituidas por racimos axilares o panículas, con 5 sépalos ovales, más o menos separados y vellosos; 5 estambres opuestos al cáliz, con filamentos cortos, iguales entre sí y colgantes, y largas anteras.

Las inflorescencias femeninas son cimas compactas y espigadas. Son las flores sésiles y con una bráctea foliácea cada una de ellas; cáliz simple y nervado, sépalos hirsutos y con

forma de corazón; ovario con un sólo óvulo recto y ortótropo; estilo poco evidente y 2 estigmas alargados que sobresalen del perianto.

El fruto de *Cannabis sativa* es un aquenio glandular, casi esférico, envuelto por los sépalos; pericarpo membranoso, indehiscente, pero fácilmente separable mediante presión entre las dos valvas.

Por último, la semilla es ovoidea, lisa y de color marrón veteado; un sólo embrión curvado, oleaginoso y con escaso albumen.

II.4.3.- TAXONOMÍA

Muchas son las clasificaciones taxonómicas a las que se ha sometido esta planta a través de la historia; autores que consideran una sola especie dentro del género *Cannabis*, otros que consideran dos especies, y hasta aquellos que son partidarios de una gran cantidad de ellas en función de su origen geográfico.

Nosotros, en este caso, hemos adoptado (como ya lo hicimos en los estudios analíticos cromatográficos que culminaron con la presentación de la Tesina de Licenciatura; Fernández, 1993) la clasificación escogida por Small y Cronquist (Small y Cronquist, 1976). Estos autores presentan *Cannabis sativa* como la única especie del género. A su vez, dicha especie posee dos subespecies, en función del potencial de toxicidad de sus principios activos. Así, el grupo de plantas que poseen una elevada concentración de sustancias narcóticas pertenecen a *Cannabis sativa* subsp. *indica* y aquellas cuya toxicidad es limitada se agrupan bajo la subespecie *Cannabis sativa* subsp. *sativa* y son utilizadas para la obtención de fibra textil y aceite. Cada una de las subespecies presenta además dos variedades botánicas, que se identifican por su crecimiento "salvaje" o bien de cultivos: var. *sativa* y var. *spontanea* son respectivamente las variedades cultivada y natural de la subsp. *sativa*, y la var. *indica* y var. *kafiristanica*, de la subsp. *indica*.

Por lo tanto, la clasificación taxonómica quedaría como se expresa a continuación:

División	<i>Tracheophyta</i>
Subdivisión	<i>Pteropsida</i>
Clase	<i>Angiospermae</i>
Subclase	<i>Dicotyledoneae</i>
Orden	<i>Urticales</i>
Familia	<i>Cannabaceae</i>
Género	<i>Cannabis</i>
Especie	<i>Cannabis sativa</i> L.

Cannabis sativa subsp. *sativa*

Cannabis sativa subsp. *sativa* var. *sativa*

Cannabis sativa subsp. *sativa* var. *spontanea*

Cannabis sativa subsp. *indica*

Cannabis sativa subsp. *indica* var. *indica*

Cannabis sativa subsp. *indica* var. *kafiristanica*

II.4.4.- CLASIFICACIÓN SEGÚN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA

Desde los últimos treinta años se han realizado numerosos intentos para clasificar las distintas variedades de *Cannabis* en función de sus propiedades tóxicas o textiles. Grlié propuso un sistema de clasificación basado en el estado de madurez de la planta (Grlié, 1964). Así, clasificaba las distintas resinas en cinco categorías diferentes, relacionadas con el proceso fitoquímico por el cual el ácido cannabidióico (CBDA) es gradualmente convertido en cannabidiol (CBD), Δ^9 -THC, y finalmente a cannabinol (CBN). Estas cinco categorías agrupan plantas "inmaduras", en cuya composición predomina el CBDA (1); "intermedias", con riqueza en CBD (2); "maduras", ricas en THC (3); "sobre-maduras", con predominio de CBN (4), y "alteradas", que presentan una clara descomposición química (5).

La complejidad del sistema de clasificación de Grlié, las avanzadas técnicas analíticas y la necesidad de una clasificación más clara pero relacionada con la composición química, llevaron a Waller a establecer, en 1971, un sistema de clasificación basado en el fenotipo, en función de la relación siguiente:

$$\text{Fenotipo} = \frac{\Delta^9\text{-THC} + \text{CBN}}{\text{CBD}}$$

Se ha comprobado en numerosos experimentos que la pérdida de la potencia de los efectos de la marihuana va acompañada de la conversión de THC en CBN. Esto significa que la suma del contenido de THC+CBN sería más o menos igual a la proporción de THC en las muestras frescas, recolectadas recientemente (Mohamed *et al.*, 1985).

Observando la fórmula anterior, si una muestra analizada presenta un fenotipo >1 será considerada como *Cannabis* "tipo droga" (fenotipo I); si por el contrario es <1, entonces se considera como *Cannabis* "tipo fibra" (fenotipo II).

Otros autores han ampliado esta clasificación incluyendo un gran número de fenotipos diferentes, haciendo referencia a todas las variedades de *Cannabis* conocidas, y teniendo en cuenta otros cannabinoides menos corrientes que los tres mencionados anteriormente pero presentes en dicha especie (Turner *et al.*, 1980). Nosotros, sin embargo, hemos optado por la clasificación de Waller, que aunque sencilla, aporta información suficiente para afrontar nuestro estudio farmacológico.

II.5.- PRINCIPIOS ACTIVOS: LOS CANNABINOIDES

II.5.1.- GENERALIDADES

Las distintas preparaciones de *Cannabis sativa* deben su poder psicoactivo a una serie de principios activos presentes en la planta y que globalmente se denominan **cannabinoides**. Se han descrito hasta 426 componentes distintos, de los cuales más de 60 son cannabinoides (Dewey, 1986). Estos principios activos se encuentran en cualquiera de las partes de la planta, si bien, la mayor concentración de ellos parece en las inflorescencias. De todos los cannabinoides conocidos, el (-) Δ^9 -Tetrahidrocannabinol (Δ^9 -THC) es el principal componente psicoactivo desde el punto de vista farmacológico.

Otros cannabinoides presentes en cantidades apreciables, aunque con menor actividad farmacológica, son el (-) Δ^8 -Tetrahidrocannabinol (Δ^8 -THC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinal (CBN).

Debido al elevado número de sustancias potencialmente activas presentes en la *marihuana*, y particularmente a la gran variedad de cannabinoides, es probable que todos ellos actúen sinérgicamente, aditivamente o incluso antagonicamente cuando se administra, a los animales de experimentación, en forma de extracto crudo o de resina (Dewey, 1986).

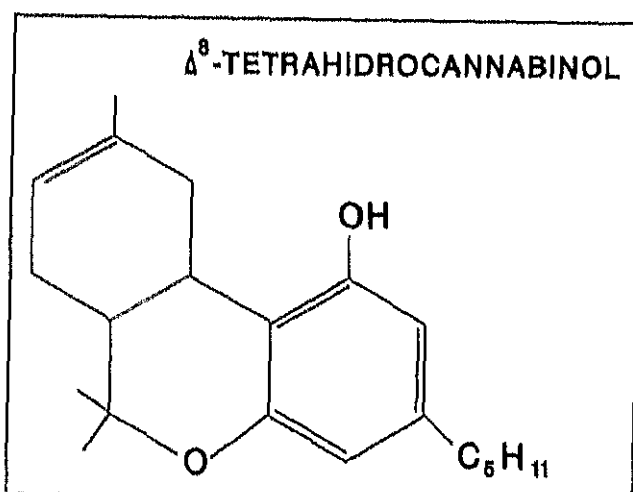
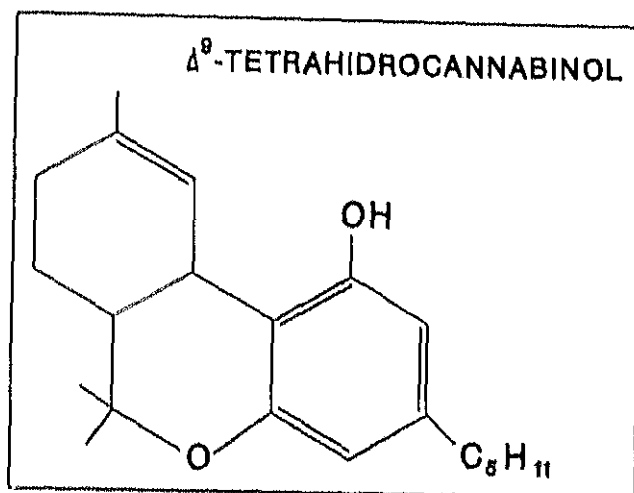
II.5.2.- ESTRUCTURA QUÍMICA

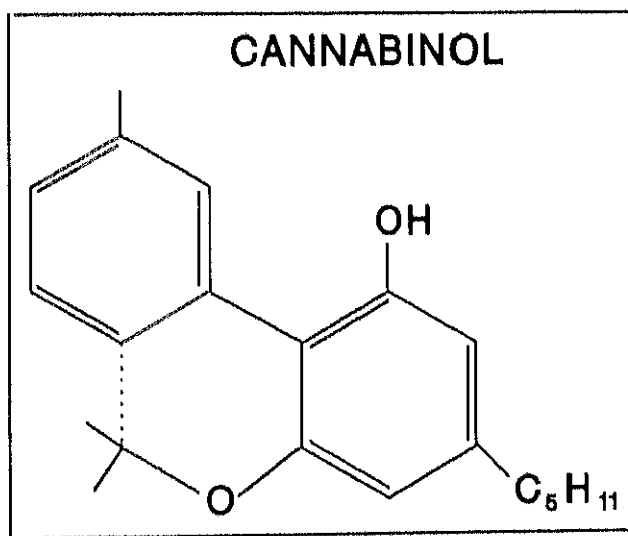
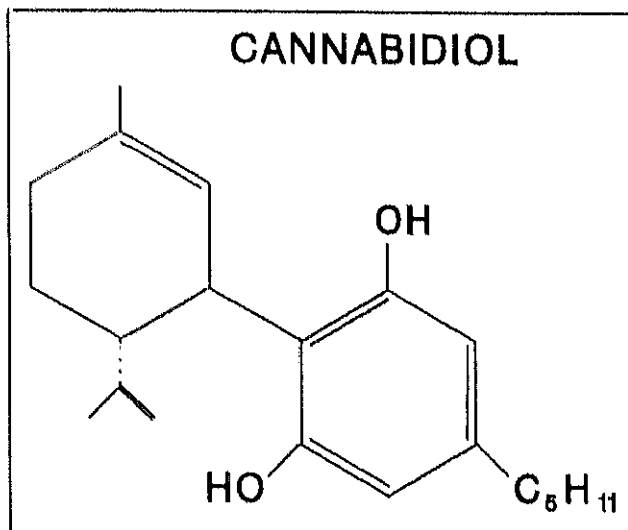
Fue Mechoulam, a finales de los años 60, quien identificó por primera vez la estructura química de los cannabinoides, presentando una estructura carbocíclica de 21 átomos de carbono (Mechoulam, 1970). A diferencia de la mayoría de los otros agentes psicotrópicos carece de nitrógeno en su molécula.

Existen dos tipos diferentes de numeración para estos compuestos, en función de que se considere la estructura principal como un benzopirano o bien como un monoterpeno (Razdan, 1986). Lo cierto es que Δ^9 -THC es exactamente el mismo compuesto que Δ^1 -THC, Δ^8 -THC el mismo que Δ^6 -THC, etc, utilizando, respectivamente, la nomenclatura dibenzopiránica o monoterpénica. Nosotros, para este trabajo hemos optado por la primera de ellas, y por lo tanto, hablaremos siempre de Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, etc.

Los cannabinoides naturales poseen dos centros quirales en C-6a y C-10a en la configuración *trans*, siendo las formas (-) 20 veces más activas que las formas (+).

Aparecen ahora representadas las estructuras de los cuatro cannabinoides de nuestro interés y mayoritarios de *Cannabis*.





11.5.3.- PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Son los cannabinoides y la mayoría de sus metabolitos compuestos altamente lipófilos y de baja solubilidad en soluciones acuosas. Concretamente, Δ^9 -THC es un componente resínico, insoluble en agua con un valor de pK_a de 10,6. Presenta un coeficiente de partición octanol/agua a pH neutro del orden de 6000 (Agurell *et al.*, 1986). Se trata de un compuesto fotolábil, sensible al calor, a la acción de los ácidos y a la oxidación, pasando fácilmente a CBN. Sin embargo, almacenado correctamente, a -20°C y disuelto en etanol, permanece estable durante varios meses.

La elevada liposolubilidad de estos compuestos ha hecho más complicado su estudio farmacológico. No obstante, con el desarrollo científico, se ha logrado sintetizar numerosos análogos de los cannabinoides que son solubles en agua y que han facilitado, en gran medida, el avance en el conocimiento de este grupo de compuestos. Uno de estos análogos cannabimiméticos hidrosolubles es el 1-(4-morfolino) butiriloxi- Δ^8 -THC (**MB- Δ^8 -THC**) que ha demostrado tener actividad farmacológica equipotencial con el Δ^8 -THC (Compton y Martin, 1990).

11.5.4.- RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Aunque hoy día está más que demostrada la existencia del receptor para cannabinoides, no está totalmente claro si este receptor es el único responsable de todas las acciones centrales mediadas por dichos compuestos. Con la síntesis de numerosos análogos del Δ^9 -THC, la gran cantidad de experimentos realizados, tanto en hombre como en animales de laboratorio, y el desarrollo de programas informáticos y técnicas de análisis tridimensional (Thomas *et al.*, 1991), se han podido establecer los requisitos estructurales necesarios para que una molécula conserve su acción cannabimimética.

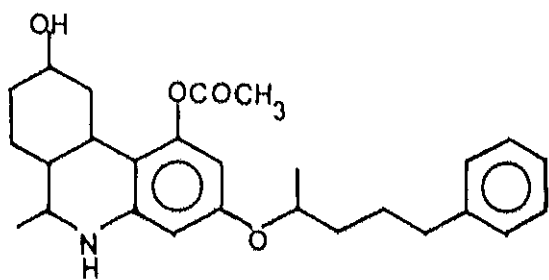
- El Δ^9 -THC y el Δ^8 -THC incluyen en su estructura una **cadena lateral alifática** en el C_1 de tipo pentilo. Su desaparición produce pérdida de la actividad, pero su modificación puede potenciarla. Así, el número mínimo de átomos de carbono ha de ser de tres (Razdan, 1986). Sin embargo, incrementando su longitud en siete átomos y ramificándola con dos grupos metilos, se potencia su acción; se obtienen así los Dimetilheptil (DMH) análogos del Δ^8 y Δ^9 -THC, que han demostrado ser muy activos (Martin *et al.*, 1991).

- La actividad sobre el comportamiento depende en gran medida del grupo **hidroxilo fenólico** del C₁ (Mechoulam y Edey, 1984). Incluso se conoce el ángulo de torsión (155°) que debe tener este grupo para obtener la configuración activa del Δ⁹-THC. Esta premisa se basa en el hecho de que el 1-metoxi-Δ⁹-THC, que presenta una actividad farmacológica muy pequeña, no presenta el ángulo necesario. Esta teoría asume también que es el oxígeno fenólico más que el hidrógeno, el que está implicado en la interacción con el receptor de membrana (Semus y Martin, 1990). Por otro lado, el **Naboctate** que es un derivado sintético muy eficaz como reductor de la presión intraocular del glaucoma, posee un grupo dietilamino esterificado en el hidroxilo.

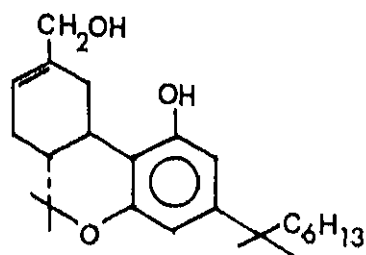
- Para que el compuesto presente psicoactividad es imprescindible también la presencia del **anillo benzopirano**, como lo demuestra el hecho de que el CBD no posea psicoactividad y carezca de dicho anillo. El oxígeno benzopiránico, puede ser sustituido por un nitrógeno; un ejemplo de esta sustitución lo tenemos con el **Levonantradol** (Razdan, 1986). La sustitución de los dos metilos del C₆ resta actividad sobre el sistema nervioso central. Muy importante es también que la unión entre los anillos sea *trans*; la unión en *cis* no da actividad. Sin embargo, Howlett *et al.* han demostrado que análogos no clásicos de los cannabinoides como el Levonantradol (tetracéfico) o el CP 55,940 (biféfico, que carece del anillo benzopiránico), son capaces de producir una gran actividad analgésica.

- Por último, parece ser que la posición del **doble enlace** es fundamental para la actividad sobre el SNC, siendo máxima para Δ⁹, seguida del Δ⁸. Si se produce la saturación completa de anillo, disminuye notablemente la actividad (Razdan, 1986). Es importante destacar que el grupo metilo del C₉ juega un papel fundamental en los efectos comportamentales, su sustitución o eliminación atenúa dichos efectos. La **Nabilona**, posee un grupo ceto en lugar del metilo en C₉; esto le confiere un potente efecto antiemético.

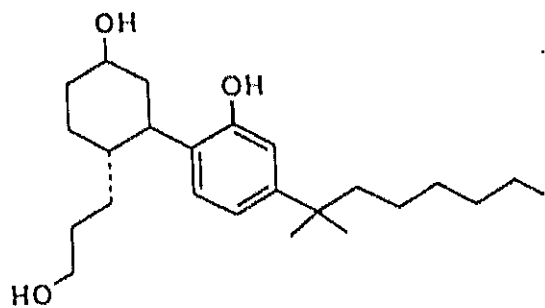
Los análogos aminouquilindólicos con acción cannabimimética son los últimos compuestos sintetizados que guardan relación farmacológica con los cannabinoides naturales. Estos compuestos, que poseen una estructura francamente diferente a la de los cannabinoides, producen efectos antinociceptivos similares a los del Δ⁹-THC (Compton *et al.*, 1992). Además se unen al receptor cannabinoide con una gran afinidad, como se ha podido demostrar mediante técnicas de *binding*; un ejemplo de este tipo de compuestos lo tenemos en el WIN 55212-2 (Kuster *et al.*, 1993).



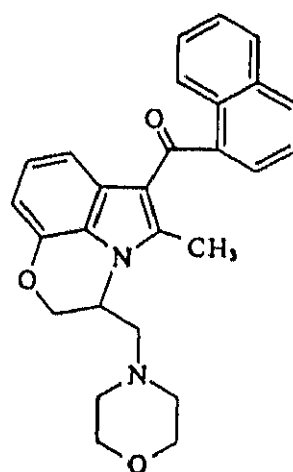
Levonantradol



HU-210



CP-55,940



WIN-55212-2

II.5.5.- FARMACOCINÉTICA

El hombre suele consumir las preparaciones de *Cannabis* fumadas en forma de cigarrillo o en pipa. El estudio farmacocinético de los cannabinoides tras su introducción en el organismo por esta vía de administración, se hace muy complejo, pues intervienen numerosos factores difícilmente controlables. Entre ellos se encuentra la variabilidad de la composición de cada droga: La proporción de Δ^9 -THC en la planta oscila entre un 0,3% y más del 3%, y si se trata de la resina (*hashtsh*), supera el 10%. Además existen factores concernientes a la forma de fumar el cigarrillo (tiempo de retención del aliento, volumen inhalado...). Para complicar aún más el estudio, junto con el Δ^9 -THC coexisten otros muchos cannabinoides que modifican notablemente la farmacocinética del compuesto.

Sin embargo, asumiendo que el Δ^9 -THC es el mayoritario y principal componente responsable de la actividad, nos limitaremos a describir los parámetros farmacocinéticos de dicho compuesto.

En general, son los cannabinoides un grupo de compuestos hidrófobos que sufren una rápida absorción, redistribución y almacenamiento en tejido adiposo, produciéndose posteriormente una liberación lenta, y manteniéndose niveles plasmáticos durante largos períodos de tiempo. Esto explica la ausencia de un síndrome agudo de abstinencia tras su retirada (Agurell *et al.*, 1986).

Como el Δ^9 -THC es insoluble en agua, las únicas vías de administración utilizadas por el hombre para su consumo son la inhalatoria y la ingestión. Si bien, para experimentación animal, además de estas dos vías, se emplean la endovenosa (i.v.) y la intraperitoneal (i.p.). No hay duda que la vía de administración escogida es otro de los factores condicionantes que modifican la farmacocinética.

* Absorción y distribución

Tras una administración inhalatoria o intravenosa, se produce una rápida absorción, con una elevación de los niveles plasmáticos muy rápida y similar en ambos casos (máximo en unos quince minutos). Tratándose de una administración oral, comparativamente se alcanzan niveles plasmáticos más bajos, encontrándose el máximo al cabo de una o dos horas tras la

ingesta. Después, en seguida se produce una disminución progresiva, apreciándose un fenómeno de redistribución; el THC se une en un 77% a proteínas plasmáticas, principalmente a lipoproteínas. Esta elevada unión proteica explicaría el porqué sólo una pequeña proporción de THC pasa al sistema nervioso central.

La elevada liposolubilidad del compuesto, y la existencia de un reciclaje a través de la circulación entero-hepática, se corresponde con una también elevada vida media. Así, tras una sola administración, se observa una vida media plasmática que oscila entre las 20-30 h tanto en humanos como en ratones, disparándose hasta los 7-8 días en el perro. Efectivamente, el perfil gráfico de los niveles plasmáticos del Δ^9 -THC puede interpretarse considerando la intervención de 3 ó 4 compartimentos durante su distribución en el organismo (modelo multicompartmental). Una gran parte del THC plasmático (70%) es captado fundamentalmente por el tejido adiposo, encontrándose concentraciones muy elevadas del compuesto en pulmón y riñón a las pocas horas de su administración, para redistribuirse y acumularse en días posteriores, en bazo y tejido adiposo principalmente (Hunt y Jones, 1980).

* Metabolismo y eliminación

Los cannabinoides poseen un metabolismo complejo que ha sido estudiado por un gran número de investigadores. De todos los cannabinoides naturales, sólo se conocen bien las rutas metabólicas del Δ^9 -THC, Δ^8 -THC, CBD y CBN. En todos ellos se produce un proceso metabólico similar, empezando por una oxidación hepática fundamentalmente, aunque también existe metabolismo en pulmón e intestino. Esta oxidación ocurre vía citocromo p-450, obteniéndose derivados mono, di o trihidroxilados. De los aproximadamente 80 metabolitos conocidos, importancia fundamental posee el monohidroxilado 11-OH- Δ^9 -THC por ser el más activo de todos los metabolitos hidroxilados. Éstos luego continúan su oxidación pasando a los correspondientes derivados cetónicos y carboxílicos (Aguirell *et al.*, 1986). Así mismo, la cadena lateral pentílica presente en los principales cannabinoides, también puede sufrir hidroxilación, vía por la cual se producen cuatro metabolitos hidroxilados: 1'-, 2'-, 3'- y 4'-OH- Δ^9 -THC (Harvey, 1990). Por otro lado, tras la epoxi-oxidación de dobles enlaces del anillo se produce el metabolito 9 α ,10 α -epoxihexahidrocannabinol.

La eliminación de los metabolitos se realiza, fundamentalmente, en forma de ácidos libres o conjugados con glucurónico o ácidos oleico, palmítico o esteárico. Se produce una

excreción por vía biliar (en heces) de aproximadamente 2/3, y 1/3 por vía renal (en orina). Esa mayor proporción de droga eliminada por heces es debido a que la mayoría de las hidroxilaciones, como hemos dicho anteriormente, ocurren en hígado, eliminándose por la bilis al intestino, con la peculiaridad de que puede volver a reabsorberse por la existencia de la circulación entero-hepática. De ahí que se trate de una eliminación lenta: se necesita 4 ó 5 días para eliminar el 50% de la dosis administrada. En los consumidores no habituales los metabolitos pueden detectarse en orina entre los 2 y los 10 días siguientes al último cigarrillo fumado. En los consumidores crónicos, se pueden detectar incluso después de cuatro semanas de la inhalación (Digregorio y Sterling, 1987).

Por último decir que no se detectan en orina ni en heces Δ^9 -THC ni CBD sin metabolizar, pero sí trazas de CBN.

11.5.5.- MECANISMOS DE ACCIÓN

Numerosos e intensos son los estudios hasta ahora realizados para intentar elucidar el mecanismo de acción de los cannabinoides, que pueda explicar tanto sus efectos psicoactivos como el resto de las acciones admitidas para dichos compuestos. Sin embargo, como veremos a continuación, no podemos hablar de un único mecanismo de acción; todo lo contrario, una vez más hay que destacar la complejidad y exclusividad de los cannabinoides, pues son varios y diferentes los mecanismos de actuación atribuidos al Δ^9 -THC y compuestos relacionados.

*** Interacciones inespecíficas con membranas biológicas**

Dada la elevada lipofilia que presentan los cannabinoides, es fácil comprender que estos compuestos posean una mayor afinidad por las membranas biológicas que por los medios acuosos del organismo. Por ello, diversos autores consideran que muchos de los efectos que producen los cannabinoides sobre el SNC se deben a perturbaciones inespecíficas en la membrana neuronal (Martin, 1986). Parece ser que existe una interacción con la bicapa lipídica, produciéndose un aumento de la fluidez de la membrana y que se ha relacionado con la psicoactividad de algunos cannabinoides. Sin embargo los estudios realizados en lo que se refiere al grado de fluidez/estabilidad de las membranas celulares han resultado ser bastante contradictorios. Por otro lado, son lógicas las comparaciones que algunos autores han hecho entre los cannabinoides y los anestésicos locales debido a la elevada lipofilia de ambos tipos

de compuestos; no obstante, actualmente esta hipótesis queda desechada, ya que los estudios de interacción del THC a membranas biológicas realizados por Seeman *et al.* en 1972, muestran una unión 10 veces menor de la necesaria para que un compuesto cumpla la regla de Meyer-Overton que caracteriza a los fármacos anestésicos. Por tanto, se concluye que aunque el Δ^9 -THC sea capaz de producir ligeras perturbaciones en la membrana celular que provocan alteraciones en el comportamiento, no son lo suficientemente profundas como para producir anestesia.

* Interacciones específicas con membranas biológicas

Existen también estudios que sugieren que los cannabinoides interaccionen de una manera específica con los componentes lipídicos de las membranas celulares. Esto se relaciona con la modificación del efecto sobre la membrana cuando se altera ligeramente la molécula de un cannabinoide. Los componentes de la membrana que podrían interaccionar con los cannabinoides son numerosos: colesterol, lecitina, distintos fosfolípidos... Podría ser que los cannabinoides formaran complejos con los fosfolípidos siendo regulado este proceso por la presencia del colesterol. Además existen estudios que demuestran que tras el consumo de *Cannabis*, se produce una alteración en la concentración de los fosfolípidos en plaquetas, eritrocitos, plasma y leucocitos (Kalofoutis *et al.*, 1980).

* Alteraciones enzimáticas

Los cannabinoides son capaces de inhibir un gran número de sistemas enzimáticos. En general, parece ser que esta inhibición ocurre a través de un mecanismo de acción inespecífico. Resultamos a continuación los enzimas inhibidos más importantes:

- *Adenosín Trifosfatasa (ATPasa)*

Las alteraciones sobre la actividad de la ATPasa conlleva implicaciones en la mayoría de los procesos biológicos debido a la energía producida tras la hidrólisis del ATP. Se sabe que los cannabinoides inhiben todas las ATPasas conocidas, de cualquier tejido y especie, a muy bajas concentraciones, pero hasta el momento no se ha encontrado una clara relación entre porcentaje de inhibición enzimática y psicoactividad.

- *Adenilato Ciclasa y Fosfodiesterasa*

Estudios realizados en los últimos años muestran que los efectos producidos por el THC y compuestos relacionados sobre los sistemas enzimáticos que participan en el recambio del AMPc dependen de la dosis, el tejido y de la concentración y tipo del cannabinoide empleado. Todas estas variables, asociadas al carácter bifásico de las respuestas de los cannabinoides, hacen muy difícil conocer perfectamente el papel que desempeña el AMPc en las acciones de dichos compuestos. En este sentido, los cannabinoides no ejercen ningún efecto sobre la fosfodiesterasa, sino que producen una alteración en la actividad enzimática de la adenilato ciclasa. Parece ser que existe un efecto dosis-dependiente sobre esta enzima; así, a bajas concentraciones se produciría una inhibición de la adenilato ciclasa debido a una interacción específica del cannabinoide a un receptor (Howlett, 1987). Por el contrario, a concentraciones elevadas, se produciría el efecto contrario, esto es, un aumento de la actividad enzimática con el consecuente incremento de los niveles de AMPc, todo ello provocado por un mecanismo inespecífico de perturbación de membrana.

- Otras enzimas sobre las que estos compuestos ejercen su acción, inhibiéndolas por norma general, son: α -Glucosidasa, β -Glucuronidasa, Fosfatasa ácida, NADP-oxidasa, 5'-Nucleotidasa, Colesterol esterasa, etc.

* *Alteración en la síntesis de prostaglandinas*

Una vez más la complejidad es la nota predominante en los estudios realizados para entender el mecanismo de actuación de los cannabinoides. Las alteraciones que estos compuestos producen sobre la cascada de ácido araquidónico son dependientes tanto de la concentración de la sustancia como del tejido examinado. En general, los cannabinoides estimulan la *Fosfolipasa A₂*, que como resultado provoca un incremento en la síntesis del ácido araquidónico; como punto final de la cascada, y dependiendo del tejido, la conversión del ácido araquidónico a las diferentes prostaglandinas, se verá estimulada o inhibida. Además, Evans *et al.* en 1987, demuestran que ciertos componentes no cannabinoides de la marihuana son inhibidores de la *Ciclo-oxigenasa*, mientras que los cannabinoides, además de inhibir esta enzima, inhiben también la *Lipoxigenasa*.

* Alteraciones del metabolismo macromolecular

En general, los experimentos *in vitro* demuestran que ciertamente los cannabinoides producen una marcada inhibición, dependiente de la concentración, sobre uno o más de los pasos involucrados en el metabolismo macromolecular (inhiben la síntesis de DNA, RNA, proteínas, etc). Estos procesos no presentan relación alguna con los efectos observados *in vivo* sobre el sistema nervioso central, pues cannabinoides inactivos en este sentido, como el CBN, sí producen alteraciones en la síntesis de macromoléculas.

* Interacción con hormonas esteroideas

Bien es sabido la influencia que tienen las hormonas esteroideas sobre las emociones y los estados afectivos. El cerebro posee receptores para diferentes hormonas esteroideas, entre las que se encuentran estrógenos, progesterona, andrógenos y corticosteroides. Por otro lado, los cannabinoides están relacionados con los esteroideos, pues ambos presentan una estructura carbocíclica similar; esto sugiere que los cannabinoides puedan interactuar con los sistemas esteroídicos.

Por ejemplo, la administración Δ^9 -THC, CBD, CBN y otros cannabinoides a ratas de laboratorio, produce un incremento de los niveles plasmáticos de corticosterona, siendo el más potente de todos el Δ^9 -THC (Zuardi *et al.*, 1984). Además, el THC es capaz de interactuar con los receptores de glucocorticoides del hipocampo. Se sabe también que el consumo de marihuana puede producir una disminución de los niveles plasmáticos de testosterona, impotencia y oligospermia en el hombre. Los efectos que los cannabinoides producen sobre la función reproductora, pueden resumirse en: alteraciones en la secreción de gonadotropinas, inhibición de producción de andrógenos y estrógenos y alteraciones en la unión a los receptores diana.

* El receptor cannabinoide

En los últimos años los estudios realizados para intentar encontrar y aislar un receptor para los cannabinoides, se apoyaban en la existencia de una relación estructura-actividad, en ensayos de *binding* realizados *in vitro*, el hallazgo de posibles antagonistas y la posibilidad de encontrar un ligando endógeno.

La primera identificación satisfactoria del sitio de unión de un cannabinoide en tejido cerebral, se realizó mediante la utilización de un análogo sintético soluble y psicoactivo, el 5¹-trimetilamonio- Δ^8 -THC (Nye *et al.*, 1985). Este sitio de unión con alta afinidad, saturable y reversible, se encontraba distribuido por todo el cerebro, principalmente en hipocampo, estriado y médula espinal. Sin embargo, al ensayar otros cannabinoideos, no se encontró una clara correlación entre la afinidad de cada uno de ellos y su potencia psicoactiva, por lo que se piensa que dicho sitio de unión no media los efectos psicoactivos de los cannabinoideos.

Howlett, en 1984, demuestra que el Δ^9 -THC inhibía la actividad de la adenilato ciclasa de una forma dosis dependiente; se demostró que esta inhibición no era debida a una alteración inespecífica de la membrana, pues no se producía en todos los tipos de células ensayadas. Además esta inhibición estaba regulada por cationes divalentes como Mg^{2+} y Mn^{2+} y nucleótidos de guanina. Dos años más tarde, el grupo de Howlett demuestra que la inhibición de la adenilato ciclasa requería, además, de la presencia de la proteína G_i , ya que el efecto se podía bloquear mediante ribosilación de ésta inducida por la toxina *pertussis* (Howlett *et al.*, 1986). Todo esto, junto con la existencia de una correlación de las propiedades analgésicas de una serie de compuestos cannabinoideos no clásicos que inhibían la actividad de la adenilato ciclasa *in vitro* (Howlett *et al.*, 1987), condujo a la formulación de un modelo de receptor cannabinoide (Devane *et al.*, 1988). Con estos estudios se llegó al diseño de cannabinoideos sintéticos, siendo por ejemplo el CP-55,940, uno de los más usados como ligando en los ensayos de *binding* y que posee un perfil farmacológico similar al del Δ^9 -THC.

En 1990, el equipo de Matsuda, mientras buscaban genes relacionados con los receptores de la sustancia-P, clonó un gen que luego resultó ser el del receptor de cannabinoideos. Este gen codificaba para un receptor acoplado a la adenilato ciclasa. Es una proteína de membrana de 476 aminoácidos, con 7 dominios hidrofóbicos y varios grupos sensibles a glicosilación.

Una vez caracterizado el receptor cannabinoide y clasificado dentro del grupo de receptores que se encuentran acoplados a la proteína G_i , Howlett y Houston han demostrado en uno de sus últimos ensayos, que dicho receptor sigue manteniendo su funcionalidad aunque se encuentre separado de la membrana celular, hecho que se ha comprobado mediante la solubilización del receptor cannabinoide utilizando un detergente; una vez solubilizado, se

comprobó mediante técnicas de *binding* que conservaba su alta afinidad de interacción con los ligandos (Houston y Howlett, 1992).

Recientemente, utilizando un análogo cannabimimético muy potente y soluble en agua, el **Win 55,212-2**, se ha demostrado que los cannabinoides producen una inhibición potente, reversible y estereoespecífica de los canales de calcio tipo N (Pacheco *et al.*, 1992). Estos experimentos sugieren además que la vía de transducción entre el receptor cannabinoide y los canales de calcio, implica una proteína $G_{(s,i,o)}$ que se une a GTP, que es sensible a la toxina *pertussis* e independiente del metabolismo del AMPc. Por lo tanto, la inhibición de los canales de calcio de tipo N podría disminuir la excitabilidad y la liberación del neurotransmisor, ya que el calcio es un segundo mensajero muy frecuente en la transmisión neuronal. Esto podría explicar alguno de los efectos psicoactivos de los cannabinoides.

Para conocer la localización y distribución del receptor, se han empleado en estos últimos años técnicas muy sensibles de autorradiografía e hibridación *in situ*, siendo los radioligandos más usados: los propios cannabinoides naturales ($^3\text{H}-\Delta^9\text{-THC}$), cannabinoides clásicos sintéticos como los Dimetilheptil análogos ($^3\text{H}-11\text{OH}-\Delta^9\text{-THC-DMH}$) (Thomas *et al.*, 1992), cannabinoides sintéticos no clásicos ($^3\text{H-CP-55,940}$) (Herkenham *et al.*, 1989) y aril alquil indoles, como el **Win 55,212-2** (Jansen *et al.*, 1992). Sorprendentemente, este receptor ha resultado ser uno de los que se encuentran en mayor densidad en cerebro, y además, está presente en toda la escala vertebrada. El patrón de distribución se conserva admirablemente. Las zonas de más alta densidad se encuentra en los núcleos de proyección de los ganglios basales (*globus pallidus*, *substantia nigra pars reticulata*), en el hipocampo y en cerebelo. Otras zonas con también alta densidad de receptores son el bulbo olfatorio, el caudado-putamen lateral y el núcleo entopeduncular. Las regiones que presentan una densidad receptorial moderada, pertenecen principalmente a las capas I y VI del *cortex cerebral*. La médula espinal y el tronco cerebral, prácticamente carecen de receptores cannabinoides. En el hipotálamo, destaca el área preóptica medial, el hipotálamo lateral y los núcleos ventromedial y paraventricular. En la hipófisis existe un número muy bajo de receptores.

Cuando se estudia en paralelo la distribución de los receptores cannabinoides con otros tipos de receptores, encontramos que se observa una relación entre los dopaminérgicos y los cannabinoides, y concretamente con los receptores D-1. Ambos están acoplados fuertemente a la adenilato ciclasa, siendo el receptor cannabinoide inhibitorio y el receptor D-1, activador

(Mailleux *et al.*, 1992). También se ha demostrado la coexistencia de receptores gabaérgicos con receptores cannabinoicos en cerebelo, que podría ser una explicación de la disminución de la coordinación motora que se produce en el hombre y en los animales de experimentación tras la administración de 'THC' (Mackie *et al.*, 1992).

Afortunadamente, se establece un alto grado de correlación entre las localizaciones del receptor cannabinoide, la afinidad de los ligandos al receptor, y la producción de efectos *in vivo*. Esto se observó empleando una amplia gama de cannabinoicos naturales, metabolitos, derivados sintéticos clásicos y no clásicos, derivados halogenados, etc. (Comptom *et al.*, 1992):

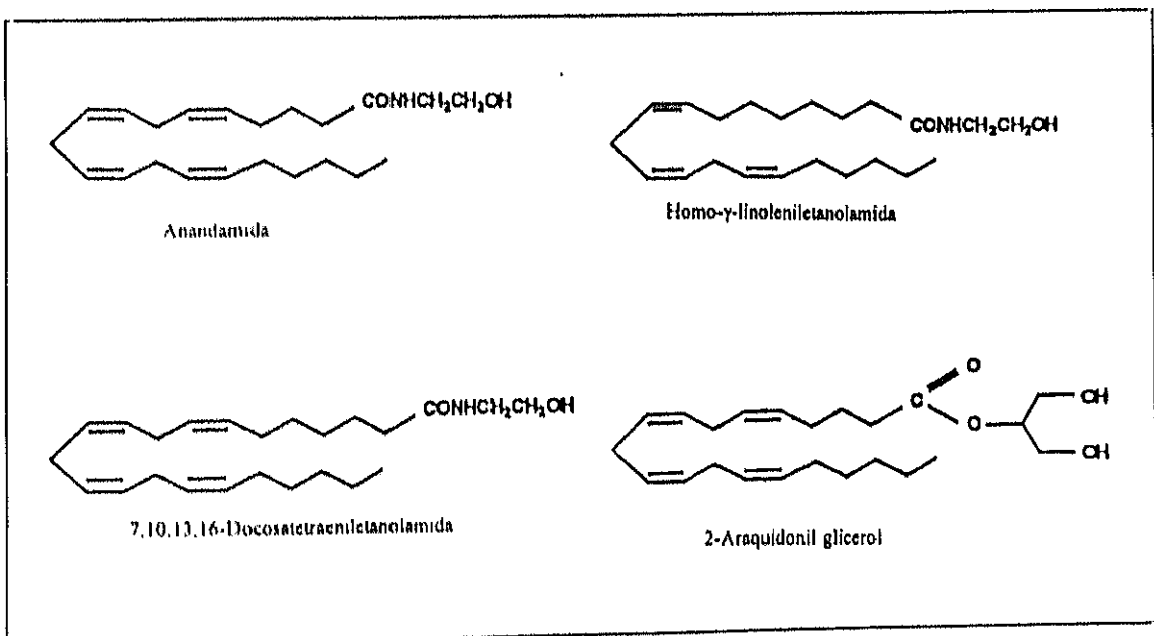
- Así, la disminución de la actividad espontánea acompañada de una respuesta exagerada a los reflejos producidos a bajas dosis, y la catalepsia a dosis altas, son producto de la localización de los receptores cannabinoicos en los ganglios basales y el cortex cerebral.
- La ataxia, puede estar relacionada con la presencia del receptor en cerebelo.
- La baja densidad receptorial del tallo cerebral se asocia con la disregulación respiratoria e incluso de la función cardiovascular, añadiéndose así un nuevo matiz tóxico a los cannabinoicos.
- Por otro lado, la hipotermia que se produce tras la administración de *Cannabis*, se relaciona con una acción sobre los receptores del hipotálamo anterior y área preóptica.
- Los efectos psicoactivos producidos en el hombre han sido estudiados en profundidad, incluyendo también los cambios en la visión y audición, la incapacidad a la concentración y razonamiento, e incluso las alteraciones en la memoria. Parece que todos ellos están relacionados con la localización de los receptores de cannabinoicos en el cortex cerebral e hipocampo.
- Igualmente, se relaciona con el hipocampo la actividad anticonvulsivante de los cannabinoicos.
- Incluso los efectos analgésicos del THC se asocian a áreas neuronales que presentan, en los estudios autorradiográficos, muy baja densidad en receptores, como son el tronco cerebral y la médula espinal, ambos asociados con la transmisión de la información nociceptiva y analgésica (Mailleux y Vanderhaeghen, 1992). Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de una acción periférica de los cannabinoicos sobre neuronas sensitivas.

A lo largo de esta revisión del receptor cannabinoide hemos ido haciendo numerosas referencias a localizaciones de dicho receptor en el sistema nervioso central. Sin embargo,

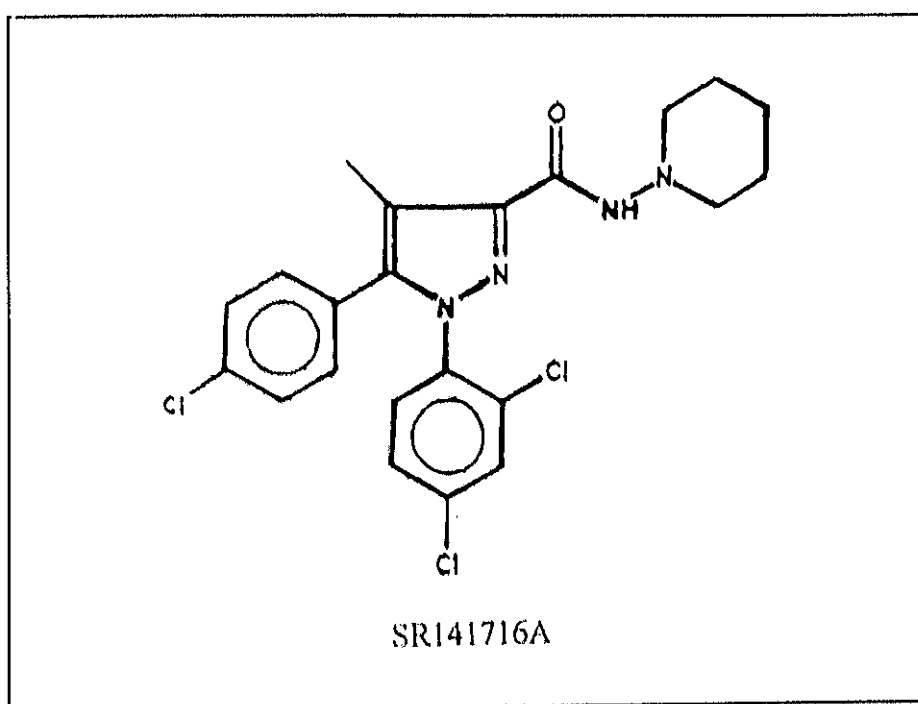
existe también representación del receptor cannabinoide en áreas periféricas. Así, poco después de que se clonara el gen que codificaba al receptor unido a proteína G de los cannabinoides, se vio que no sólo se expresaba en el cerebro, sino también en los testículos, aunque en unos niveles muy bajos (Gérard *et al.*, 1991). En 1992 Kaminski *et al.*, encuentran una elevada unión específica de distintos radioligandos cannabinoides a sitios de unión en células esplénicas de ratón. Estos hallazgos apoyaban la hipótesis de que la inmunosupresión causada por Δ^9 -THC estuviera mediada por la inhibición de los niveles de AMPc intracelular (Schatz *et al.*, 1992), pues el AMPc es un segundo mensajero importante para la activación de los linfocitos. Efectivamente, los últimos estudios realizados al respecto muestran resultados de la expresión del receptor cannabinoide en bazo, amígdalas y leucocitos de sangre periférica, siendo los linfocitos B las células que presentan mayor proporción de expresión, si bien 16 veces menor a la recogida en SNC (Bonaboula *et al.*, 1993). Por último, recientemente se ha clonado un gen (CX5) para un receptor de cannabinoides, que no se expresa en cerebro, pero sí en los macrófagos de la zona marginal del bazo. Todavía no está claro, pero hay evidencias para creer que se trata de un receptor que traduce su señal a través de una proteína G, en respuesta a la unión de un ligando endógeno. Además, curiosamente es el cannabinoide (CBN) el cannabinoide que presenta una mayor afinidad por este receptor que por el receptor cerebral. En un futuro no muy lejano, probablemente se distingan dos tipos de receptores de cannabinoides: uno responsable de las acciones centrales (CB1) y otro de las periféricas (CB2) (Munro *et al.*, 1993).

Por otro lado, la demostración de la expresión de receptores cannabinérgicos por todo el cerebro sugería la presencia de un ligando endógeno natural, que se uniera a este receptor. Pues bien, hace sólo un par de años, el grupo de Mechoulam en la búsqueda de ligandos endógenos para dicho receptor, aisló de cerebro de cerdo, un compuesto que se unía al receptor y que fue denominado *Anandamida* (del sánscrito *ananda*, que significa bienaventuranza) (Devane *et al.*, 1992). La estructura de dicho compuesto fue determinada por espectrofotometría de masas y RMN, y confirmada por síntesis. Se trataba de un derivado del ácido araquidónico, la araquidoniletanolamida. Después se demostró que la anandamida inhibía la adenilato ciclasa (Vogel *et al.*, 1993), y que dicha inhibición es bloqueada por la acción de la toxina *pertussis* (Felder *et al.*, 1993), confirmándose la interacción específica de este ligando con el receptor cannabinoide. Pocos meses después se empiezan a realizar ensayos farmacológicos sobre órgano aislado y animal entero, en los que la anandamida mimetiza los efectos que producen los cannabinoides sobre el comportamiento animal, en distintos test

farmacológicos típicos de dichos compuestos (Fride y Mechoulam, 1993). La identificación de la anandamida como un ligando potencial para el receptor cannabinoide reafirma la importancia biológica de las amidas de ácidos grasos y sus derivados. Actualmente dos son las posibles vías de formación de este ligando endógeno: la condensación del ácido araquidónico con etanolamida, o bien a partir de un precursor (N-araquidonilfosfatidiletanolamida), tras la acción de la fosfodiesterasa (Di Marzo *et al.*, 1994). La intervención de la ruta metabólica del ácido araquidónico con el sistema cannabinoide es más que evidente; tras una acción enzimática escalonada, se producirían diferentes compuestos que en parte podrían actuar a través del receptor cannabinoide. De hecho, ya se han identificado en cerebro de cerdo, otros dos derivados del ácido araquidónico que son capaces de interactuar con el receptor cannabinoide: La **Homo- γ -linoleniletanolamida** y la **Docosotetraeniletanolamida** (Hanus *et al.*, 1993). Más recientemente, se ha aislado en el intestino de perro otra sustancia capaz de reaccionar con el receptor cannabinoide, el **Araquidonil-2-glicerol** (Ramos, 1994); esto demuestra que la anandamida no es el único representante de estos posibles mediadores neuronales, y que cabe la posibilidad de que exista una gran diversidad de efectos moduladores por parte de ellos.



Por último, en los últimos meses se ha obtenido mediante síntesis, el primer antagonista selectivo y activo por vía oral del receptor central de cannabinoides. Sin embargo, no presenta afinidad por el receptor cannabinoico periférico. El **SR141716A**, compuesto derivado del pirazol, antagoniza todos los efectos farmacológicos y comportamentales atribuidos a los cannabinoides (Rinaldi-Carmona *et al.*, 1994). Este compuesto puede aportar grandes avances para el conocimiento de la fisiología del sistema anandamida/cannabinoide.



II.6.- FARMACOLOGÍA GENERAL

La farmacología de los cannabinoides está caracterizada por la multiplicidad de efectos, siendo debidos principalmente a su acción sobre el SNC; es de esperar por ello, que la mayoría de los efectos se produzcan a nivel de la inervación del órgano más que en el órgano en sí.

Los cannabinoides producen diversos efectos comportamentales, fisiológicos y farmacológicos tanto en el hombre como en animales de experimentación, dependiendo claramente de la vía de administración. Para facilitar el estudio, la mayoría de los experimentos se encuentran fundamentalmente basados en el principal componente psicoactivo aislado de *Cannabis sativa*, el Δ^9 -THC, y por lo tanto, en la mayoría de los casos haremos referencia a este compuesto. Daremos en primer lugar un ligero repaso sobre los efectos que produce dicho compuesto en el ser humano, continuando con los que se observan en experimentación animal, para concluir con las aplicaciones terapéuticas posibles.

II.6.1.- EFECTOS PSICOACTIVOS

Los efectos que puede producir el consumo de *Cannabis* en el hombre son muy complejos. Los efectos subjetivos que experimentan los individuos incluyen: excitación y disociación de ideas, aumento de los sentidos, errores en la apreciación del tiempo y espacio, alteración de las emociones, ideas fijas e ilusiones, impulsos irresistibles, espejismos y alucinaciones. Se ha comprobado que estos efectos varían de unos individuos a otros en función de la dosis, vía de administración, la experiencia y expectación del sujeto y la vulnerabilidad individual a ciertos efectos psicotóxicos. Además, los niveles plasmáticos del THC dependen también de la técnica del fumador, del contenido en cannabinoides de la muestra y de la proporción alterada durante la pirólisis, en la cual se producen también otros compuestos que pueden agudizarlos efectos o aumentar la toxicidad a largo plazo.

Tras el consumo de esta droga, los efectos comienzan con un período inicial de euforia o *high*, que ha sido descrito como una sensación de bienestar y felicidad, que va seguido frecuentemente por un estado de somnolencia o sedación. Por un aumento de la dosis o un consumo repetido, se producen hiperestésias sensoriales y distorsiones en la percepción sensorial en cuanto a forma, distancia, color, etc.

Además, se produce un deterioro de las funciones cognoscitivas, incluyendo: alteraciones de la memoria, disminución del aprendizaje, disminución de la percepción y de la atención. En aquellos casos en que además el individuo padece un síndrome depresivo, el consumo crónico de esta droga puede provocar estados de psicosis agudas y pánico, con fases de ansiedad intensa (Abood y Martin, 1992).

A dosis ya muy elevadas o a largo plazo en consumidores crónicos, se puede desarrollar estados de *delirium* y una psicosis tóxica aguda, acompañada de despersonalización, pérdida de la percepción interior, para finalmente desencadenar un "síndrome amotivacional". Mathew y sus colaboradores, en un estudio reciente realizado sobre un grupo de 35 voluntarios que fumaron cigarrillos de marihuana que contenían dosis bajas y altas de THC, demuestran que el grado de despersonalización y de desintegración es proporcional a la dosis, y que el efecto máximo se produce a los 30 minutos tras la inhalación, volviendo el sujeto a su estado normal a los 120 minutos después (Mathew *et al.*, 1993).

Hay evidencias de que el uso crónico de derivados del *Cannabis* puede llevar consigo un alto riesgo de desarrollo de varias complicaciones psiquiátricas. En general, esto se produce agravando enfermedades ya existentes. Un estudio realizado mediante el seguimiento de una amplia población de consumidores habituales de marihuana, durante 15 años, ha mostrado un aumento de la incidencia de la esquizofrenia y otros procesos psicóticos 6 veces superior a la presentada por los no consumidores de dicha droga, indicando que el consumo de *Cannabis* es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la esquizofrenia (Andréasson *et al.*, 1987).

Los estudios realizados en los últimos años, tanto en hombres como en animales de experimentación, que trataban de establecer una relación entre el consumo de marihuana y el aumento de la violencia y la agresividad, reflejaban que tras el consumo de dicha droga se producía un descenso en la respuesta agresiva. Sin embargo, en un estudio realizado en el año 93 se observa un aumento de la agresividad de los sujetos durante las horas siguientes a la inhalación de marihuana (Cherek *et al.*, 1993). Estas diferencias se explican por la diferente vía de administración utilizada en los primeros estudios (oral e intramuscular) y en éste último (inhalación).

Numerosos autores apoyan la hipótesis de que existen dos grandes grupos de cannabinoides: uno de ellos formado por cannabinoides que producen depresión comportamental acompañada de un componente estimulante, siendo el Δ^9 -THC el compuesto modelo. El otro grupo, encabezado por el CBD y CBN, lo constituyen cannabinoides que producen también depresión del SNC, pero sin componente estimulante (Dewey, 1986).

II.6.2.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Los efectos de los cannabinoides a este nivel son mucho más marcados en animales de experimentación que en el hombre, e incluso se pueden manifestar efectos opuestos. Está perfectamente demostrado que la administración aguda de THC produce taquicardia sinusal. Cuando la droga es inhalada, la taquicardia aparece a los 15 minutos, teniendo una duración de aproximadamente 30 minutos; en cambio, cuando es administrada por vía oral, existe una relación temporal entre esa taquicardia y los efectos subjetivos (Hollister, 1986).

A dosis bajas y mediante inhalación, en general no se aprecian cambios en la presión sanguínea, pero a dosis elevadas aparece hipotensión ortostática y sensación de vértigo, así como una disminución de la velocidad del riego sanguíneo cerebral (Mathew *et al.*, 1992). Los estudios realizados sobre este tema concluyen en general que los múltiples efectos producidos sobre el aparato cardiovascular se deben a una depresión del centro vasomotor y a una acción cardioaceleradora.

II.6.3.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA RESPIRATORIO

No debemos olvidar que la vía de administración más utilizada para el consumo de esta droga es la inhalatoria. A los daños que pueda producir el THC sobre el aparato respiratorio hay que añadir el producido por las otras sustancias que se inhalan al fumar un cigarrillo. La inhalación va a producir alteraciones en el tracto respiratorio. Lo más frecuente es que aparezcan tras varias exposiciones a la droga, aunque no es raro que algunos de los efectos aparezcan tras haber inhalado una sola dosis. Los cannabinoides producen una acción broncodilatadora y antiasmática, muy positiva con fines terapéuticos. Sin embargo, parece que esta acción se contrarresta con la ejercida sobre los macrófagos pulmonares y células epiteliales, disminuyendo así las defensas antibacterianas naturales de la zona.

Además como efectos negativos que se pueden producir a largo plazo por un consumo crónico se encuentra la bronquitis crónica, laringitis catarral, irritación bronquial, ronquera e incluso cambios en la mucosa con metaplasia y alteraciones precancerosas.

II.6.4.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA REPRODUCTOR Y ENDOCRINO

Desde la antigüedad se ha relacionado la marihuana con el incremento de la actividad sexual. Este poder que se atribuye al *Cannabis* se justifica como consecuencia de su efecto desinhibitorio, apartándose de la mente del consumidor todos los tabúes.

Los cannabinoides están implicados en muchas de las alteraciones de la función sexual y de otras funciones endocrinas. Tanto el Δ^9 -THC como gran parte de sus análogos, tienen efectos sobre el sistema reproductor masculino y femenino.

En algunos casos existen controversias, pero la mayoría de los estudios muestran una disminución en la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), necesarias para la ovulación y el mantenimiento de la fase folicular; este efecto lo provoca el *Cannabis* por su acción sobre el hipotálamo. Respecto al descenso de los niveles plasmáticos de prolactina (PRL) tras el consumo o la administración de derivados cannabinoides, no se puede decir que sea debido a una inhibición directa sobre la glándula hipofisiaria (Mendelson *et al.*, 1984).

Es apreciable también la reducción en el tamaño de los testículos y la regresión de las células de Leydig, efectos que son revertidos por el tratamiento con andrógenos exógenos. Además, como consecuencia se puede producir, en consumidores crónicos, una oligospermia e incluso ginecomastia.

Por otro lado, se ha demostrado que el Δ^9 -THC es un potente estimulante de la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Sin embargo, los cannabinoides en general producen una disminución de los niveles de tiroxina y triyodotironina, pero este efecto no parece ser debido a su acción a nivel pituitario o tiroideo, ya que a la misma dosis no se altera el efecto de la hormona tiroidea (TRH).

11.6.5.- EFECTOS SOBRE SISTEMAS NEUROQUÍMICOS

Gran parte de los efectos que sobre el SNC producen los cannabinoides se pueden explicar por las alteraciones que son capaces de provocar sobre distintos sistemas neurotransmisores. Vamos a ir viendo qué ocurre con cada uno de ellos.

* Acetilcolina

El Δ^9 -THC y sus derivados disminuyen el recambio de acetilcolina al mismo tiempo que producen un incremento de su concentración en hipocampo, principalmente. Existe además una relación entre las dosis que originan este efecto y la aparición de alteraciones en el comportamiento. También se eleva en otras regiones, pero en menor grado, como en el cortex, estriado y protuberancia. El incremento de los niveles de acetilcolina no va acompañado de una inhibición del enzima acetilcolinesterasa. Este efecto se demostró recientemente en un estudio *in vitro* sobre órgano aislado, en concreto sobre conductos deferentes y plexos mesentéricos de cobaya (Pertwee *et al.*, 1992).

* Serotonina

La administración crónica de cannabinoides causa efectos bifásicos sobre la síntesis de este neurotransmisor: comienza con un incremento significativo del contenido cerebral de serotonina, concretamente, son el hipotálamo y el cerebelo las zonas más afectadas, observándose paralelamente, una depresión del comportamiento animal. Seguidamente, se produce una fase estimuladora, que se relaciona con una disminución de la serotonina en las respectivas áreas cerebrales (Dewey, 1986).

* Dopamina

La exposición aguda de Δ^9 -THC en animales de experimentación causa un descenso de las concentraciones cerebrales de dopamina; por el contrario, el tratamiento crónico, lleva consigo a un aumento de su recambio y síntesis. Respecto a la relación con el efecto sobre el comportamiento animal, hay que decir que, igualmente que lo que ocurría en el caso de la serotonina, se observa un efecto bifásico, pero a la inversa; el descenso del contenido

dopaminérgico cerebral se corresponde con un período de depresión, mientras que durante la fase estimuladora se detectan altos niveles de dopamina.

*** Adrenalina y noradrenalina**

Los efectos detectados sobre los sistemas adrenérgico y noradrenérgico son similares a los que se producen a nivel del dopaminérgico.

*** Gaba**

La interacción del sistema cannabinoide con el gabaérgico es un hecho ampliamente demostrado. Así, se produce un incremento de dicho neurotransmisor tras la administración del cannabinoide, y se ha demostrado además que el THC puede interactuar sinérgicamente con las benzodiazepinas, incrementando la potencia epileptógena del diazepam. Otras experiencias han establecido la existencia de sinergismo en la producción de catalepsia en ratón con dosis bajas de benzodiazepinas; dicho efecto no se observa con la administración de estos fármacos por sí solos (Pertwee y Greentree, 1988). Todos estos efectos se podrían explicar por la posible coexistencia de receptores gabaérgicos y de cannabinoides (Herkenham *et al.*, 1991).

II.6.6.- EFECTOS SOBRE LA INGESTA

En la literatura se encuentran bastante referencias anecdóticas a cerca de los efectos de la marihuana sobre el apetito. Los comentarios más frecuentes tienen relación con el aumento del deseo por los dulces. Sin embargo, muy pocos estudios científicos se han realizado hasta el momento que hagan referencia a la acción de los cannabinoides a este nivel. En el caso de la experimentación animal, se detecta una notable disminución en la ingesta de alimentos con la consecuente pérdida de peso.

II.6.7.- EFECTOS SOBRE LA TEMPERATURA CORPORAL

En el siglo pasado los extractos de *Cannabis* se utilizaban para bajar la fiebre antes de la introducción de la aspirina. La sensación de sofoco, seguido de escalofríos y enfriamiento

de las extremidades, se describió en muchas ocasiones tras el tratamiento con extractos de cáñamo.

El fumar marihuana a la "dosis habitual" produce efectos mínimos en la temperatura corporal como consecuencia de una ligera alteración del centro termorregulador. En el hombre, solamente dosis elevadas de Δ^9 -THC administradas por vía oral pueden inducir una caída de la temperatura corporal; esta hipotermia se ve favorecida si el individuo se encuentra en un ambiente frío (Formukong *et al.*, 1989). Sin embargo, el Δ^9 -THC produce hipotermia dosis dependiente en la mayoría de los animales de experimentación, siendo aún más potente en animales hipertérmicos que en eutérmicos.

Parece ser que estos compuestos producen hipotermia por actuar como depresor del SNC, concretamente sobre el centro termorregulador y tras el bloqueo de las prostaglandinas de la serie E.

II.6.8.- EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNITARIO

Está totalmente comprobado que el Δ^9 -THC, el principal componente de la marihuana, produzca inmunosupresión tanto en el hombre como en animales de experimentación. Aunque el efecto inhibitorio del THC sobre la respuesta inmunitaria, tanto humoral como mediada por células, se ha demostrado con numerosos ensayos, se conoce muy poco sobre el mecanismo de acción mediante el cual se produce dicha inhibición. Sin embargo, recientemente se ha caracterizado y clonado un receptor para los cannabinoides en macrófagos esplénicos, comprobándose además que se trata de un receptor diferente al cerebral, y que por lo tanto, parece ser que este receptor periférico podría intervenir en la regulación del sistema inmunitario (Munro *et al.*, 1993).

II.6.9.- EFECTOS SOBRE EL FETO Y EL RECIÉN NACIDO

La marihuana y sus derivados atraviesan libremente la placenta y pueden inducir efectos toxicológicos y teratológicos directamente sobre el feto, tras un uso crónico y a concentraciones elevadas.

En los estudios desarrollados por Wenger, administrando THC a ratas preñadas, se ha observado que las crías nacen con un peso menor, estando también disminuido el peso de las gónadas. Así mismo, se produce una disminución en el contenido del neuropéptido Y (NPY) en el hipotálamo. Con todo ello, tras la administración crónica de THC a dosis bajas durante el período gestacional, se produce una inhibición transitoria del desarrollo del eje hipotálamo-pituitario-gonadal, con los consiguientes cambios en el sistema neuroendocrino (Wenger *et al.*, 1991).

11.6.10.- POSIBLES USOS TERAPÉUTICOS

Durante muchos siglos, *Cannabis* se usó para paliar diferentes enfermedades, pero a principios del siglo pasado se produjo una verdadera explosión de su potencial terapéutico. Así se utilizaba en el tratamiento del tétanos, en los desórdenes convulsivos, en neurálgias, migrañas, dismenorrea, insomnio senil, depresión y gonorrea, así como en las adicciones al opio. También se usó para estimular el apetito y aliviar el dolor y la ansiedad en pacientes terminales de cáncer. Sin embargo, con la llegada de la farmacología moderna y el descubrimiento de muchos otros fármacos más efectivos en estas enfermedades, el entusiasmo por *Cannabis* como agente terapéutico fue disminuyendo progresivamente al comenzar el siglo XX.

Con el conocimiento de la estructura del principal componente activo de esta planta, el Δ^9 -THC, la industria farmacéutica y laboratorios comenzaron a investigar en la síntesis de compuestos derivados del THC con fines terapéuticos. No obstante el principal problema es separar los efectos farmacológicos deseados de los efectos psicoestimulantes de estos derivados.

* Uso en el glaucoma

El descubrimiento de la capacidad que posee el THC para disminuir la presión intraocular fue más o menos casual. En un estudio multiparamétrico realizado sobre fumadores crónicos de marihuana, tras la medida de la presión intraocular se observó una disminución del 45% en 9 de 11 individuos 30 minutos después de haber fumado (Hepler y Frank, 1971). Se han hecho muchos experimentos en conejos empleando distintas vías de administración, incluyendo la instilación en el ojo, que han confirmado este efecto y que ha resultado ser tan

potente y duradero como el de la pilocarpina. También se han probado otros cannabinoides, como el 8- α ó β -11-hidroxi- Δ^9 -THC o el CBN, que han mostrado el mismo efecto. Estos compuestos no poseen efectos sobre el SNC, lo cual supone un campo interesante en la aplicación terapéutica. En 1981 se administró por vía oral a pacientes con glaucoma un homólogo sintético del THC, el BW 146Y, pero por desgracia, la bajada de la presión intraocular fue acompañada de hipotensión ortostática y efectos subjetivos (Hollister, 1986).

* Antiasmático

Tanto el Δ^9 -THC como el Δ^8 -THC están provistos de efectos broncodilatadores, mientras que el CBD y CBN carecen de esta propiedad. No se han encontrado evidencias de tolerancia a este efecto tras una administración continuada durante 20 días, pero el tratamiento del asma es mucho más crónico, por ello hay que seguir realizando estudios sobre este aspecto. El THC debe ser administrado mediante aerosol para que sea eficaz como antiasmático; su mecanismo de acción aún no está claramente establecido, pero no debe ser estimulación β adrenérgica. Actualmente se siguen ensayando análogos eficaces en este sentido pero exentos de efectos psicoactivos.

* Anticonvulsivante

Uno de los primeros usos terapéuticos de *Cannabis* a finales del pasado siglo fue precisamente para combatir los ataques convulsivos en el hombre. Estudios posteriores realizados sobre diferentes especies animales mediante técnicas de electroshock han confirmado esta acción. El metabolito del Δ^9 -THC, 11-OH- Δ^9 -THC, y el análogo sintético, dimetilheptilpirano (DMHP), son más potentes que el compuesto primario. Aunque no se conoce claramente el mecanismo de acción por el cual los cannabinoides producen este efecto, parece ser que deprimen la transmisión neuronal entre la corteza cerebral y la médula espinal. También se ha podido observar que el CBD ha resultado ser más potente anticonvulsivante que el THC y que ambos compuestos, administrados conjuntamente potencian dicho efecto. El hecho de que el CBD no manifieste efectos psicoactivos marcados y su actividad anticonvulsivante, hace que las investigaciones se dirijan por este camino (Martin, 1986).

* Acción antiemética

A principios de los años 70 se pudo comprobar que los pacientes con terapia anticancerosa presentaban menos síntomas de vómitos y náuseas sin previamente haber fumado marihuana. Pocos años después se ensayó la administración de THC a pacientes que estaban recibiendo cisplatino, obteniéndose una acción antiemética superior a la de la clorperazina, siendo más efectivo en pacientes jóvenes que en ancianos. Sin embargo en ensayos clínicos posteriores, muchos de los pacientes tratados con THC experimentaron efectos psicoestimulantes, así como sedación, somnolencia, hipotensión ortostática, visión borrosa, disforia y confusión mental. Debido al desarrollo de estos síntomas centrales, se sintetizó un derivado del Δ^9 -THC, la Nabilona, el cual parecía tener un gran margen entre su acción antiemética y los efectos eufóricos. La Nabilona resultó ser más efectiva como antiemético que la proclorperazina, pero no estaba exenta de efectos secundarios que incluían sequedad de boca, alteraciones en la coordinación, una ligera bajada de la presión arterial y mareos. El Levonantradol y el BRL 4664 son también otros dos derivados sintéticos del THC que muestran efecto antiemético sin efectos colaterales salvo por la disforia.

El posible mecanismo de acción por el cual *Cannabis* evita la emesis no está bien establecido. Muchas son las hipótesis que intentan explicarlo, basándose la mayoría de ellas en la interacción de los cannabinoides con otros sistemas neuroquímicos que actúan sobre el centro del vómito.

* Actividad analgésica

Marihuana, hashish y otras preparaciones del *Cannabis* se han usado a través de los siglos para aliviar el dolor. Desde finales de los años 60 muchos son los ensayos farmacológicos que se hicieron al respecto, mostrándose una gran variabilidad de resultados que ponían en entredicho la acción analgésica de esta droga; incluso pruebas realizadas en grupos de personas voluntarias no reflejaron efecto analgésico sino todo lo contrario (Hill *et al.*, 1973). Sin embargo, precisamente estudiando la potencia analgésica de distintos compuestos cannabinéticos no clásicos que inhibían la adenilato ciclasa, se propuso por primera vez un modelo del receptor cannabinoide (Howlett *et al.*, 1987).

Las drogas antinociceptivas pueden producir sus efectos bloqueando las señales de sensación de dolor en centros específicos del cerebro, interrumpiendo la transmisión ascendente a nivel de la médula espinal, o bien en ambos niveles, supraespinal y espinal. Pues bien, tras la administración de Δ^9 -THC y el potente cannabinoide sintético CP-55'940, por vía endovenosa e intratecal a ratas intactas y ratas espinalizadas, se ha comprobado que los cannabinoides ejercen su efecto antinociceptivo tanto a nivel espinal como supraespinal (Lichtman y Martin, 1991). Los sitios de unión para los cannabinoides en la médula espinal se encuentran en la sustancia gelatinosa, que es un área implicada en la transmisión de las señales de nocicepción (Herkenham *et al.*, 1990).

El efecto antinociceptivo depende en gran medida de la vía de administración del Δ^9 -THC, siendo las vías endovenosa e intratecal las que reflejan una mayor potencia analgésica, y la subcutánea e intraperitoneal, las rutas de administración menos eficaces (Smith y Martin, 1992). Otro factor fundamental es el estructural observándose una estrecha relación entre la actividad analgésica y la estereoselectividad (Martin, 1985).

Por otro lado, actualmente se están realizando numerosos estudios para intentar desvelar la posible interacción del sistema opioide con el sistema cannabinoide. Así, se ha demostrado que el efecto analgésico de la morfina administrada por vía intratecal (i.t.) se potencia con el pretratamiento de cannabinoides (Welch y Stevens, 1992). Saber si los cannabinoides y los opioides actúan en sitios de unión distintos o similares es algo que todavía está por determinar. Puede ser que la interacción de ambos sistemas se produzca por efecto modulador de los cannabinoides sobre el sistema opioide (Vaysse *et al.*, 1987), o bien por que ambos actúen activando sistemas de neuroefectores en la célula; lo cierto es que existen importantes evidencias que muestran una vez más la complicación del sistema cannabinoide.

* Acción antiinflamatoria

Existe una considerable discrepancia entre los distintos autores sobre el efecto que producen los cannabinoides a este nivel. Algunos estudios realizados en los años 70 han demostrado que el Δ^9 -THC es unas veinte veces más potente que la aspirina y aproximadamente el doble que la hidrocortisona en el test del edema inducido por carragenina en ratas. Otros autores por el contrario niegan que *Cannabis* posea dicha acción como lo han demostrado sus experimentos. Parece ser que la diferencia entre los resultados de unos y otros

estriba en la vía de administración y el vehículo empleado. Sin embargo, en 1986 Evans *et al.*, demostraron la implicación de algunos componentes del *Cannabis* en los enzimas que intervienen en la cascada del ácido araquidónico, inhibiendo la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa, y estimulando la fosfolipasa A₂, con lo que se demuestra la acción antiinflamatoria de dichos componentes.

* Tratamiento en los espasmos musculares

Antiguamente los enfermos con problemas en la espina dorsal trataban los espasmos musculares fumando *Cannabis*. Efectivamente, la acción relajante muscular y antiespasmódica del THC fue confirmada por un experimento en 1980 en el que se administró THC (5-10 mg) por vía oral a pacientes que sufrían esclerosis múltiple (Petro y Ellenberger, 1981). Sin embargo, se necesita tener más resultados clínicos que muestren la efectividad y ausencia de efectos secundarios de dichos compuestos.

* Acción sedante

Las preparaciones de *Cannabis*, administradas por vía oral a dosis mucho más bajas que a las que produce efectos psicoactivos, producen un efecto sedante y tranquilizante que va acompañado por una disminución de la ansiedad. Es más, el efecto sedante es el más característico de todos los efectos que producen los cannabinoides, y concretamente el THC y especialmente el CBD, en los ensayos clínicos. El uso prolongado de marihuana a dosis bajas produce una reducción de la ansiedad, pero el consumo de dosis masivas produce una situación de pánico ansioso por un mecanismo desconocido. Los ensayos de experimentación animal muestran resultados muy diferentes, en función del tipo de especie utilizado. Se han propuesto tanto mecanismos centrales como interacción con las prostaglandinas para explicar la acción ansiolítica de estos compuestos (Formukong *et al.*, 1989).

Recientemente, el grupo de Guimaraes y Mechoulam, ha demostrado que el principal cannabinoide con propiedades ansiolíticas es el CBD, y que la modificación de su estructura puede potenciar dicho efecto, como se observa tras la administración de su derivado sintético HU-219 (Guimaraes *et al.*, 1994). Un futuro terapéutico para el tratamiento de la ansiedad aparece con estos derivados del CBD que han demostrado poseer un potente perfil ansiolítico en los ensayos preliminares.

* Otras acciones terapéuticas

Derivadas de los distintos efectos que los cannabinoides y sus análogos sintéticos son capaces de producir sobre los diferentes sistemas del organismo, tenemos la siguiente relación de aplicaciones que han sido demostradas *in vitro* e *in vivo*:

- Acción antihipertensiva
- Acción antibacteriana
- Acción antineoplásica
- Uso en migraña
- Posible uso para combatir el insomnio
- Estimulantes del apetito.

El mayor problema en la búsqueda de agentes terapéuticos derivados del *Cannabis*, es la consecución de compuestos que tengan acciones terapéuticas a dosis menores que las que producen efectos adversos. Por otra parte, la elevada liposolubilidad de estos compuestos les permite distribuirse por el SNC a dosis razonables; por ello, hasta que no se consiga una apropiada selectividad farmacológica, la terapia con cannabinoides seguirá siendo muy restringida.

II.6.11.- TOLERANCIA

Como es sabido, la tolerancia es un estado de adaptación caracterizado por disminución de la respuesta a la misma cantidad de una droga determinada (Eddy, 1965).

Desde principios de los años 60 se empiezan a hacer ensayos sobre animales de experimentación para probar que el consumo continuado de *Cannabis* produce tolerancia. Estos estudios demostraron la rápida aparición de tolerancia en ratas, ratones y palomos; es más, se produce tolerancia sobre cada uno de los efectos farmacológicos que produce dicha droga, estudiados independientemente. Una de las características de la tolerancia desarrollada con los cannabinoides, que se opone a la tolerancia demostrada para los opiáceos y otros compuestos, es la larga duración de dicha tolerancia después de cesar la administración.

Entre los estudios realizados sobre humanos para ver la tolerancia de esta droga, destacamos los realizados por Jones y Benowitz sobre un grupo de 12 hombres voluntarios y normales, durante un período de 30 días, que ingerían 210 mg/día de Δ^9 -THC. Jones encontró que los sujetos eran tolerantes a los efectos subjetivos y al incremento del pulso, normalmente asociado al hábito de fumar marihuana. Sorprendentemente, a pesar de las grandes dosis de THC empleadas, no encontró efectos subjetivos psicodélicos y observó una relativa bradicardia durante el curso de la administración crónica de THC. Además, demuestra un ligero grado de dependencia física y síndrome de abstinencia, pues dentro de las 6 horas siguientes a la retirada súbita de la droga, se produjo un aumento en la actividad, irritabilidad, insomnio e inquietud.

II.6.12.- DEPENDENCIA

Entre muchos médicos y psicólogos se ha extendido el error de que la *habituación, en el sentido de dependencia física combinada con síntomas de abstinencia*, es el principal criterio por el que debe valorarse el daño potencial de una droga para el individuo. Hay una línea divisoria muy sutil entre la dependencia física y la psíquica. La función psicológica tiene también bases fisiológicas y bioquímicas; el deseo de satisfacción inmediata es un poderoso factor de refuerzo psicológico. Por otro lado, no se desarrolla dependencia física con estimulantes del SNC como la cocaína, que se sabe que provoca en el individuo uno de los tipos más esclavizadores de farmacodependencia. La dependencia de una droga no depende, por tanto, sólo de la capacidad de ésta para producir síntomas de abstinencia. La farmacodependencia obedece fundamentalmente a la interacción entre un sujeto y una molécula biológicamente activa que provoca placer y el posterior deseo creciente de refuerzo repetido. Esta interacción lleva a un comportamiento de búsqueda de la droga o dependencia en el comportamiento. Sobre esta base, resulta engañoso clasificar la marihuana como una droga *blanda* que no crea dependencia.

Aunque en los consumidores de *Cannabis* se desarrolla tolerancia, no aparece ninguna dependencia física significativa que se pueda identificar por síntomas de abstinencia análogos a los que presenta la heroína y el alcohol. Los síntomas observados tras la interrupción del consumo intenso son relativamente leves; la pérdida de apetito, el insomnio y la irritabilidad son bien tolerados, pero está comprobado que el *Cannabis* puede crear un estado de

dependencia fisiológica o en el comportamiento, que constituye un importante obstáculo para la supresión del consumo.

En el hombre no se han demostrado signos fuertes de abstinencia, pero sí se han realizado numerosos estudios en experimentación animal que reflejan la existencia de una dependencia física en aquellos animales tratados crónicamente con extractos de *Cannabis sativa* (Singh *et al.*, 1981).

II.6.13.- EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

* Efectos sobre la conducta de los animales

La administración aguda de THC o del extracto de marihuana, produce en la mayoría de las especies animales, catalepsia y adopción de posturas anormales del cuerpo, hipersensibilidad, ataxia y algunas veces hiperactividad. Se produce además una supresión de la actividad motora espontánea y de la exploración. Uno de los efectos predominantes en la conducta, en ratón, es un fenómeno de *detección postural con mirada fija*; en este estado, los ratones responden más a los estímulos, que en otras condiciones (Hollister, 1971).

Holtzman y su equipo, describieron una disminución de la actividad espontánea, moderada hipotermia, hipersensibilidad a los estímulos táctiles y auditivos, y ataxia después de dosis bajas de THC (1 a 10 mg/kg, en ratón). Tras la administración de dosis mayores (200-500 mg/kg), se observó sedación, hipotermia pronunciada y una marcada disminución de la actividad espontánea y reactividad (Holtzman *et al.*, 1969). Por otro lado, se pudo comprobar que la habituación previa a la situación experimental, puede reducir marcadamente, o disminuir, los efectos del THC sobre la actividad motora. En general, los cannabinoides disminuyen o suprimen la agresividad en animales en condiciones normales; por el contrario, la agresividad se incrementa cuando el animal es sometido previamente a una situación de estrés. Estos autores intentaron correlacionar los cambios en la conducta de los ratones con alteraciones en la concentración de noradrenalina y serotonina. Así, dosis bajas de THC fueron asociadas a una disminución de noradrenalina en cerebro, mientras que las altas se asociaron con un incremento de dicho neurotransmisor. Las concentraciones de serotonina se incrementaron después de la administración de THC de forma dosis dependiente. La duración de los efectos sobre la temperatura corporal y la actividad espontánea, se relacionaron con los cambios en las aminas cerebrales.

11.7.- DOSIS LETAL 50 (DL₅₀)

La DL₅₀ expresa la toxicidad aguda de un producto, al indicar la dosis que mataría al 50% de la población en estudio cuando se administra por una vía específica. Por ello, siempre debe referirse a un animal de experimentación y a una vía de administración en concreto.

Son numerosos los métodos propuestos para la determinación de la DL₅₀, pero todos mantienen una línea similar en el desarrollo de la experiencia. Nosotros hemos optado por el método propuesto por Reed y Muench en 1938. Consiste en administrar dosis crecientes del producto en estudio, siguiendo una progresión geométrica de razón 2, partiendo de la dosis máxima que no mata a ningún ratón (DL₀) hasta llegar a la dosis que mata a todos (DL₁₀₀).

Se establecen lotes de 10 ratones de peso conocido y homogéneo. El producto es administrado por vía intraperitoneal (i.p.) y se valoran las muertes que ocurran antes de las 72h siguientes a la administración. Se trata de una respuesta *del todo o nada*, es decir, el ratón muere o no muere. Paralelamente se establece un lote control al que se le administra únicamente el vehículo donde va disuelto el producto en estudio.

Estos autores establecen las siguientes premisas:

- Si un animal muere cuando se le administró una determinada dosis del producto en estudio, hubiera muerto también si perteneciera a otro lote de animales a los que se les administra una dosis mayor.
- Si un animal sobrevive a una dosis determinada, hubiera sobrevivido también en otro lote al que se le administra una dosis menor.

Una vez anotado el número de animales vivos y muertos por cada grupo, se realiza el cálculo acumulativo de vivos y muertos para las distintas dosis ensayadas. Tras acumular los animales vivos de dosis mayor a menor (abajo-arriba) y los muertos en sentido opuesto (arriba-abajo), se calcula el % de mortalidad de cada línea. Posteriormente, se construyen unos ejes de coordenadas colocando dosis en abscisas y número de animales en ordenadas. Se representan dos líneas, una de ellas correspondiente a los animales vivos acumulados y la otra a los muertos acumulados; las líneas se cortan en un punto. Se traza una perpendicular desde la intersección hacia el eje de abscisas; el punto de corte con éste corresponde a la DL₅₀.

II.8.- TESTS FARMACOLÓGICOS PARA EL ESTUDIO DE LOS CANNABINOIDES

Δ⁹-THC produce una característica respuesta psicotrópica en los hombres y una gran variedad de alteraciones comportamentales específicas en los animales de experimentación (Compton *et al.*, 1991).

Para el estudio farmacológico de los cannabinoides se han escogido, debido al complejo espectro de efectos que poseen dichos compuestos, una serie de pruebas experimentales que permiten reconocer una sustancia como cannabimimética siempre y cuando cumpla con el patrón farmacológico establecido.

Presentamos aquí, de una forma somera, los ensayos farmacológicos más habituales recogidos en la literatura científica encaminados a conocer algo más a cerca de los efectos producidos tras el consumo de la marihuana, así como para el desarrollo de derivados sintéticos con fines terapéuticos.

Entre los test farmacológicos más utilizados en los últimos años y realizados sobre animal entero, caben destacar los siguientes:

- * Ataxia estática en perros.
- * Alteración del comportamiento en monos.
- * Acción anticonvulsivante, en ratas.
- * Estímulo discriminativo, en ratas.
- * Y un espectro de respuestas farmacológicas en ratón, que es único para este tipo de drogas, y que comprende:
 - Hipotermia
 - Catalepsia
 - Actividad locomotriz.
 - Analgesia
 - Hiperexcitabilidad e hiperreflexia.

Para nuestro estudio hemos escogido las pruebas que se realizan sobre ratón por ser un animal de fácil manejo y que aportan información suficiente. Cada uno de ellos será desarrollado en el apartado MATERIALES Y MÉTODOS del presente estudio.

PARTE EXPERIMENTAL

"... para los consumidores, un euforizante;..."

PARTE EXPERIENTAL

La parte experimental de este trabajo, se basa en la determinación de los efectos farmacológicos de diversas muestras de resina de *Cannabis*, que presentan diferente grado de madurez y por lo tanto diferente composición, con el fin de evaluar la importancia de los cannabinoides en dichos efectos. El estudio comienza con la determinación de la DL_{50} y análisis anatómo-patológico de los órganos afectados tras la intoxicación; se continua con la comparación de efectos entre la resina entera y los diferentes cannabinoides puros, empleados como patrones, así como con un estudio de potenciación-inhibición de efecto tras la administración conjunta de dichos principios activos.

A continuación pasamos a desarrollar cada uno de los bloques en los que se divide el trabajo experimental de esta Tesis Doctoral. En cada uno de ellos aparecen los materiales y los distintos métodos empleados, así como los resultados obtenidos y una discusión de los mismos.

III.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los animales utilizados en los diferentes experimentos fueron ratones (*Mus musculus*) hembras de la cepa OF-1, con un peso medio de 25 ± 3 g, y separados en lotes de ocho animales de peso homogéneo. Dichos animales permanecieron desde 24 horas antes del experimento hasta su conclusión, en condiciones constantes de fotoperiodo (luz entre las 8:00 y 20:00 horas), temperatura (23 ± 1 °C), aislados de todo ruido y perturbación ambiental y con acceso a comida estándar (PANLAB) y agua *ad libitum*.

III.2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y TRATAMIENTOS

Tanto el *hashish* como los patrones puros de Δ^9 -THC, CBD y CBN, fueron proporcionadas por el Servicio de Restricción de Estupefacientes y Psicótrpos (Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios; Ministerio de Sanidad y consumo de Madrid).

El decomiso proporcionado incluía un análisis cuali y cuantitativo de los tres cannabinoides que nos interesaban para nuestro estudio, realizado mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución.

Para el análisis farmacológico escogimos el empleo de la resina de *Cannabis* (*hashish*) y no de la planta entera (*marihuana*), por ser la primera más rica en cannabinoides y ser realmente el producto de *Cannabis* más empleado por los consumidores. Se utilizan por tanto, diferentes muestras de resina de *Cannabis*, con una composición en cannabinoides muy diferente entre ellas y que a continuación se detalla en la siguiente tabla:

Nº MUESTRA	THC (g%)	TTC (g%)	CBN (g%)
241/1	3,578	8,028	0,817
241/2	6,690	13,701	1,272
261	5,107	8,804	1,010
291	7,913	6,065	1,683
453/11	7,733	13,951	1,011
475	7,803	5,295	1,468
588	3,141	9,150	0,873
642	0,615	0,745	0,242
778	2,838	2,355	2,187

Para simplificar el número de muestras, de las aquí recogidas se emplearon, en los distintos experimentos, siete de ellas, que fueron escogidas en función de su composición. Las dos restantes se despreciaron, bien por la escasez del producto, o bien por poseer Características muy similares a alguna de las seleccionadas. Además empleando la fórmula del "Fenotipo" propuesta por Girlié, podemos clasificar dichas muestras en "resinas de tipo droga", o "resinas de tipo textil"; cuando el cociente sea >1 , se incluirá la muestra dentro del fenotipo I (tipo droga); cuando el cociente sea <1 , pertenecerá al fenotipo II (tipo textil).

$$\text{Fenotipo} = \frac{\Delta^9\text{-THC} + \text{CBN}}{\text{CBD}}$$

En función de todo esto, la clasificación quedaría como sigue:

Nº MUESTRA	COCIENTE	FENOTIPO (TIPO)
241-1	2,47	I ("DROGA")
241-2	2,24	I ("DROGA")
261	1,92	I ("DROGA")
291	0,98	II ("TEXTIL")
452-11	1,93	I ("DROGA")
475	0,87	II ("TEXTIL")
588	3,19	I ("DROGA")
642	1,60	I ("DROGA")
778	1,60	I ("DROGA")

Así mismo, queriendo observar el efecto global que produce la resina entera, decidimos administrarla en bruto, tal cual, sin someterla a una extracción anterior. Para ello, las muestras finamente pulverizadas y pesadas en función de la dosis, se resuspende, con un volumen determinado, en el vehículo adecuado. En este caso, hemos escogido el aceite de sésamo (SIGMA), por su carácter inocuo y ser uno de los vehículos más recomendados para la disolución-suspensión de sustancias muy lipófilas.

Los patrones, es decir, Δ^9 -THC, CBD y CBN, el día de su administración fueron disueltos en el mismo vehículo con el fin de guardar las mismas características de tratamiento.

La droga fue administrada a los animales por vía intraperitoneal (i.p.), a las diferentes dosis ensayadas en cada uno de los experimentos que detallaremos más adelante, en un volumen siempre fijo de vehículo (aceite de sésamo) de 0,2 ml, y sirviéndonos de agujas de 23G que hacen más fácil la administración de suspensiones. Para cada dosis, se establecen dos lotes de ocho ratones, en las pruebas de la batería farmacológica de cannabinoides. Para la determinación de la DI_{50} , se forman lotes de diez animales, como se describe en el método.

Paralelamente en todos los casos, se establece un lote control al que se le administra únicamente el vehículo aceite de sésamo (0,2 ml).

III.3.- DOSIS LETAL 50

III.3.1.- MATERIALES Y MÉTODOS

La DL_{50} expresa la toxicidad aguda de un producto, al indicar la dosis que mataría al 50% de la población en estudio cuando se administra por una vía específica.

Como ya comentamos anteriormente, hemos escogidos el método propuesto por **Reed** y **Muench** para la determinación de la DL_{50} . En el apartado correspondiente de la REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA se describe detalladamente la técnica.

Debido a la gran variedad en la composición de las diferentes muestras a estudiar, decidimos realizar la determinación de la DL_{50} de tres muestras de resina, que poseyeran diferente composición en cannabinoides. La escasa cantidad de resina disponible hizo imposible la determinación de la DL_{50} de cada una de las muestras que luego iban a ser ensayadas, escogiéndose por ello, tres muestras diferentes que fueran lo suficientemente representativas, con una proporción de cannabinoides muy baja, intermedia-alta y muy alta, obteniéndose así, una gran información acerca de la toxicidad aguda del *Cannabis*.

III.3.2.- RESULTADOS

* RESINA 642

Presenta en su composición un 0,745% de THC, 0,615% de CBD y 0,242% de CBN. Esta muestra fue escogida por su baja proporción en cannabinoides.

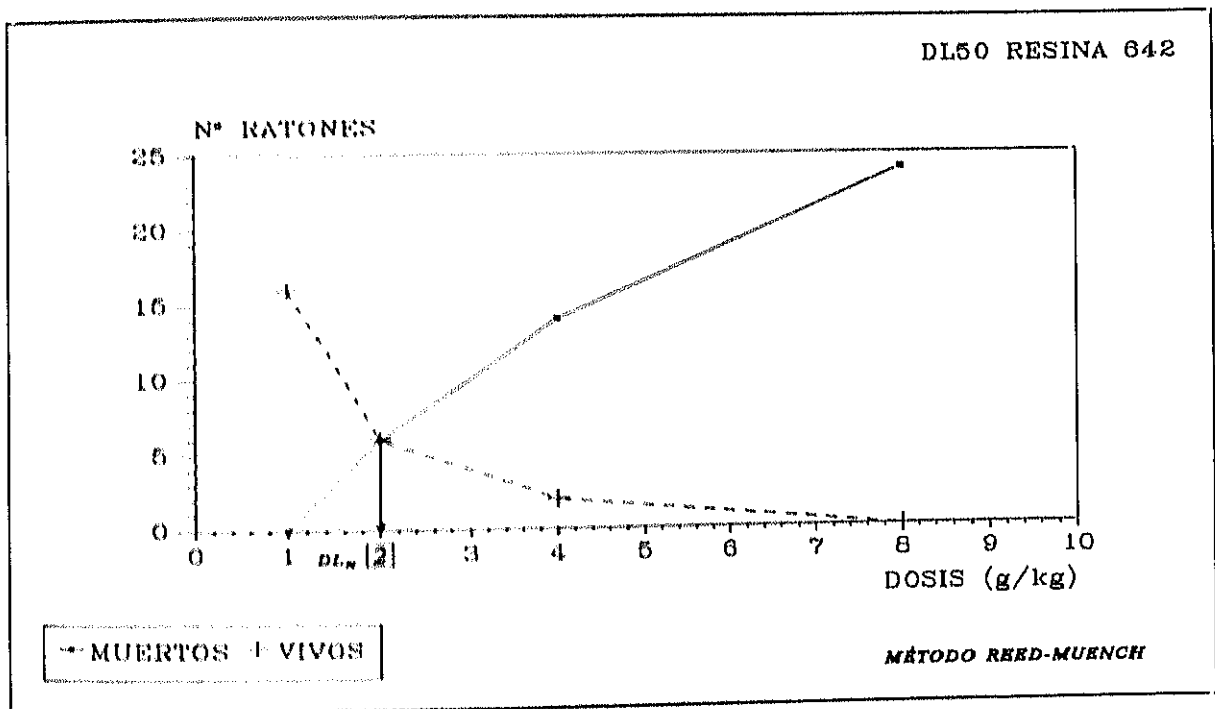
Después de varias pruebas, se consiguió establecer la dosis máxima que no mata a ningún animal ($DL_{0}=1\text{g/kg}$). A partir de ésta, se administran dosis crecientes que siguen una progresión geométrica de 2, hasta alcanzar aquella dosis que mata a todos los animales del lote ($DL_{100}=8\text{g/kg}$).

Por tanto, empleamos 4 lotes de 10 animales, a los que se les administró, respectivamente, 4 dosis distintas, y que fueron 1, 2, 4 y 8g/kg. Además, como lote control, se establece un quinto grupo de animales que únicamente recibió aceite de sésamo

(0,2ml/ratón); tras la experiencia pudimos comprobar la ausencia de toxicidad del aceite de sésamo. En la siguiente tabla aparecen reflejados los resultados obtenidos:

DOSIS g/kg	N°	M	V	MUERTOS ACUMULADOS	VIVOS ACUMULADOS	TOTAL LÍNEA	% MORTALIDAD
1	10	0	10	0	16	16	0
2	10	6	4	6	6	12	50
4	10	8	2	14	2	16	87,5
8	10	10	0	24	0	24	100

M-MUERTOS
V-VIVOS



En la gráfica podemos apreciar que la DL_{50} en este caso es de 2g/kg.

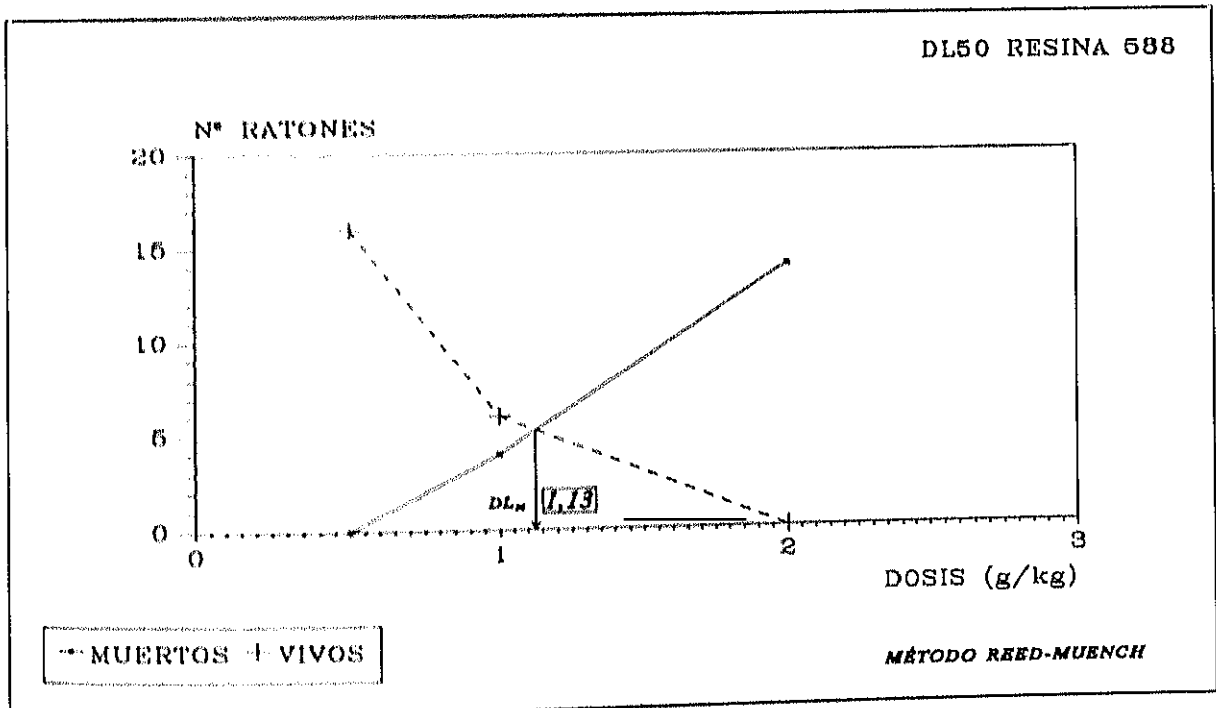
* RESINA 588

Esta resina presenta un 9,150% de THC, 3,141% de CBD y un 0,873% de CBN. Consideramos dicha muestra por poseer una proporción considerable de los principios activos.

Se estableció como DL_{50} 0,5g/kg y DL_{100} 2g/kg. Por tanto, en este caso distribuimos los animales en tres lotes, a los que se les administró 0,5; 1 y 2g/kg respectivamente. Los resultados, se representan a continuación:

DOSIS g/kg	Nº	M	V	MUERTOS ACUMULADOS	VIVOS ACUMULADOS	TOTAL LÍNEA	% MORTALIDAD
0,5	10	0	10	0	16	16	0
1	10	4	6	4	6	10	40
2	10	10	0	14	0	14	100

M=MUERTOS
V=VIVOS



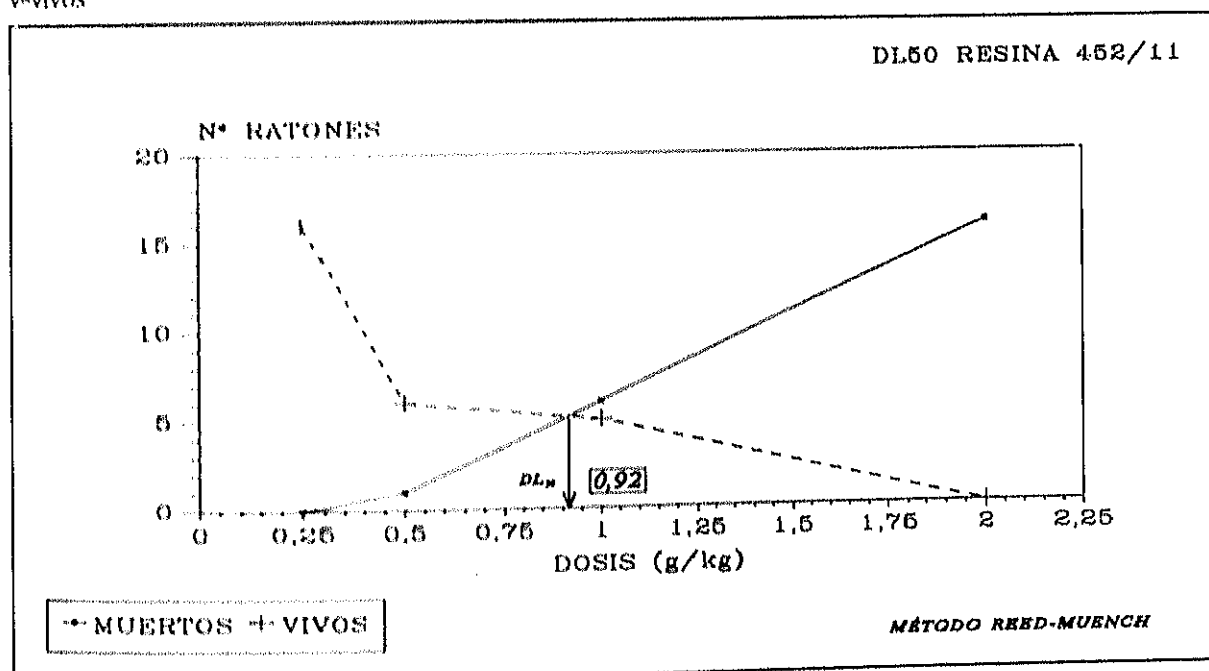
En este caso la DL_{50} resulta ser 1,13 g/kg.

* RESINA 452/11

Por último, la tercera muestra escogida presentaba una gran riqueza de THC 13,951% al mismo tiempo que una considerable cantidad de CBD (7,733%) y un 1,011% de CBN. De la misma manera se determinó la máxima dosis a la cual ningún animal muere, siendo en este caso de 0,25g/kg, y 2g/kg la dosis a la que mueren todos. Así, establecimos cuatro lotes de diez animales cada uno, a los que se les administró respectivamente 0,25; 5,0; 1 y 2g/kg. En este caso los resultados fueron los siguientes:

DOSIS g/kg	Nº	M	V	MUERTOS ACUMULADOS	VIVOS ACUMULADOS	TOTAL LÍNEA	% MORTALIDAD
0,25	10	0	10	0	16	16	0
0,5	10	1	9	1	6	7	14,3
1	10	5	5	6	5	11	54,5
2	10	10	0	16	0	16	100

M-MUERTOS
V-VIVOS



Por último, la gráfica refleja que la DL₅₀ es 0,92g/kg.

III.3.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En todos los casos se demuestra la inocuidad del vehículo empleado (aceite de sésamo), al menos en la concentración utilizada.

Vistos los resultados de la determinación de la DL_{50} para las tres resinas diferentes, podemos observar que la dosis letal 50 disminuye a medida que aumenta la proporción de THC presente en la resina, como era de esperar por ser éste el principal responsable de los efectos que produce la resina de *Cannabis*. Así, para la resina 642, con una proporción casi nula de THC (0,745%), la DL_{50} es elevadísima (2g/kg), debiéndose su toxicidad principalmente a la propia resina y no al THC. La muestra n° 588, con una proporción considerable del principio activo (9,150%), nos proporciona ya una DL_{50} de 1,13g/kg. Por último, refiriéndonos a la resina 452/11, que posee una altísima cantidad de Tetrahidrocannabinol (13,951%), el resultado de la DL_{50} es de 0,92g/kg, demostrándose que el THC no es sólo el principal responsable de los efectos del *hashish*, sino también de su potencial tóxico. No obstante, debemos señalar que pese a la elevada proporción de THC presente en la resina, podemos considerar dicha droga como atóxica en cuanto a la letalidad que produce (observando las DL_{50}), lo cual no indica que no sea nociva para la salud.

III.4.- ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO

III.4.1.- MATERIALES Y MÉTODOS

Para completar el estudio de la toxicidad aguda producida por la administración de las diferentes resinas, decidimos recoger algún animal de los que morían durante la realización del experimento de determinación de la DL_{50} ; inmediatamente después de su muerte, se abrieron por la cavidad abdominal y se introdujeron en formol neutro (solución de formaldehído al 10%, llevada a saturación con carbonato magnésico), para su posterior análisis anatomopatológico, con el fin de conocer los órganos afectados por la intoxicación, y la causa de su muerte.

Por otro lado, con el ánimo de estudiar la evolución de dicha intoxicación, nos propusimos analizar los órganos de los animales tratados con una dosis determinada, y provocar su muerte en determinados periodos de tiempo post-administración. Tras el análisis de los resultados obtenidos en la determinación de la DL_{50} , la dosis escogida fue la de 1g/kg de resina n° 588, por provocar ésta la muerte de un bajo número de animales dentro del periodo de tiempo establecido para el estudio. Los animales se sacrificaron a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas tras la administración, y fueron introducidos en formol neutro para su posterior análisis. En paralelo se realiza también el estudio patológico de animales control, tratados exclusivamente con aceite de sésamo (0,2 ml; i.p.) y animales sin tratamiento.

Debido a la liposolubilidad de la resina de *hashish* y de sus componentes, los órganos vitales de nuestro interés son: cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñón, suprarrenales y ovario.

El estudio completo fue realizado según la técnica montada en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Provincial de Ávila. Esquemáticamente, dicha técnica consta de los siguientes pasos:

- 1.- Fijación. (Formol neutro al 10%)
- 2.- Autopsia. (Selección de órganos y estudio macroscópico).

- Inclusión en parafina.

Esta etapa se realiza mediante un Procesador de Tejidos para inclusión (Tissue Teck de AMES), y consta de las etapas siguientes:

- a.- Deshidratación, empleando una escala creciente de alcoholes, desde alcohol de 70 hasta 100.
- b.- Aclarado, con Histolemon[®].
- c.- Parafina.

- Formación de bloques de parafina.

Este proceso se realiza sobre una Consola Histológica (Tissue Teck II AMES).

- Microtomía.

Se obtienen cortes (entre 5 y 7 μ) de los tejidos escogidos, mediante el empleo de un microtomo rotatorio (LEITZ 1512).

- Tinción histológica (Técnica Hematoxilina-Eosina).

Los cortes se recogen sobre portaobjetos recubiertos de albúmina glicerinizada, para perfecta adhesión, y se someten a los siguientes pasos para su tinción:

- a.- Desparafinización (Histolemon[®]).
- b.- Rehidratación, con escala creciente de alcoholes, hasta agua.
- c.- Hematoxilina de Czazsi. De 7 a 10 minutos.
- d.- Agua corriente.
- e.- Eosina. De 1 a 2 minutos.
- f.- Deshidratación en escala creciente de alcoholes.
- g.- Tras dos pasos de Histolemon[®], se montan los cortes con cubre objetos empleando resina Eukitt[®].

- Microscopía.

Para la observación microscópica de los cortes realizados empleamos un microscopio óptico de campo claro (NIKON HFX), que permite fotografiar los cortes de los tejidos seleccionados.

4.2.- RESULTADOS

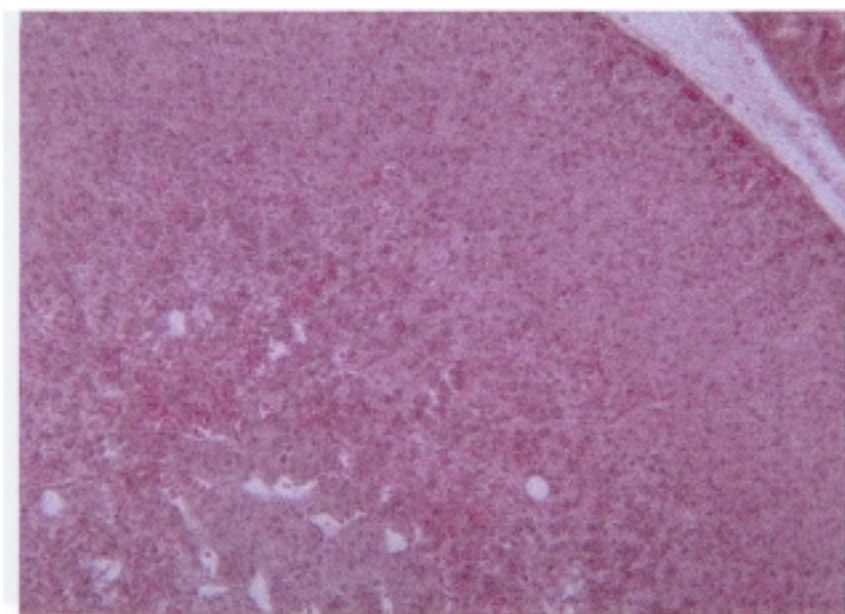
Con técnicas de inclusión en parafina se obtuvieron cortes histológicos de cerebro, pulmón, corazón, hígado, riñón, suprarrenales y ovario, que posteriormente se tiñeron con ematoxilina-Eosina.

El estudio histológico de los órganos, mostró una congestión en todos ellos, siendo éste único signo común (Microfotografía 1, 2 y 3). A nivel cerebral, renal, suprarrenal y de ovario es el único signo patológico, sin que exista relación con el tiempo de evolución.

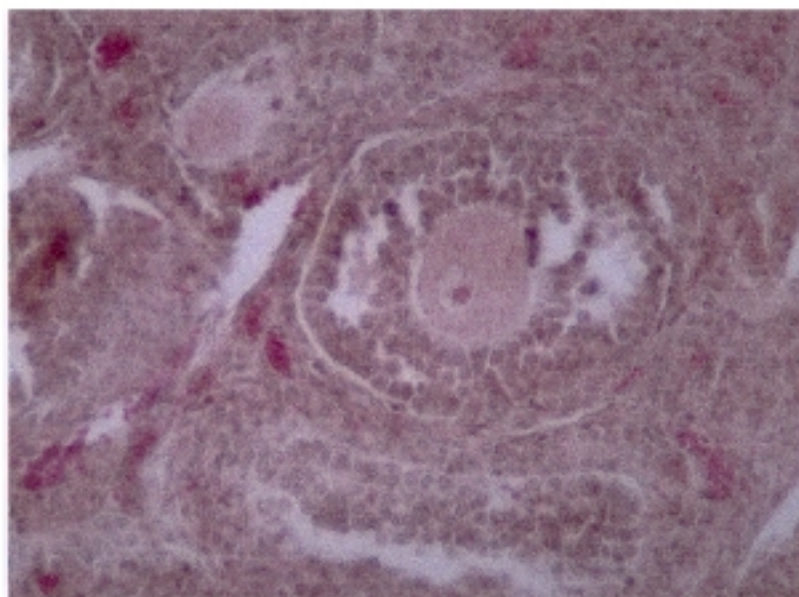
Los pulmones presentan congestión desde el primer momento del estudio (6 horas). Más tarde, y hasta el momento de su muerte, las lesiones aumentan cuali y cuantitativamente, presentando en primer lugar edema, que generalmente es de tipo focal y limitándose a pequeñas áreas difusamente repartidas. A lo largo de la evolución estas zonas pueden ser algo más importantes, pero en ningún momento se constituye como un edema pulmonar masivo (Microfotografía 4). A los fenómenos de edema descritos, se suman más tarde hemorragias intra-alveolares ocasionales.

En el hígado, a las 6 horas del tratamiento, se observan junto con la congestión ya citada, una hiperplasia discreta de las células de *Kupffer* y moderado pleomorfismo hepatocitario que también se aprecia a nivel nuclear. Es frecuente la presencia de células multinucleadas y ocasional, la de alguna mitosis (Microfotografía 5). Las alteraciones más significativas ocurren a nivel citoplasmático, observándose focos de edema intracelular (enfucación turbia) (Microfotografía 6) y de degeneración "plumosa" compatible con hipertrofia e hiperplasia mitocondrial (Microfotografía 7).

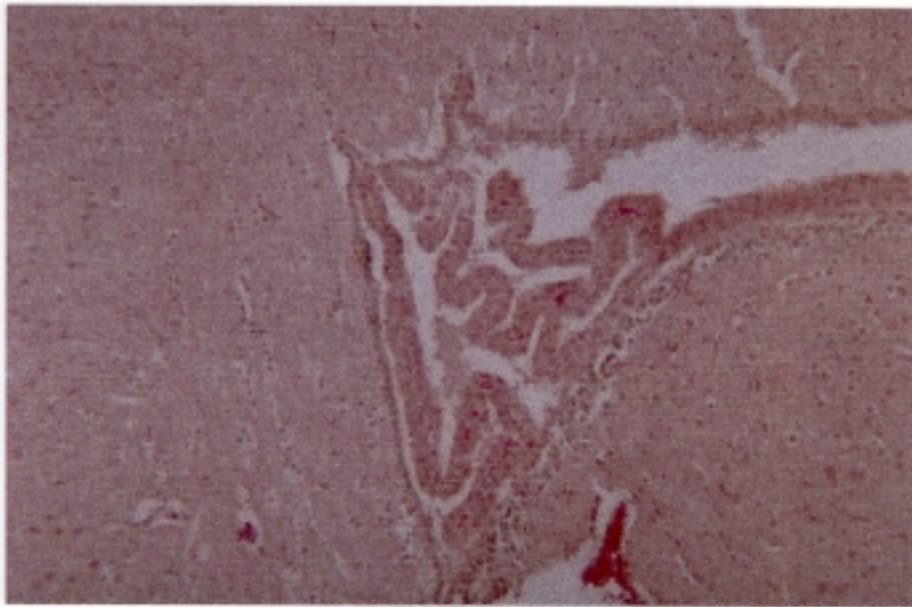
En los animales sacrificados después de las 12 horas, las lesiones referidas al hepatocito son mucho menos evidentes, y en las observadas a las 48 horas, estos cambios son mínimos. Sin embargo lo que destaca es el aumento de los fenómenos congestivos, de manera similar a lo que describimos en pulmón (Microfotografía 8).



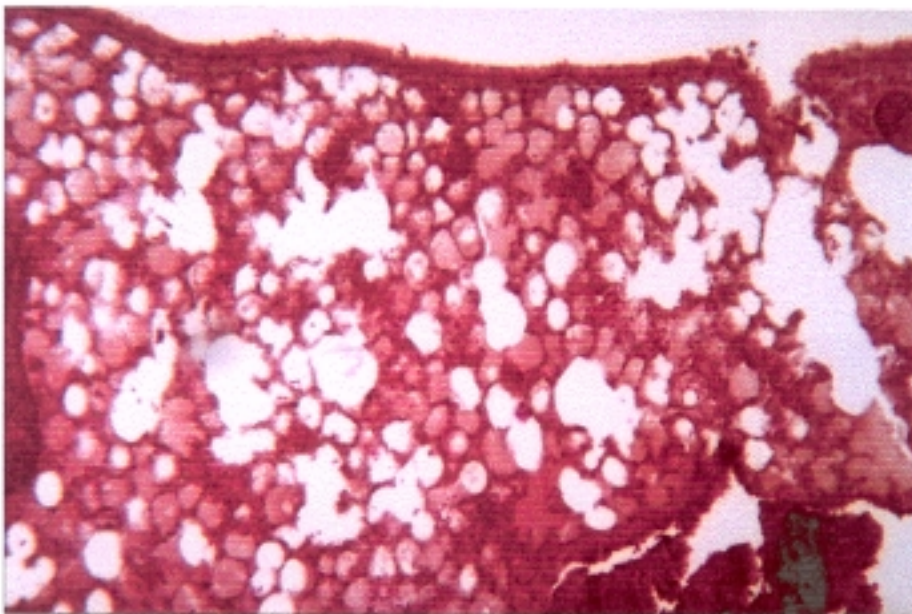
Microfotografía 1.- Cápsula suprarrenal: Congestión (x40).



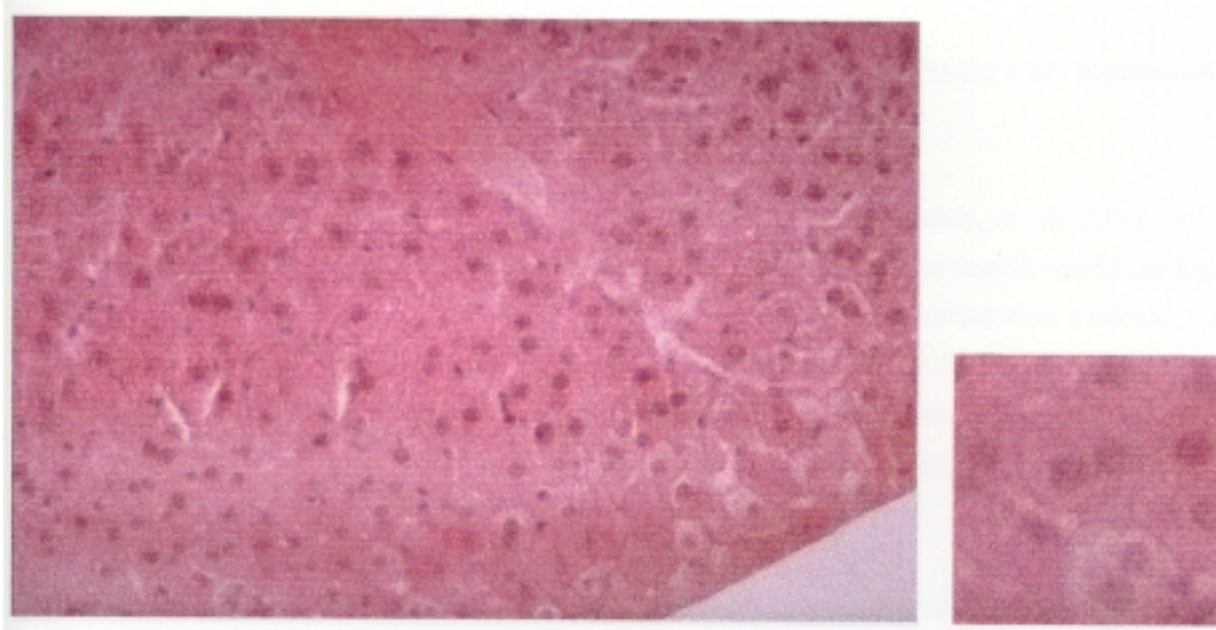
Microfotografía 2.- Ovario: Congestión (x80).



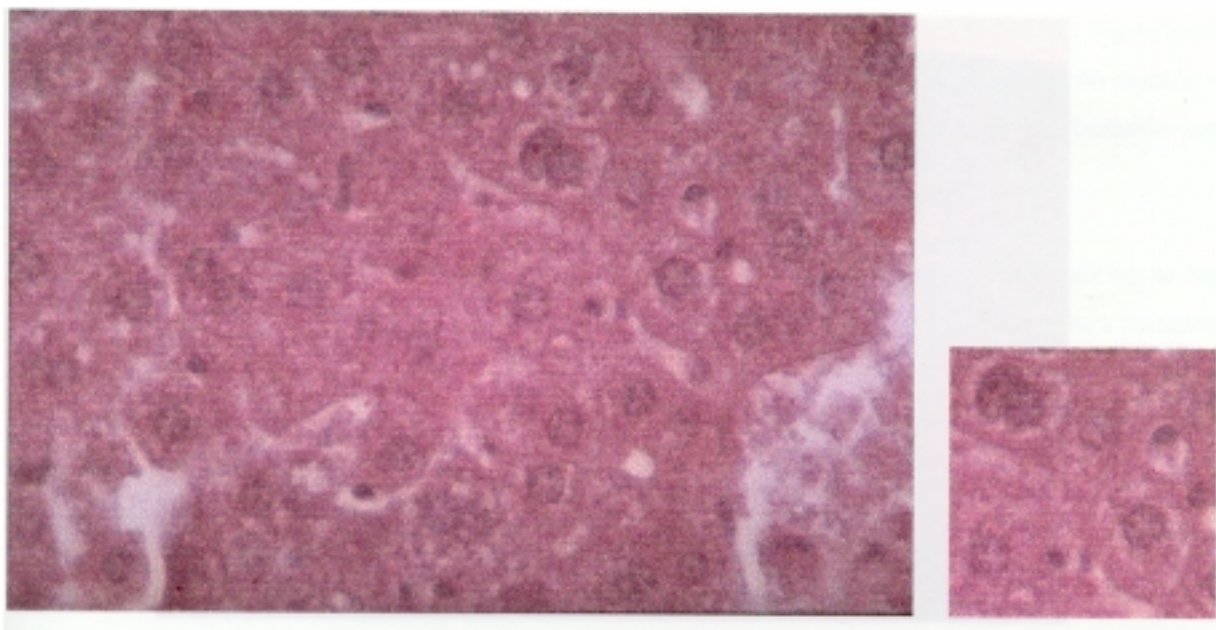
Microfotografía 3.- Cerebro: Congestión (x40).



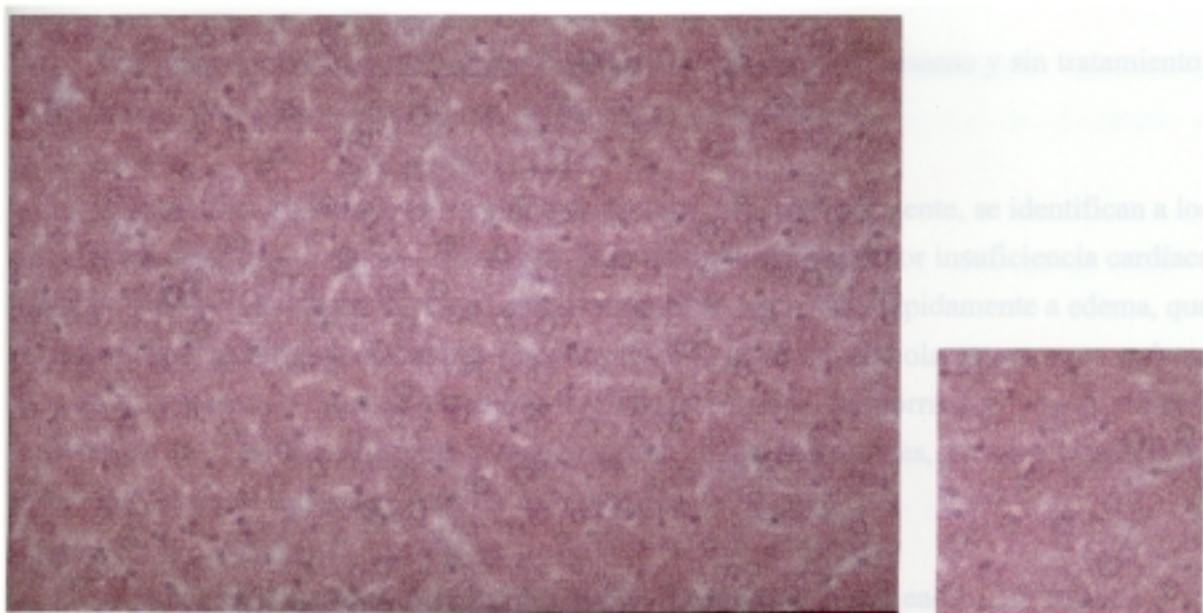
Microfotografía 4.- Pulmón: Edema (x40).



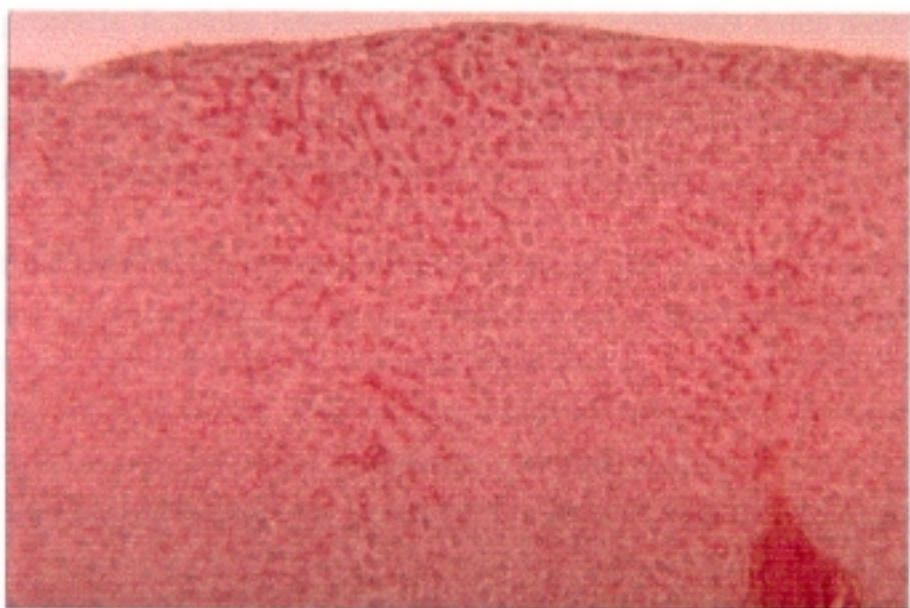
Microfotografía 5.- Hígado: Pleomorfismo nuclear con hiperchromatismo. Células binucleadas (x80) y ampliación.



Microfotografía 6.- Hígado: Edema intracelular perinuclear (x160) y ampliación.



Microfotografía 7.- Hígado: Hiperplasia de las células de *Kupffer*. Degeneración "plumosa" (x40), y ampliación.



Microfotografía 8.- Hígado: Congestión focal (x16).

III.4.3.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los animales control examinados (tratamiento con aceite de sésamo y sin tratamiento) no mostraron alteraciones histológicas en los cortes analizados.

Los cambios observados a nivel pulmonar expuestos anteriormente, se identifican a los descritos clásicamente como los iniciales de la congestión pulmonar por insuficiencia cardíaca (Contran, Kumar y Robbins, 1990). El estasis sanguíneo evoluciona rápidamente a edema, que en primer lugar se localiza en las vías respiratorias. Los capilares alveolares aparecen repletos de sangre; la rotura de estos capilares puede producir pequeñas hemorragias intra-alveolares, y posteriormente, la fragmentación y fagocitosis de restos de hemafes, provoca la aparición en la zona de macrófagos cargados de hemosiderina.

El pleomorfismo hepatocitario y nuclear, las células binucleadas, las mitosis y la hiperplasia e hipertrofia de las células de *Kupffer*, son cambios reactivos inespecíficos del hígado y se producen de forma automática ante múltiples tipos de agresión, como infecciones virales (virus Herpes simplex, virus de las Hepatitis, etc.), tóxicos (alcohol, tetracloruro de carbono, tioacetamida, zidovudina, etc.).

La presencia de células binucleadas y de mitosis ocasionales tienen menos significado en los animales jóvenes, como en nuestro modelo experimental, pero si tenemos en cuenta el resto de las alteraciones observadas a las que con frecuencia se asocian, podría considerarse como un cambio inducido experimentalmente.

La tumefacción turbia y la degeneración "plumosa" por hiperplasia mitocondrial, se han descrito como signos morfológicos de lesión incipiente de la hepatopatía alcohólica humana. También pueden observarse por la acción de otros tóxicos, como el AZT (Zidovudina), y siempre como lesión incipiente. Estas lesiones suelen ser reversibles a la retirada del tóxico, y en caso contrario, con frecuencia evolucionan o se sustituyen por fenómenos de esteatosis. En nuestro caso no hemos observado fenómenos de este tipo (López Bravo, A. Comunicación personal).

III.5.- BATERÍA FARMACOLÓGICA PARA CANNABINOIDES

Como hemos avanzado anteriormente, en este trabajo nos centramos en las pruebas farmacológicas para cannabinoides más utilizadas, empleando como animal de laboratorio el ratón.

Pasamos a desarrollar los materiales y el método empleados en cada una de ellas.

III.5.1.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores obtenidos en los diferentes ensayos realizados, se sometieron a un análisis estadístico en el que se obtuvieron la media, el error estándar y en el que se contrastó la hipótesis de normalidad intrapoblacional.

Al tratarse de resultados que seguían una distribución normal, se analizaron usando el Test paramétrico *t de Student*, para comparar dos únicos grupos experimentales (control y problema, en cada caso).

La comparación entre múltiples grupos se realizó mediante análisis de varianza, aplicando el Test de *Newman-Keuls*.

En todos los casos se adoptó el intervalo de confianza del 95% (probabilidad de error menor de 0,05) y del 99% (probabilidad de error menor de 0,01).

III.5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

* TEMPERATURA CORPORAL: HIPOTERMIA

En el hombre sano la temperatura corporal se mantiene alrededor de los 37 °C, independientemente del ambiente externo, es decir es homotermo. Sin embargo, los animales poiquilotermos son aquellos en los que su temperatura varía con las condiciones externas (Guyton, 1990). Tal es el caso de los ratones, animales empleados en este trabajo de experimentación. La temperatura corporal normal media de estos animales oscila entre los 35,5 y los 36,5 °C.

Con el fin de disminuir la gran cantidad de factores externos que pueden influir sobre los valores de temperatura basal de este animal de experimentación, se mantiene a los ratones aislados en unas condiciones ambientales constantes. Así mismo, la influencia del ritmo circadiano ha sido minimizada realizando las pruebas siempre a la misma hora del día.

Para medir la temperatura corporal de los animales de experimentación empleamos una sonda rectal (YSI-400) acoplada a un termómetro digital CIBERTEC P₆.

Se realiza una medida inmediatamente antes de la administración de la resina o patrón, y otra entre 60-90 minutos después de dicha administración. La diferencia en °C entre las dos medidas se compara con la de un grupo control que se define como cero y el resultado se expresa como "C de Hipotermia".

$$\Delta T \text{ (C}^\circ\text{)} = T_0 - T_{60}$$

* TEST DE LA INMOVILIDAD EN EL ANILLO: CATALEPSIA

El test de la inmovilidad en el anillo, permite evaluar el grado de catalepsia que es capaz de provocar un fármaco tras su administración en un animal de laboratorio. En este caso, obtenemos el porcentaje del tiempo total que el ratón permanece completamente inmóvil sobre un anillo horizontal.

El método, descrito por Pertwee en 1972 y que originariamente recibe el nombre de *The ring test*, continua en actualidad y es uno de los métodos más empleados para valorar la catalepsia. Nosotros hemos realizado el mismo test de Pertwee con unas ligeras modificaciones.

El aparato consta de un aro metálico horizontal de 5,5 cm de diámetro, unido a un soporte que lo mantiene a 16 cm del suelo. Cada ratón se coloca sobre el aro durante 5 minutos. Durante este período, se contabiliza el tiempo en segundos que el animal permanece totalmente inmóvil. Este valor se divide entre 300 segundos y se multiplica por 100, obteniéndose así el índice de inmovilidad.

$$\% \text{ INMOVILIDAD} = \frac{t}{t_T} \times 100$$

t: Tiempo (segundos) de permanencia inmóvil.

t_T: Tiempo total (segundos) que dura la prueba.

Se considera como criterio de inmovilidad a la ausencia de todo movimiento voluntario, excepto los movimientos asociados a la respiración. La ausencia de movimientos del hocico y bigotes es una buena referencia de inmovilidad, haciendo el análisis más objetivo.

Si un ratón permanece sobre el anillo al menos 2,5 minutos sin caerse o escaparse de él, se da por finalizada la prueba considerando como tiempo total esos 2,5 minutos (150 segundos).

Por el contrario, si un animal se escapa o cae del anillo dentro de los 2,5 primeros minutos, se vuelve a colocar sobre el anillo durante tres minutos más. En este caso el índice se calcula contabilizando la suma de los tiempos que ha estado sobre el anillo antes y después de caerse. Si un ratón se cae más de 5 veces consecutivas en los primeros 2,5 minutos, se desprecia el resultado y queda excluido del análisis de datos. Para reducir la incidencia de escapes, siempre se debe colocar el ratón sobre el anillo de espaldas al punto por el que se une al soporte vertical.

Un animal no tratado con drogas que produzcan catalepsia, lo más normal es que permanezca activo y curioso del entorno, a veces escapándose del anillo por salto, caída, o más frecuentemente, bajando a través del tubo vertical que soporta al anillo.

Sin embargo, los animales tratados con drogas catalépticas y en concreto con cannabinoides, poseen una actividad exploratoria interrumpida por períodos en los que cesan todos los movimientos voluntarios del rabo, tronco, extremidades, hocico y bigotes. Durante este período de inmovilidad, el ratón adopta posiciones extrañas, siendo una de las más frecuentes, el tenderse a lo largo del anillo, sujetándose únicamente por las patas traseras y las delanteras; en esta situación, suele ocurrir que su vientre gradualmente se vaya combando,

siendo cada vez más inestable su posición. El retorno a su actividad normal ocurre solamente si el animal termina por caer del anillo, aunque también puede ser que el propio ratón perciba el inminente peligro y con ello recupere su estado normal. Por supuesto si el experimentador toca su cuerpo o se produce algún ruido lo suficientemente fuerte, el período de inmovilidad se quebranta. De ahí que el experimento deba realizarse en una habitación no solamente aclimatada, sino también aislada de todo ruido externo, y siempre debe ser llevada a cabo por el mismo experimentador.

Se considera que un producto produce catalepsia cuando se obtienen valores del Índice de inmovilidad superior al 20%

Aquellos fármacos que den índices comprendidos entre un 15-20% probablemente poseen efecto sedante no específico, pero no cataléptico (Compton *et al.*, 1991).

* CAMPO ABIERTO: ACTIVIDAD MOTORA

En un campo abierto con unas dimensiones de 30x30 cm, dividido en 12 cuadrados de igual tamaño, se evalúa la actividad horizontal y la actividad vertical de los ratones (Fride y Mechoulam, 1993).

La locomoción (actividad horizontal) se valora por el número de cuadrados cruzados durante 8 minutos inmediatamente después de introducir al animal en el interior del campo abierto.

Al mismo tiempo se contabiliza el número de veces que el animal se eleva sobre las patas traseras (actividad vertical).

En condiciones normales, un animal sin tratamiento alguno, presentará una actividad horizontal y vertical propias de estos animales, que se manifiesta con la exploración de cada rincón del campo por parte del ratón. Por el contrario, los animales tratados con derivados de *Cannabis*, en función de la dosis como ya veremos en los resultados, manifestarán bien una marcada hipoactividad tanto vertical como horizontal (dosis altas), o bien un aumento de la actividad e hiperreflexia (dosis muy bajas).

* ANTINOCICEPCIÓN

La nocicepción es el mecanismo por el cual los estímulos nocivos son percibidos en la periferia y transmitidos al sistema nervioso central.

El efecto analgésico producido por *Cannabis* y sus derivados es un efecto central, y como ya vimos en la revisión bibliográfica ocurre por mecanismos espinales como supraespinales.

Por ello, para el estudio de la actividad analgésica de estos compuestos hemos optado por dos métodos térmicos para provocar el estímulo doloroso cuantificable y que son muy empleados en experimentación animal para estos casos: **Test de la Placa caliente** y el **Test del foco calorífico**. Se evalúa así la capacidad que poseen los productos a ensayar de disminuir la percepción de este estímulo doloroso.

Analgésímetro de la placa caliente (*Hot plate*).

El método actual se basa en el original establecido por Janssen y Jageneau en 1958.

El estímulo doloroso en este caso se provoca por medio de un Analgésímetro Hot Plate DS-37 Socrel (PANLAB, S.L.), que consta de una plancha metálica termostalizada eléctricamente a $54,5 \pm 0,2$ °C, rodeada por un cilindro de 19,5 cm de diámetro y 13 cm de altura, que asegura que el animal permanezca sobre dicha placa durante el ensayo. Además, dispone de un cronómetro que señala el tiempo en segundos transcurrido desde que se sitúa el ratón sobre la placa, hasta que acusa el dolor.

En este ensayo, consideramos como primer umbral doloroso el momento en que el animal se lame las extremidades delanteras, y, como segundo umbral, el instante en que dicho animal se lame las extremidades traseras, siendo más valorable el segundo, pues se evita la posibilidad de confusión con el acicalamiento normal de los roedores. Consideramos como tiempo máximo de permanencia sobre la placa (*cut-off*), 30 segundos para el primer caso y 45 segundos para el segundo; a partir de entonces, el animal es retirado de la plancha y se considera como el 100% del efecto analgésico (Harris y Pierson, 1963).

Los resultados se expresan como el % del Máximo Efecto Posible (%MPE) o % de analgesia, que viene determinado por la fórmula siguiente:

$$\% \text{ MEP} = \frac{T_p - \bar{T}_c}{\text{cutoff} - \bar{T}_c} \times 100$$

T_p : Tiempo de latencia del animal problema.

\bar{T}_c : Tiempo medio de latencia de los animales control.

cutoff: 30 seg. (patas delanteras); 45 seg. (patas traseras)

Analgesímetro del Foco calorífico (*Tail-Flick*).

El analgesímetro del Foco calorífico se basa también en la producción de un estímulo doloroso térmico, que en este caso se producirá sobre la cola del animal. El método fue propuesto en 1941 por D'Amour y Smith.

El aparato (Analgesímetro LI-7106. LETICA) está dotado de una fuente de calor de intensidad regulable y de un adecuado sistema de detección de la respuesta del animal, asociado a un cronómetro que mide la latencia de respuesta con una precisión de décimas de segundos. La fuente de calor está formada por una lámpara halógena (12V DC, 100W), alojada en un foco desplazable.

Dicha lámpara tiene la posibilidad de emitir a tres intensidades caloríficas diferentes, máxima, media y mínima. Así, el calor que puede provocar será función de la intensidad y del tiempo. Con ello, podemos escoger la intensidad calorífica que sea necesaria teniendo en cuenta el experimento, la droga empleada y el animal de experimentación.

La siguiente tabla nos muestra la relación existente entre intensidad calorífica y tiempo de exposición:

t (seg)	T máxima(°C)	T media(°C)	T mínima(°C)
5	75	50	30
10	125	60	40
20	175	80	50
30	>200	100	55

La cola del animal es colocada sobre una ranura, tapando una célula fotoeléctrica. Se hace incidir el calor radiante sobre la cola y cuando el animal responde al dolor, la retira, momento en el cual el foco incide directamente sobre la célula fotoeléctrica, parándose el cronómetro.

En este caso para evitar el daño tisular, hemos empleado siempre la intensidad calorífica media, y se considera como tiempo máximo de incidencia o *cut-off*, 10 segundos; a partir de entonces si todavía no ha respondido el animal, se retira considerándose el 100% del efecto analgésico.

De la misma manera, los resultados se expresan con el %MEP, pero teniendo en cuenta que en este caso cada ratón es sometido a la prueba antes y después de la administración y por lo tanto la fórmula a aplicar sería:

$$\%MEP = \frac{Td - Ta}{cutoff - Ta} \times 100$$

Ta: Tiempo de latencia antes de la administración.

Td: Tiempo de latencia después de la administración.

cutoff: 10 segundos.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Para el estudio farmacológico de las diferentes resinas de *Cannabis*, hemos empleado lotes de ocho ratones de peso homogéneo; como ya hemos dicho anteriormente, el tratamiento se realizó en todo momento por vía i.p. y con un volumen fijo de 0,2ml/ratón.

Para evitar el solapamiento de las pruebas, se decidió establecer dos lotes por cada una de las dosis y resinas ensayadas; el primer lote, destinado a la medida de la temperatura corporal y actividad motora, y el segundo, a la valoración de analgesia y catalepsia. Teniendo esto en cuenta, en todos los experimentos, cada ratón fue sometido a cada uno de los diferentes test, siguiendo la siguiente secuencia:

- Temperatura basal (T_0 pre-administración).
- Administración de la droga.
- Actividad motora (20 minutos post-administración).
- De nuevo, temperatura corporal (T_{90} , 60-90 minutos post-administración).

- Tiempo de latencia (segundos) en el analgesímetro del foco calorífico antes de la administración.
- Administración de la droga.
- Tiempo de latencia (segundos) en el analgesímetro del foco calorífico, 45 minutos post-administración.
- Tiempo en segundos hasta el primer lamido de las patas delanteras en el analgesímetro de la placa caliente (60 minutos post-administración).
- Tiempo en segundos hasta el primer lamido de las patas traseras en el analgesímetro de la placa caliente (60 minutos post-administración).
- Catalepsia (% de inmovilidad) 90 minutos post-administración.

Paralelamente y bajo las mismas condiciones, se establece un lote control para cada uno de los problemas, al que sólo se le administra el vehículo (aceite de sésamo), y que es sometido a las mismas pruebas anteriores.

Dentro de la sección de BATERÍA FARMACOLÓGICA PARA CANNABINOIDES, podemos dividir los estudios realizados en cinco bloques de experimentos, y que a continuación comentamos brevemente:

- a.- Curva dosis/efecto del *hashish*.
- b.- Efecto del Tetrahidrocannabinol.
- c.- Efecto del Cannabinol y Cannabidiol.
- d.- Estudio del posible efecto de los otros componentes de la resina de *Cannabis*.
- e.- Potenciación o inhibición del efecto farmacológico de los diferentes principios activos tras una administración conjunta.

A.- Curva dosis/efecto del *hashish*

Para la realización de esta serie de experimentos, decidimos escoger una resina que poseyera una gran riqueza de THC, por ser éste el principio activo más importante presente en la resina de *Cannabis*, con el fin de poder relacionar el efecto con el contenido de dicho compuesto. Se trata de la muestra de resina nº 452/11, que como vimos en la tabla correspondiente posee un 13,951% de THC, 7,733% de CBD y 1,011% de CBN. Por ello, conociendo la composición, al administrar una determinada dosis de resina, podemos conocer también cuál es la dosis expresada en THC, CBD ó CBN.

Se realizaron diferentes ensayos, administrando dosis de resina de 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg, 200 mg/kg, 500 mg/kg y 1000 mg/kg a diferentes lotes de ratones que fueron sometidos a toda la batería farmacológica para cannabinoides anteriormente desarrollada, con el fin de conocer la linealidad de cada uno de los efectos producidos tras la administración intraperitoneal de la sustancia (0,2 ml/ratón en aceite de sésamo). Queremos recordar que, haciendo un sencillo cálculo matemático, estas dosis corresponden respectivamente a 3,42 mg/kg; 6,85 mg/kg; 13,90 mg/kg; 27,80 mg/kg; 69,50 mg/kg y 137,0 mg/kg de THC presente en la muestra administrada. No obstante, nosotros en este caso concreto, haremos siempre referencia a la dosis de la resina, pues consideramos el efecto global producido por la administración de dicho producto vegetal.

A.1.- RESULTADOS

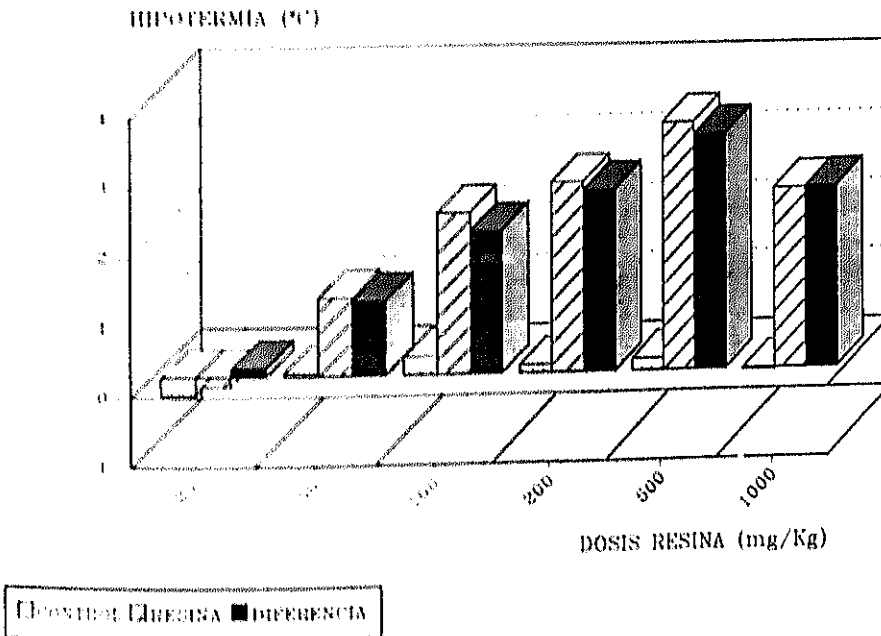
A continuación, pasamos a exponer los resultados obtenidos para cada una de las pruebas realizadas. Para estandarizar la presentación de los mismos y hacer más sencilla su comprensión, en todos los casos aparecerá en primer lugar la tabla de los valores medios obtenidos, con el error estándar correspondiente, así como la significación estadística, refiriendo siempre los datos frente a un control (t-Student). También se señala tanto en las tablas como en las gráficas, el valor obtenido una vez restado el control a cada uno de los datos medios; después, los representaremos gráficamente, obteniéndose así la curva dosis/efecto, que aparecen resaltadas en los gráficos como columnas sombreadas en negro.

* Temperatura corporal (hipotermia)

	DOSIS (mg/kg)	ΔT (°C)
CONTROL	-	-0,26±0,05
RESINA 452/11	25	-0,14±0,06
DIFERENCIA		0,12±0,01
CONTROL	-	0,05±0,03
RESINA 452/11	50	1,11±0,20**
DIFERENCIA		1,06±0,17
CONTROL	-	0,26±0,06
RESINA 452/11	100	2,30±0,19**
DIFERENCIA		2,04±0,13
CONTROL	-	0,11±0,06
RESINA 452/11	200	2,72±0,20**
DIFERENCIA		2,61±0,14
CONTROL	-	0,17±0,06
RESINA 452/11	500	3,56±0,32**
DIFERENCIA		3,39±0,26
CONTROL	-	-0,02±0,04
RESINA 452/11	1000	2,59±0,21**
DIFERENCIA		2,61±0,17

*p<0,05 control vs problema (t-Student), **p<0,01 control vs problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±e)

HIPOTERMIA

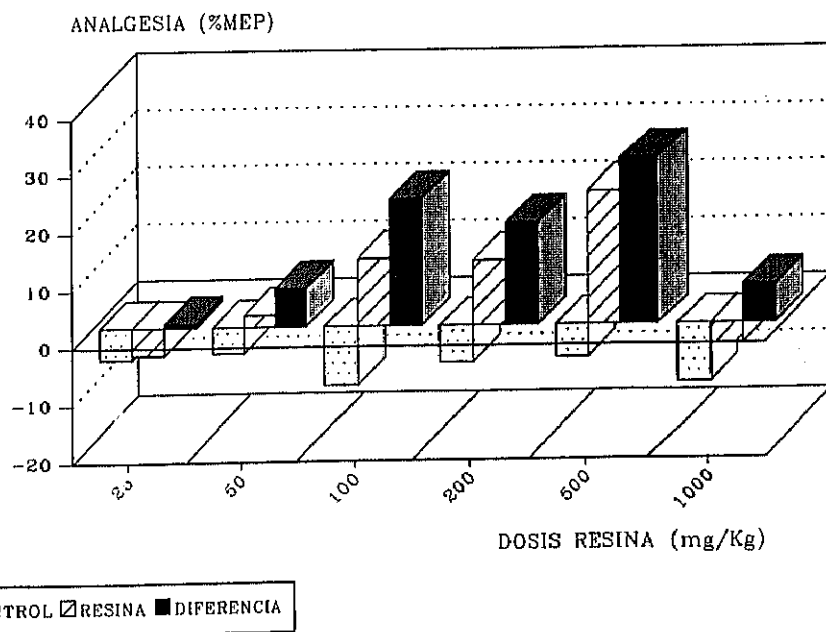


* Foco calorífico (analgesia)

	DOSIS (mg/kg)	%MEP
CONTROL	-	-5,50±1,69
RESINA 452/11	25	-4,81±2,14
DIFERENCIA		0,69±0,45
CONTROL	-	-4,54±3,26
RESINA 452/11	50	2,12±3,47
DIFERENCIA		6,66±0,21
CONTROL	-	-10,34±3,27
RESINA 452/11	100	11,78±5,06**
DIFERENCIA		22,12±1,79
CONTROL	-	-6,49±1,26
RESINA 452/11	200	11,29±6,66'
DIFERENCIA		17,78±5,40
CONTROL	-	-5,76±2,92
RESINA 452/11	500	23,20±9,96'
DIFERENCIA		28,96±7,04
CONTROL	-	-10,21±2,04
RESINA 452/11	1000	-3,59±2,27'
DIFERENCIA		6,62±0,23

*p<0,05 control vs. problema (t-Student); **p<0,01 control vs. problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±e)

ANALGESIA FOCO

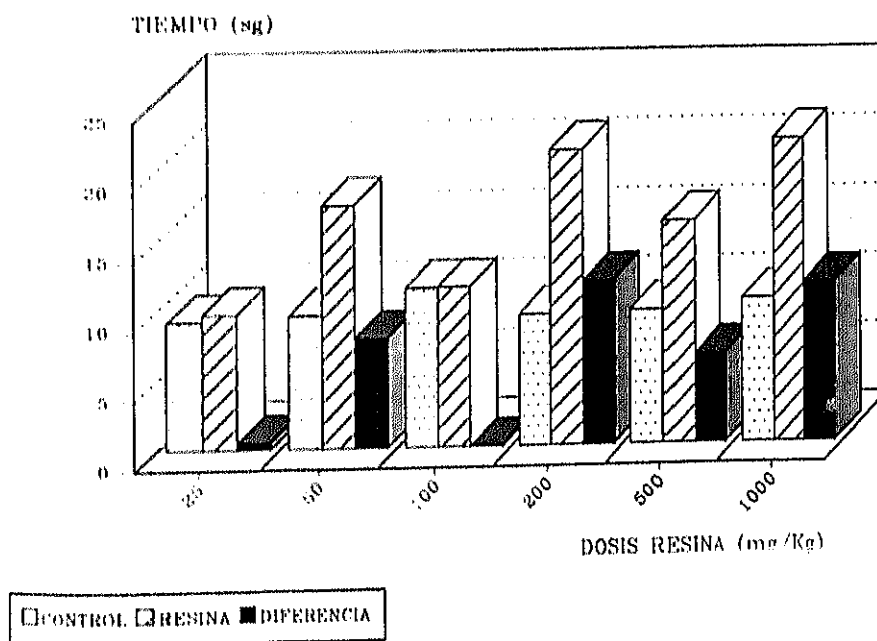


* Analgesímetro de la placa caliente (lamido patas delanteras)

	DOSIS (mg/kg)	t(seg)	%MEP
CONTROL	-	9,21±0,73	
RESINA 452/11	25	9,71±0,88	2,46±4,27
DIFERENCIA		0,50±0,15	
CONTROL	-	9,60±0,62	
RESINA 452/11	50	17,50±3,32*	33,46±13,43*
DIFERENCIA		7,90±2,70	
CONTROL	-	11,49±1,06	
RESINA 452/11	100	11,52±0,63	0,66±3,37
DIFERENCIA		0,03±0,43	
CONTROL	-	9,45±0,47	
RESINA 452/11	200	21,26±2,32**	56,94±10,93**
DIFERENCIA		11,81±1,85	
CONTROL	-	9,64±0,60	
RESINA 452/11	500	16,05±2,48*	35,59±13,06*
DIFERENCIA		6,41±1,88	
CONTROL	-	10,40±0,40	
RESINA 452/11	1000	21,88±2,31**	58,60±11,80**
DIFERENCIA		11,48±1,91	

*p<0,05 control vs problema (t-Student); **p<0,01 control vs. problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±s)

PLACA (LAMIDO PATAS DELANTERAS)

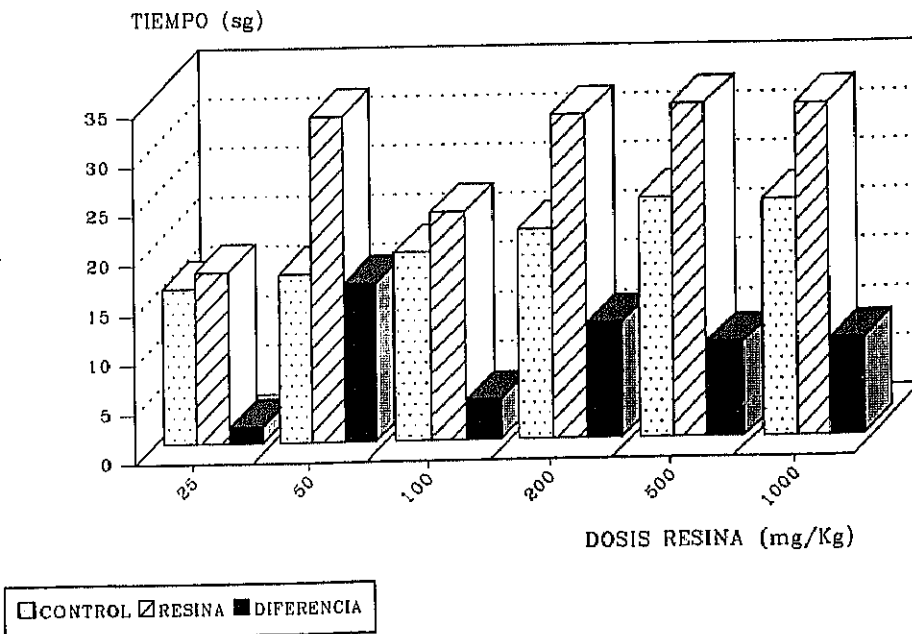


* Analgesímetro de la placa caliente (lamido patas traseras)

	DOSIS (mg/kg)	I (sg)	%MEP
CONTROL	-	15,66±0,92	
RESINA 452/11	25	17,28±0,98	7,19±3,55
DIFERENCIA		1,62±0,06	
CONTROL	-	1,70±1,04	
RESINA 452/11	50	32,92±4,26**	56,85±15,20**
DIFERENCIA		15,92±3,22	
CONTROL	-	19,01±0,72	
RESINA 452/11	100	23,05±1,42*	15,56±5,48*
DIFERENCIA		4,04±0,32	
CONTROL	-	21,17±2,14	
RESINA 452/11	200	32,81±2,31**	49,00±9,68**
DIFERENCIA		11,64±0,17	
CONTROL	-	24,21±1,75	
RESINA 452/11	500	33,78±3,13**	49,94±14,94**
DIFERENCIA		9,57±1,38	
CONTROL	-	23,92±0,62	
RESINA 452/11	1000	33,68±3,18**	38,68±3,18**
DIFERENCIA		9,76±2,56	

*p<0,05 control vs. problema (t-Student); **p<0,01 control vs. problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±s).

PLACA (LAMIDO PATAS TRASERAS)

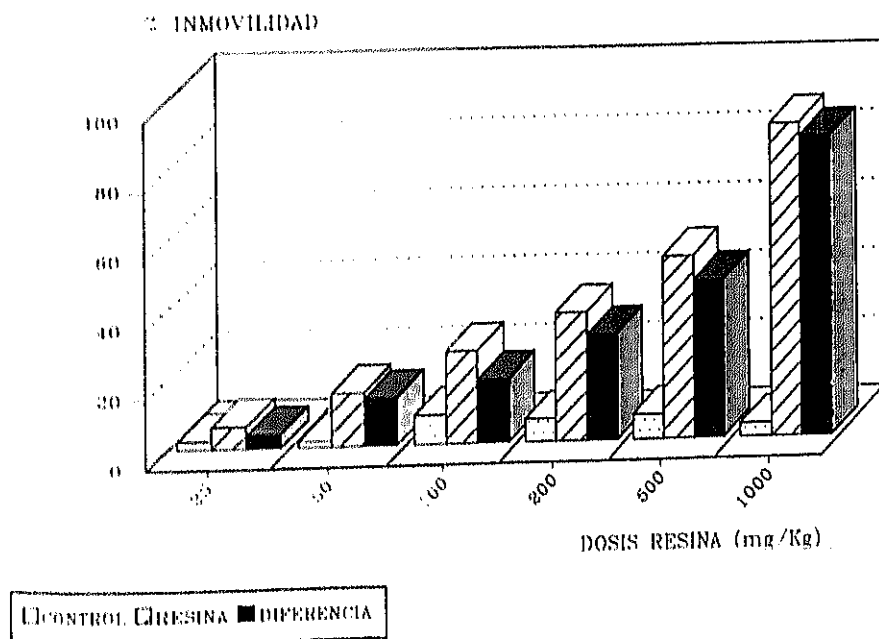


* Catalepsia

	DOSIS (mg/kg)	%INMOVILIDAD
CONTROL	-	2,38±0,63
RESINA 452/11	25	6,38±0,87**
DIFERENCIA		4,00±0,24
CONTROL	-	1,72±0,53
RESINA 452/11	50	15,36±1,94**
DIFERENCIA		13,64±1,41
CONTROL	-	8,40±2,32
RESINA 452/11	100	26,60±5,19**
DIFERENCIA		18,2±2,87
CONTROL	-	6,51±0,89
RESINA 452/11	200	37,12±3,58**
DIFERENCIA		30,51±2,69
CONTROL	-	7,12±1,87
RESINA 452/11	500	52,80±3,12**
DIFERENCIA		45,68±1,25
CONTROL	-	3,87±0,64
RESINA 452/11	1000	90,61±2,18**
DIFERENCIA		86,74±1,54

*p<0,05 control vs. problema (t-Student); **p<0,01 control vs. problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±e).

CATALEPSIA

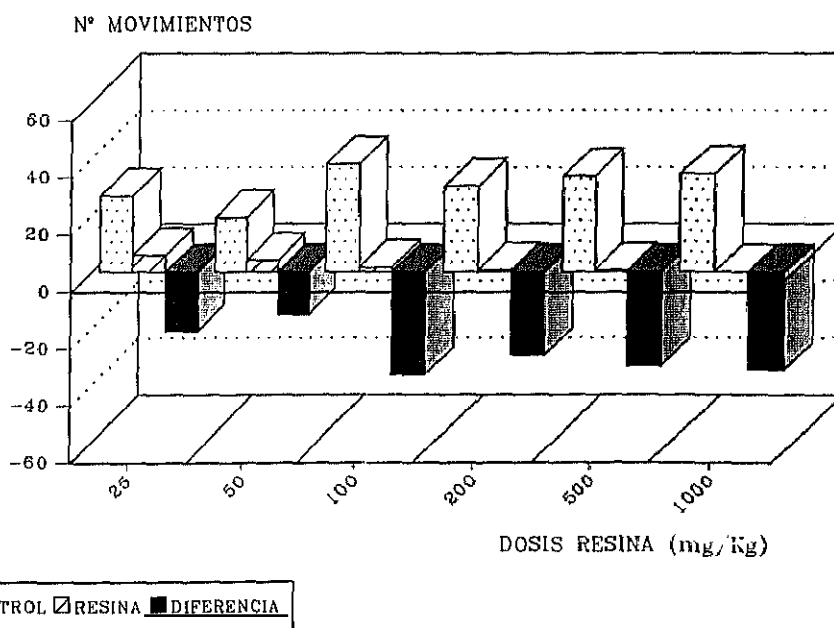


* Actividad motora vertical

	DOSIS (mg/kg)	Nº DE MOVIMIENTOS
CONTROL	-	26,62±4,00
RESINA 452/11	25	5,75±1,35**
DIFERENCIA		-20,87±2,65
CONTROL	-	19,00±3,07
RESINA 452/11	50	4,00±1,89**
DIFERENCIA		-15,00±1,18
CONTROL	-	37,80±4,03
RESINA 452/11	100	1,60±1,29*
DIFERENCIA		-36,20±2,74
CONTROL	-	30,00±3,88
RESINA 452/11	200	0,62±0,50**
DIFERENCIA		-29,38±3,38
CONTROL	-	33,50±5,79
RESINA 452/11	500	0,50±0,27**
DIFERENCIA		-33,00±5,52
CONTROL	-	34,37±3,77
RESINA 452/11	1000	0,00±0,00**
DIFERENCIA		-34,37±0,00

*p<0,05 control vs. problema (t-Student); **p<0,01 control vs. problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±e).

ACTIVIDAD VERTICAL

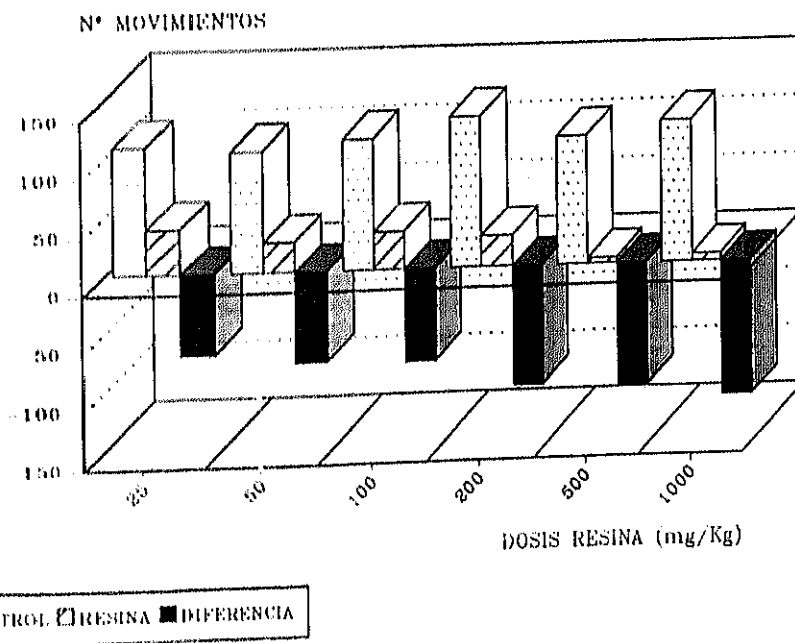


* Actividad motora horizontal

	DOSIS (mg/kg)	Nº DE MOVIMIENTOS
CONTROL	-	109,62±10,74
RESINA 452/11	25	39,00±7,02**
DIFERENCIA		-70,62±3,72
CONTROL	-	104,62±6,24
RESINA 452/11	50	25,87±7,55**
DIFERENCIA		-78,75±1,31
CONTROL	-	113,20±4,76
RESINA 452/11	100	32,80±3,41**
DIFERENCIA		-80,4±1,35
CONTROL	-	130,25±6,38
RESINA 452/11	200	26,62±4,40**
DIFERENCIA		-103,63±1,98
CONTROL	-	111,12±9,88
RESINA 452/11	500	4,62±1,24**
DIFERENCIA		-106,5±8,64
CONTROL	-	122,87±2,99
RESINA 452/11	1000	6,37±1,62**
DIFERENCIA		-116,5±1,37

*p<0,05 control vs. problema (t-Student); **p<0,01 control vs. problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±e).

ACTIVIDAD HORIZONTAL



A.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Vistos los resultados obtenidos tras la administración de *hashish* a diferentes dosis, observamos un conjunto de efectos comportamentales y fisiológicos que conllevan: hipotermia, catalepsia, disminución motora y analgesia. Estos efectos se han atribuido en numerosas ocasiones a los principios activos de *Cannabis*, los cannabinoides, y existen numerosos trabajos experimentales que así lo demuestran (Compton *et al.*, 1991; Fride y Mechoulam, 1993; ...).

Después de establecer los distintos lotes para la administración de las diferentes dosis, y someter a los animales a todas las pruebas de la Batería Farmacológica para cannabinoides, se observó la existencia de una relación Dosis/Efecto lineal en la mayoría de los tests.

Así, en el caso de la Temperatura, se produce una hipotermia que va aumentando con la dosis de resina administrada, desde 25 mg/kg hasta 500 mg/kg (en que el efecto es máximo, más de 3 °C). Curiosamente, con la administración de una dosis superior (1000 mg/kg), la hipotermia es menor. Hay que decir que esta dosis de resina tan elevada resulta tóxica, produciéndose incluso la muerte de algunos animales tratados en pocas horas, con lo que la valoración del parámetro en cuestión es muy variable. Decir también, que la hipotermia producida en los ratones a los 60-90 minutos tras la administración de la resina de *hashish* es estadísticamente significativa (** $p < 0,01$) con respecto a los lotes control en todos los casos salvo con la dosis menor (25 mg/kg), en que no se observan diferencias significativas comparando los resultados con el control. Según los estudios realizados por Pertwee, la hipotermia producida tras la administración de productos de *Cannabis*, no provoca incrementos significativos en otros parámetros valorados, como la catalepsia o la hipoactividad.

Respecto a la Catalepsia, fenómeno muy típico de los cannabinoides, se obtiene una linealidad perfecta, como podemos observar en la gráfica correspondiente. Debemos aclarar que aunque en todos los casos se obtengan resultados estadísticamente significativos (** $p < 0,01$), sólo podemos considerar catalepsia cuando exista un Índice de inmovilidad > al 20% (Pertwee, 1972); por debajo de este valor no se reconoce la inmovilidad producida por las respectivas dosis como fenómeno cataléptico, sino como un efecto sedante de las bajas dosis administradas. Por ello, es a partir de la administración de 200 mg/kg de la resina ensayada cuando podemos considerar dicho efecto como tal, alcanzándose el efecto mayor tras la administración de la dosis de 1000 mg/kg, con un Índice medio de inmovilidad que alcanza

el 80%. Destacar de este test que es uno de los que producen resultados más reproducibles y característicos. Además resultan muy curiosas las diferentes posturas en que es capaz de permanecer el animal cataléptico, así como la hiperreflexia detectada si ese período de inmovilidad es interrumpido por algún ruido imprevisto. Uno de los signos más fáciles de apreciar es la mirada fija en un punto determinado durante un largo período de tiempo sin que el animal cambie en ningún momento la postura adquirida.

Llegamos a la valoración de la **Actividad motora**. La administración de las diferentes dosis de *hashish* produce una hipoactividad marcada tanto vertical como horizontal y cuyos valores son estadísticamente significativos (** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$). Una vez más podemos comprobar la linealidad existente entre la dosis administrada y el efecto producido, obteniéndose mayor disminución del número de movimientos a mayor dosis. Si bien, hay que decir que en el caso de la valoración de la Actividad vertical existe alguna pequeña variación en la curva dosis/efecto. La hipoactividad es manifiesta desde dosis pequeñas de resina, como podemos comprobar por la reducción del número de movimientos de los ratones tratados con respecto a los controles. Tras depositar al animal tratado en el centro del campo abierto para desarrollo del test, podemos hacer también otra serie de observaciones, en lo que se refiere al comportamiento. Los animales tratados, y sobre todo los tratados con las dosis mayores muestran además de la hipoactividad, un fenómeno de incoordinación motora, produciéndose el estiramiento de las patas traseras espontáneamente dificultando así el andar del animal. Se produce también en la mayoría de los casos, una disminución apreciable de los movimientos estereotipados como el "aseo", capacidad exploratoria, etc. En numerosas ocasiones, el ratón una vez depositado sobre el tablero cuadriculado del campo abierto, cruza sin rapidez algunos de los cuadrados, dirigiéndose a uno de los rincones del campo, donde permanece inmóvil incluso durante un par de minutos para reanudar posteriormente la exploración del mismo. Por el contrario, los ratones control, a los que sólo se les administra el vehículo, muestran una gran actividad motora tanto vertical como horizontal, exploración, "aseo"...

Hay que decir, que tras la administración completa de *hashish* a las dosis ensayadas, no se produce el efecto bifásico (estimulante y depresor) demostrado por diversos autores y relacionado directamente con la dosis del Tetrahidrocannabinol (dosis muy bajas y dosis elevadas) (Holtzman *et al.*, 1969). Por contra, los animales tratados con dosis de 25 mg/kg (dosis mínima de resina ensayada), ya empiezan a manifestar síntomas de sedación.

En cuanto a los tests para la valoración de la Analgesia (Test de la "Placa caliente" y del "Foco Luminoso"), por el contrario, se produce una gran variabilidad de resultados, y una vez diseñada la curva dosis/efecto se comprueba la ausencia de linealidad; si bien, hay que decir que la tendencia de la curva es ascendente. Estos resultados tan variables pueden entenderse considerando que la valoración de analgesia es uno de los test que están más sujetos a sufrir alteraciones en función de numerosos factores, como son: el sexo del animal de experimentación, la vía de administración, la época del año, el momento del día... En nuestros ensayos, hemos podido comprobar el efecto analgésico atribuido a *Cannabis* en algunos de los lotes tratados. Así, se obtienen resultados estadísticamente significativos. Para el analgesímetro del Foco Luminoso, obtenemos valores significativos ($**p<0,01$; $*p<0,05$) del % de analgesia (%MLP) con respecto al control a partir de la administración de la dosis de 100 mg/kg de resina. Destacar que el efecto analgésico máximo se produce a la dosis de 500 mg/kg (%MLP=28,9%). En los ensayos de analgesia realizados con el analgesímetro de la Placa Caliente, hemos considerado dos parámetros para detectar el umbral doloroso: el lamido de las patas delanteras y el lamido de las patas traseras, ambos nos indican el momento en que el animal siente dolor, si bien consideramos más idóneo el segundo de ellos. Quizá este analgesímetro produzca resultados más fiables que el de la Placa Caliente, por influir menos factores en el momento de la medida, resultando ser incluso más sensible; así, encontramos diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ya desde la dosis de 50 mg/kg. Debemos tener en cuenta, que la gran mayoría de los estudios de analgesia realizados con extractos de *Cáñamo* indiano, y con cannabinoides, emplean como vía de administración la endovenosa; tal es el caso de los ensayos llevados a cabo por Peter y Martín, en 1991. Por estar nuestro trabajo basado en el análisis farmacológico de la resina completa de *Cannabis*, y vernos obligados por ello al empleo de la vía de administración intraperitoneal, no podemos establecer una clara relación entre la experiencia de otros autores y la nuestra. Si bien, parece claro que uno de los factores responsables de la gran variabilidad de los datos obtenidos, es precisamente la vía de administración escogida (Martín, 1985).

B.- Efecto del Tetrahidrocannabinol

Por ser el Tetrahidrocannabinol el componente psicoactivo más potente de *Cannabis sativa*, nos propusimos abordar el estudio farmacológico de este compuesto, para establecer una relación con los ensayos realizados con la resina hasta este momento, tanto de toxicidad aguda como de linealidad dosis/efecto.

Utilizando el principio activo puro, THC y siempre empleando la vía de administración i.p. y como vehículo el aceite de sésamo, decidimos analizar (para luego hacer una comparación), los efectos producidos por esta sustancia, bajo las mismas condiciones de tratamiento que las empleadas en los experimentos anteriores.

Las dosis ensayadas en este caso fueron de 10, 20 y 50 mg/kg de THC, en 0,2 ml/ratón del vehículo. Lógicamente, se escogieron estas dosis por las referencias bibliográficas encontradas y por supuesto, por la orientación obtenida tras la realización de la curva dosis/efecto de la muestra de *hashish* empleada; esto nos permite establecer una relación entre el efecto mostrado por el propio THC a dosis equivalentes a las utilizadas en la resina en función de su composición.

B.1.- RESULTADOS

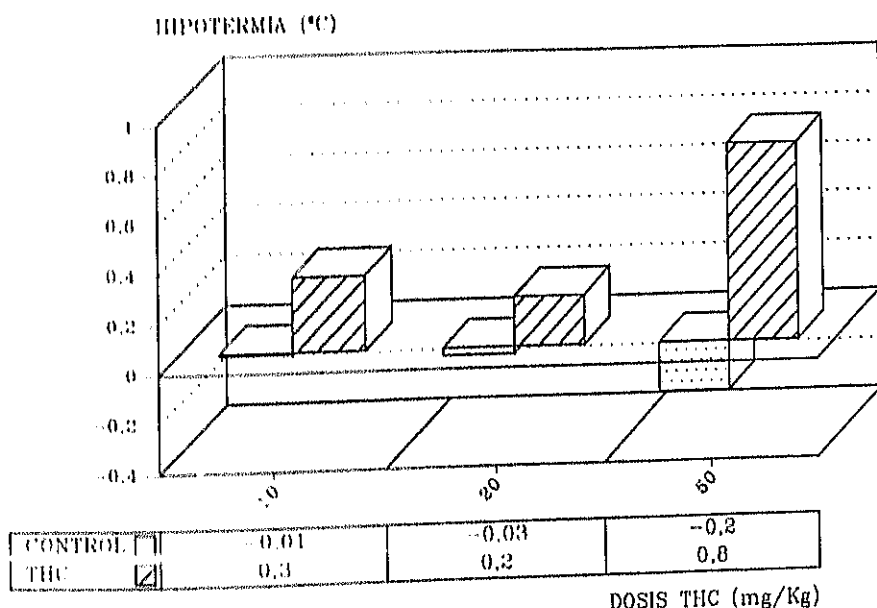
En la siguiente tabla aparecen recogidos los resultados que hemos obtenido administrando a los lotes problemas 10, 20 y 50 mg/kg de Δ^9 -THC. Cada una de las dosis fue ensayada junto a otro lote control. Figura el valor medio, el error estándar y la significación estadística respecto a los lotes control (t-Student). A dicha tabla le siguen una serie de gráficas que resumen los datos obtenidos en cada una de las pruebas (Temperatura, Analgesia, Catalepsia y Actividad).

DOSIS THC (mg/kg)	AT (°C)	FOCO (%MEP)	PLACA LD (sg)	PLACA LT (sg)	CATALEPSIA (%)	A.VERT. (n°movim)	A.HORIZ. (n°movim)
CONTROL	-0,01±0,02	-3,27±1,66	8,57±0,40	15,34±1,15	1,87±0,62	24,90±6,18	94,00±12,99
10	0,30±0,11**	13,92±6,33*	14,76±1,37**	30,50±3,65**	15,90±3,25*	13,00±3,00	91,60±8,74
CONTROL	-0,03±0,03	-3,66±1,09	12,16±1,18	20,32±1,63	2,34±0,63	32,60±6,47	112,50±10,38
20	0,20±0,06*	7,01±2,35**	10,41±0,77	21,27±1,98	16,80±2,80**	26,00±4,27	129,12±8,93
CONTROL	-0,20±0,04	-2,94±3,12	9,86±0,64	17,32±1,17	5,31±0,68	29,60±4,47	102,12±1,54
50	0,80±0,07**	7,57±3,62*	13,26±0,83**	31,14±1,40**	34,10±4,13**	2,00±0,75**	26,37±5,65**

*p<0,05 control vs. problema (t-Student); **p<0,01 control vs. problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±e).

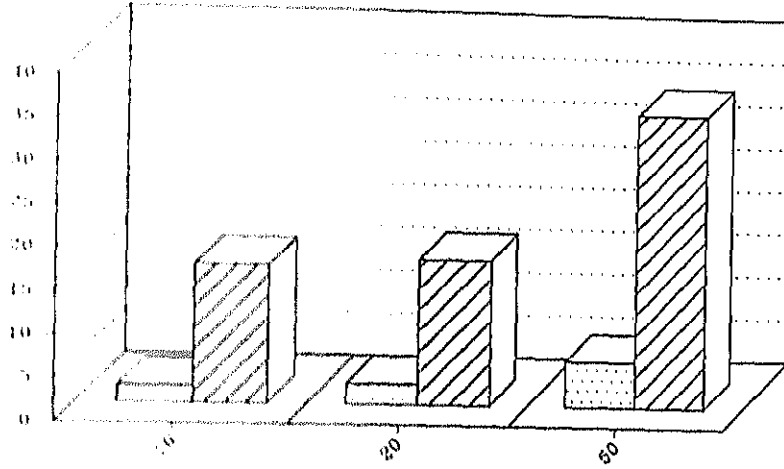
AT: Incremento de temperatura; MEP: Máximo efecto posible; PLACA LD: Placa, lamido de las patas delanteras
 PLACA LT: Placa, lamido de las patas traseras; A.VERT.: Actividad vertical; A.HORIZ.: Actividad horizontal

HIPOTERMIA



CATALEPSIA

% INMOVILIDAD

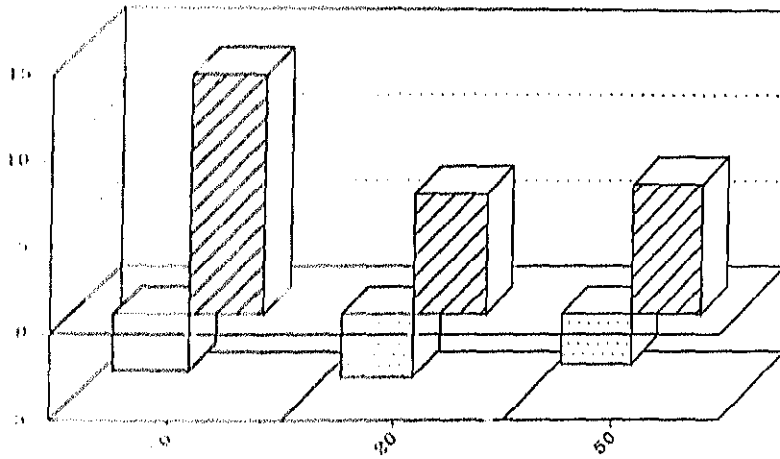


CONTROL	1,87	2,34	5,31
THC	15,91	16,8	34,14

DOSIS THC (mg/Kg)

ANALGESIA FOCO

ANALGESIA (%MEP)

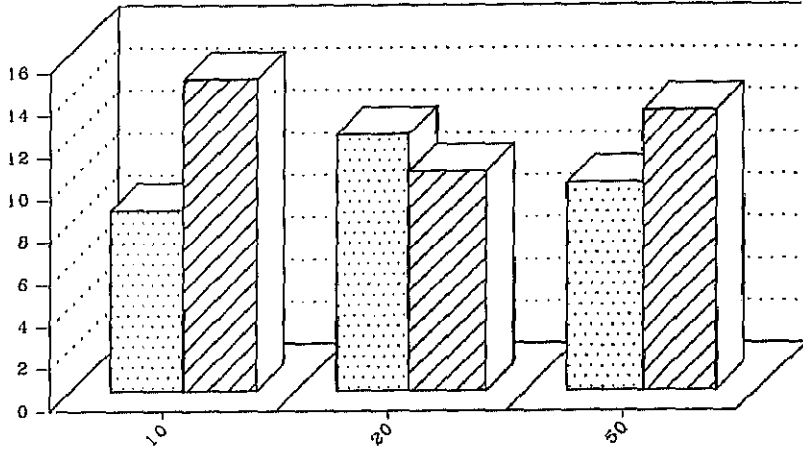


CONTROL	3,37	3,66	-2,94
THC	13,92	7,01	7,57

DOSIS THC (mg/Kg)

PLACA (LAMIDO PATAS DELANTERAS)

TIEMPO (sg)

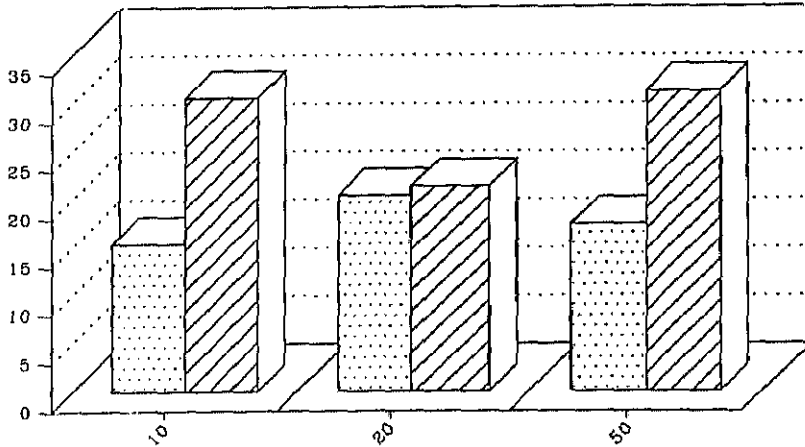


CONTROL	8,57	12,16	9,86
THC	14,76	10,41	13,26

DOSIS THC (mg/Kg)

PLACA (LAMIDO PATAS TRASERAS)

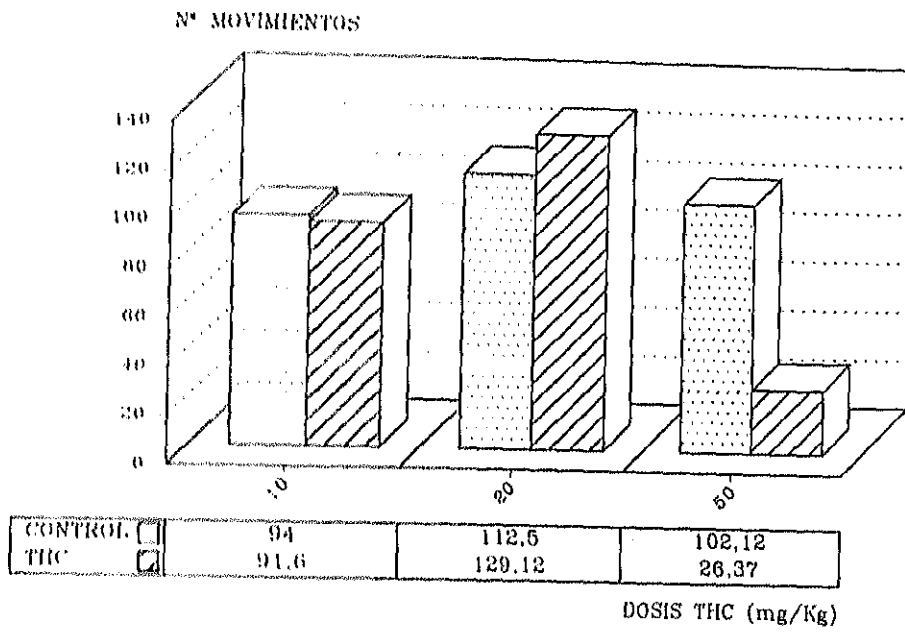
TIEMPO (sg)



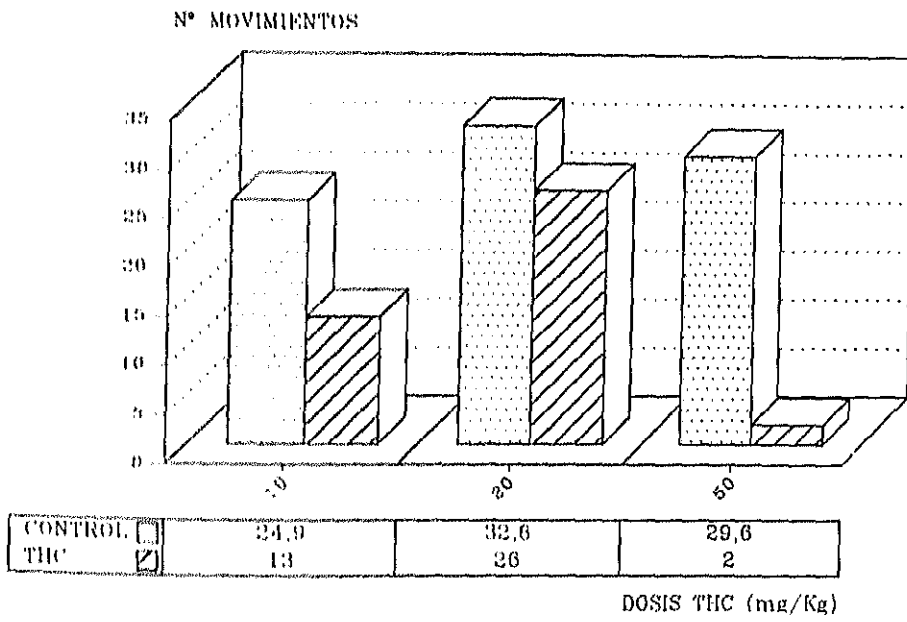
CONTROL	15,34	20,32	17,32
THC	30,5	21,27	31,14

DOSIS THC (mg/Kg)

ACTIVIDAD HORIZONTAL



ACTIVIDAD VERTICAL



B.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Después de analizar los resultados obtenidos tras el estudio de toxicidad y curva dosis/efecto de la resina de *Cannabis*, parece obligado valorar el efecto del principal componente administrado bajo las mismas condiciones.

Como ya hemos comentado anteriormente en otros apartados, muchos son los estudios experimentales que demuestran el efecto bifásico del THC. Por ello, decidimos en primer lugar, comprobar dicho comportamiento empezando con la administración de una dosis baja de Tetrahidrocannabinol, para luego probar otras superiores. Así, establecimos tratamientos con 10 mg/kg como dosis mínima, 20 mg/kg y 50 mg/kg como la máxima. Hay que decir que todos los experimentos se han realizado utilizando la vía intraperitoneal como vía de administración del compuesto, con el fin de mantener los mismos factores de biodisponibilidad y poder establecer una relación de manera más sencilla.

Al mismo tiempo nos proponíamos hacer un estudio comparativo de los efectos desarrollados en animales tratados con resina y animales tratados con el principio activo principal, estableciendo una equivalencia entre las dosis de THC y la proporción de dicho cannabinoide presente en las dosis administradas de *hashish*. Considerando que las resinas empleadas presentaban una proporción de THC entre el 10-13%, el administrar 100, 200 y 500 mg/kg de dichas resinas, era equivalente o similar a la administración de 10, 20 y 50 mg/kg, por supuesto, refiriéndonos exclusivamente al Tetrahidrocannabinol, objetivo fundamental de este estudio parcial.

Pues bien, después de realizar las distintas pruebas, y de prestar una especial atención en el comportamiento animal, observamos que tras la administración de dosis pequeñas de THC (10 y 20 mg/kg), se aprecia un estado de hiper-excitabilidad en los animales tratados; así los ratones muestran una mayor reacción a los estímulos exteriores, se produce un incremento en los gritos, aumento de la actividad motora (especialmente de la horizontal), y no se detecta la marcada hipotermia que experimentaban estos animales tras la administración de las dosis correspondientes de resina, sino que incluso en algunos casos aislados se detecta hipertermia. Por el contrario, una vez administrada la dosis mayor, de 50 mg/kg vuelven a aparecer los efectos que habíamos detectado en los ensayos realizados con la resina, es decir, sedación, hipotermia, hipoactividad, catalepsia... Se prueba así el complejo patrón de efectos

que presentan los cannabinoides, y concretamente el Tetrahidrocannabinol: a dosis bajas estimulación del SNC, y a dosis más elevadas depresión del mismo.

Analizando cada una de las pruebas de la Bateria Farmacológica de Cannabinoides que hemos empleado, empezaremos una vez más por la **Temperatura** corporal. Los resultados muestran una ligerísima disminución de la temperatura de los animales tratados con dosis pequeñas de THC, que aunque presentan diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles, no superan en ningún caso los 0,5 °C. Administrando 500 mg/kg, el efecto hipotérmico se empieza a apreciar, pues el descenso de la temperatura corporal alcanza 1°C. Si bien, dicho efecto hipotérmico es significativamente inferior al producido tras la administración de una dosis de resina que presente una proporción equivalente e incluso inferior de THC, en las que la disminución térmica alcanzaba los 2-3°C.

Con respecto a la **Catalepsia** podemos ver en la tabla de valores y gráficos que se obtienen resultados estadísticamente significativos (** $p < 0,01$) respecto a los lotes control, en las tres dosis administradas; tenemos que decir, sin embargo, que los Índices de inmovilidad obtenidos con las dosis de 10 y 20 mg/kg son inferiores al 20%, y por ello, el efecto no puede ser considerado como cataléptico. Con la dosis de 50 mg/kg este efecto es más evidente (34,1%), pero una vez más, es inferior al mostrado con la administración de las dosis correspondiente de resina (52,8%), como se puede comprobar revisando los resultados del grupo anterior de experimentos.

Pasamos ahora a comparar los efectos producidos sobre la **Actividad motora**; respecto a la actividad vertical la mayor disminución de movimientos se puede observar con la dosis de 50 mg/kg, siendo esta la única dosis con la que se obtienen datos con diferencias estadísticamente significativas respecto al control (** $p < 0,01$). Con 10 y 20 mg/kg el descenso del número de movimientos es algo apreciable, más no existen diferencias significativas. Con la actividad horizontal vemos claramente el efecto estimulante producido con la administración de dosis pequeñas de THC, obteniéndose valores no significativos, pero se detecta un aumento del número de movimientos con respecto al grupo control. Por el contrario, administrando la dosis mayor (50 mg/kg), se manifiesta una marcada hipoactividad, que aún así, sigue siendo menor a la producida por la resina de *Cannabis*.

Por último, observando los resultados de las pruebas de **Analgesia** volvemos a encontrar los datos más dispares. Curiosamente se obtienen valores de %MEP mayores para dosis bajas de THC, siendo en todos los casos estadísticamente significativos comparándolos con el control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Analgesímetro del Foco Luminoso). En el caso del Analgesímetro de la Placa Caliente, ocurre lo mismo produciéndose el máximo efecto a la dosis más pequeña; en este caso, la diferencias con respecto a los controles son estadísticamente significativas, salvo para la dosis de 20 mg/kg en que los resultados no son significativos. Como ya hemos comentado anteriormente la analgesia es un test que está sujeto múltiples factores que pueden producir alteraciones en los resultados. Por ello, teniendo en cuenta el patrón tan característico de los cannabinoides, la vía de administración empleada (i.p.), el sexo de los animales (ratones hembras), etc., podemos dar una explicación a la falta de linealidad y la gran variabilidad mostrada en estos ensayos.

Vistos todos estos resultados, parece claro que si bien se demuestra el comportamiento bifásico (estimulante y depresor) del Tetrahidrocannabinol en función de las dosis, parece cierto que, dada la menor potencia de efecto del principio activo principal (THC) con respecto a la presentada por resina de composición establecida, a dosis equivalentes, los efectos farmacológicos atribuidos a la resina de *Cannabis* no se deban exclusivamente a dicho principio activo, sino que probablemente otros cannabinoides o bien otros compuestos no cannabinólicos, modifiquen dicha actividad potenciándola.

El paso siguiente en este estudio será, por lo tanto, intentar resolver dicha duda, viendo el efecto que provoca la administración de otros cannabinoides.

C.- Efecto del Cannabidiol y Cannabinol

Siguiendo con el estudio y gracias a la aportación del Servicio de Restricción de Estupefacientes, pudimos disponer de otros dos cannabinoides de nuestro interés: CBD y CBN.

Estos ensayos fueron realizados simultaneando los lotes de animales a los que se les administraba cada uno de los compuestos, evitando así una gran cantidad de factores que podrían falsear los resultados.

Para el análisis de estos dos principios activos, la dosis escogida fue única, siendo ésta de 100 mg/kg; una vez más, partíamos de referencias bibliográficas que nos indicaban la menor potencia de estos cannabinoides con respecto al THC. Por ser productos puros, decidimos libremente no aumentar más la dosis, por tratarse ya de una dosis suficientemente elevada, estableciéndola como límite máximo.

Volvemos a recordar, que cada uno de los lotes de animales (CBD, CBN y control), fue sometido a todas las pruebas de la Batería Farmacológica para Cannabinoides, siguiendo las mismas directrices expuestas con anterioridad. Paralelamente se establecen respectivos lotes control a los que solo se les administró 0,2 ml del vehículo (aceite de sésamo).

C.1.- RESULTADOS

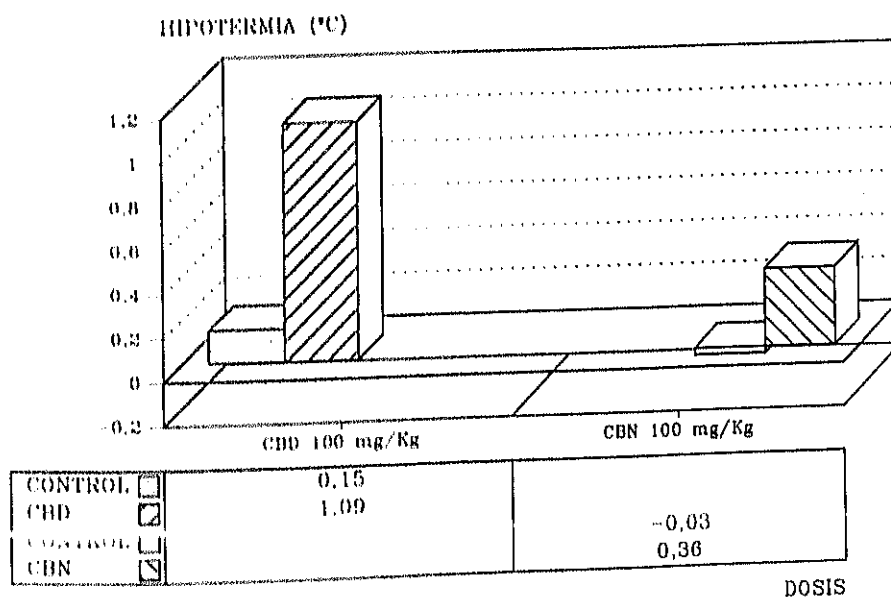
La tabla que figura más abajo recoge un resumen de los resultados (el valor medio con el error estándar) que hemos obtenido en cada una de las pruebas tras la administración de una dosis de 100 mg/kg de CBD y CBN a diferentes lotes de animales. Aparece también la significación estadística. Después, esos mismos resultados los hemos representado gráficamente y para facilitar la comprensión, lo hemos hecho paralelamente, exponiendo CBD y CBN.

	CONTROL	CBD (100mg/kg)	CONTROL	CBN (100 mg/kg)
ΔT (°C)	0,15±0,04	1,09±0,22**	-0,03±0,04	0,36±0,08**
FOCO (%MFP)	-12,21±2,03	-16,84±3,29	-9,52±3,94	-6,73±2,45
PLACA LD (sg)	9,37±0,61	11,92±1,01*	10,97±0,86	11,21±0,99
PLACA LT (sg)	15,29±0,49	27,85±3,47**	17,74±0,58	18,07±0,91
CATALEPSIA(%)	2,64±0,90	8,34±0,89**	1,89±0,47	2,87±0,58
A.VERT.(n°mov)	28,87±4,46	13,87±4,30*	37,89±5,98	30,12±3,58
A.HORIZ.(n°mov)	109,25±9,32	76,25±8,01*	104,55±9,32	93,87±8,68

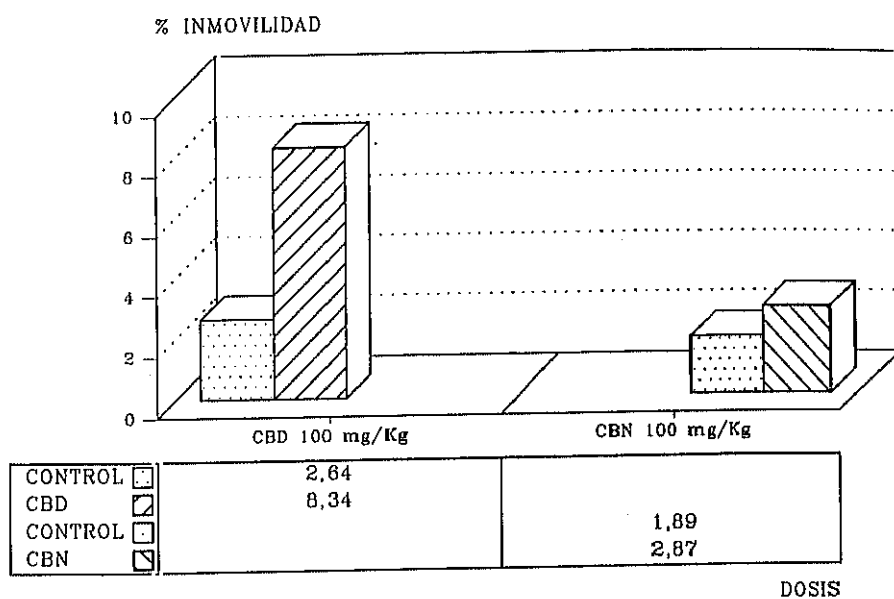
*p<0,05 control vs. problema (t-Student); **p<0,01 control vs. problema (t-Student); n=8. Se representa la media ± el error estándar (x±s).

ΔT: Incremento de temperatura; MFP: Máximo efecto posible; PLACA LD: Placa, lamido de las patas delanteras
 PLACA LT: Placa, lamido de las patas traseras; A.VERT.: Actividad vertical; A.HORIZ.: Actividad horizontal

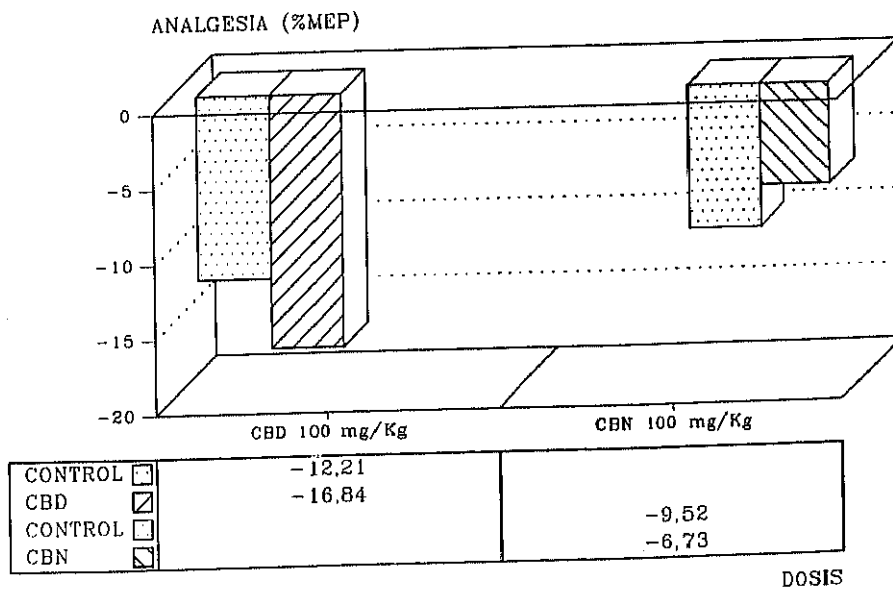
HIPOTERMIA



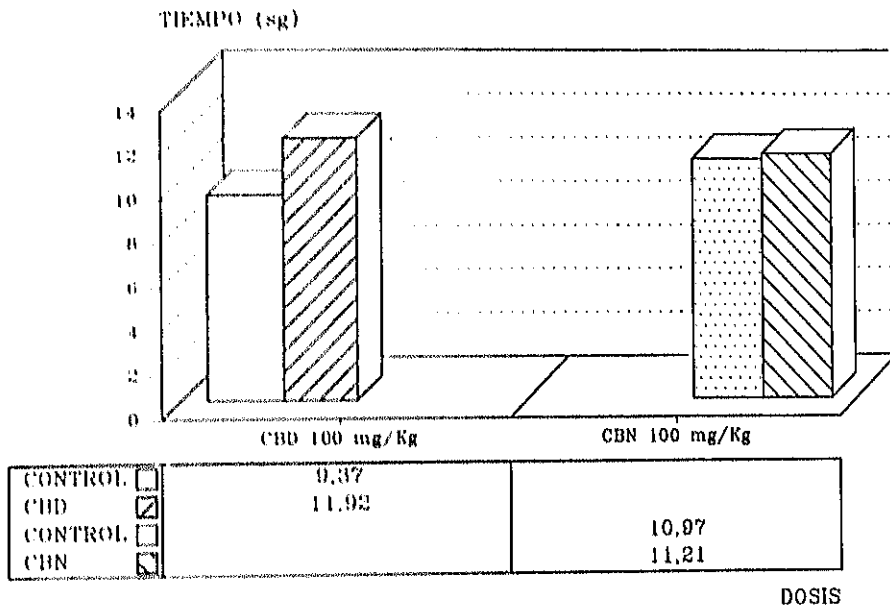
CATALEPSIA



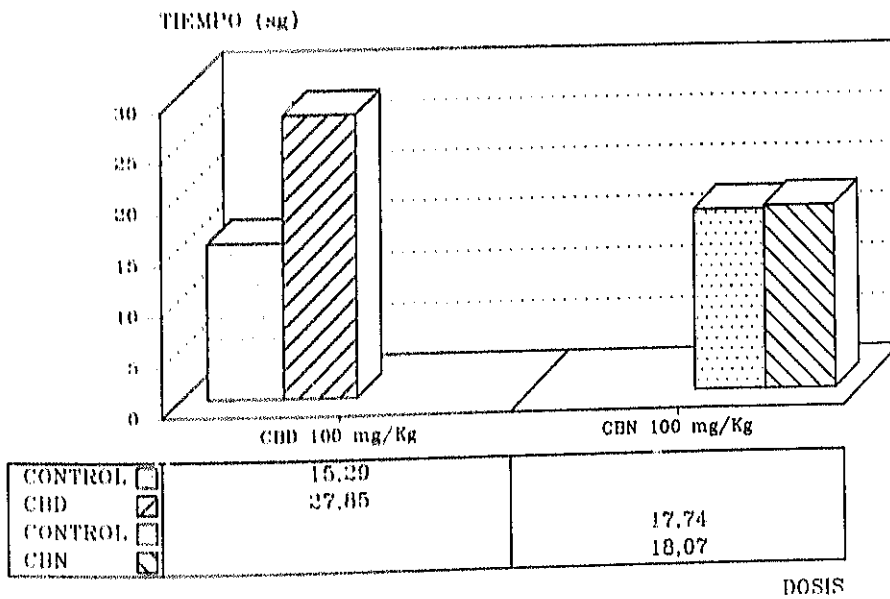
ANALGESIA FOCO



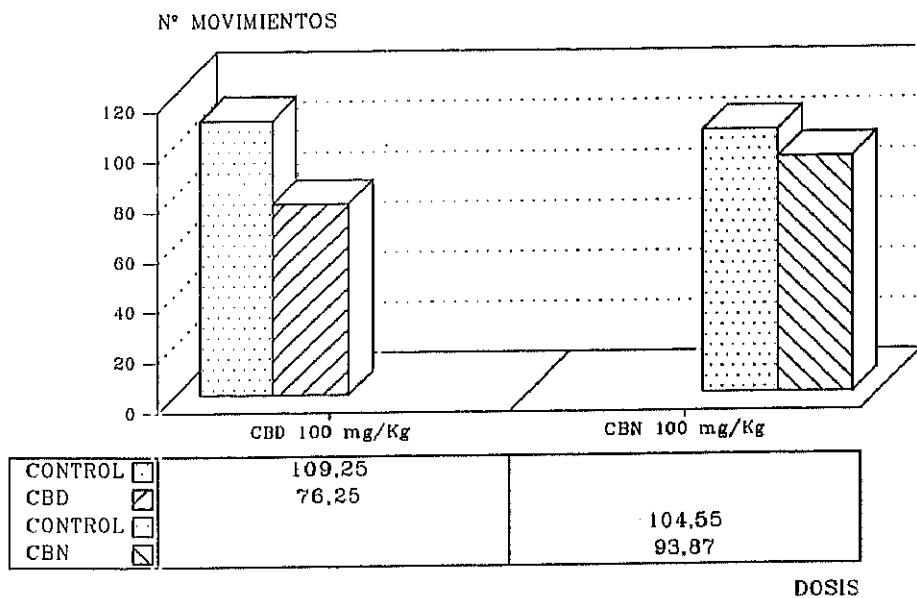
PLACA (LAMIDO PATAS DELANTERAS)



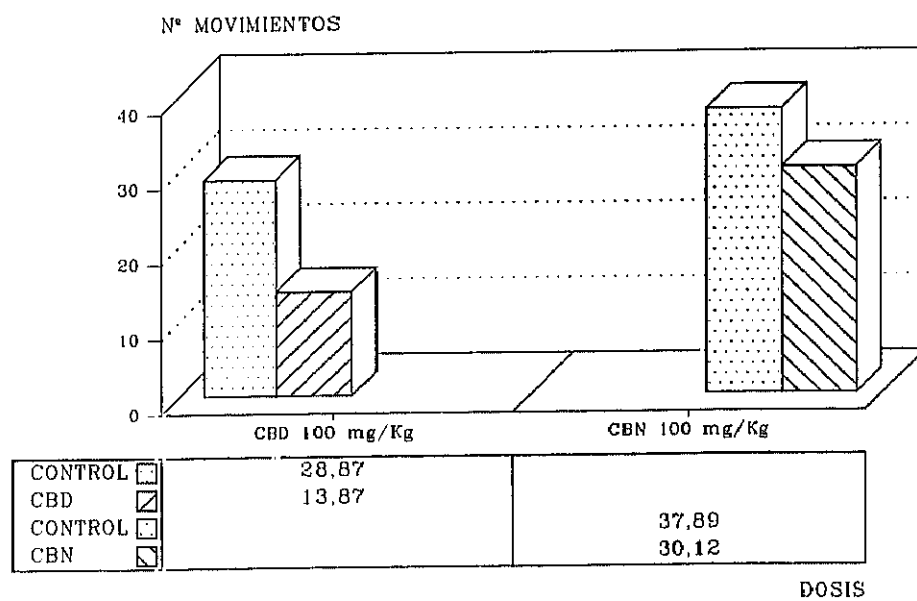
PLACA (LAMIDO PATAS TRASERAS)



ACTIVIDAD HORIZONTAL



ACTIVIDAD VERTICAL



C.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Llegados hasta este punto del trabajo experimental, parecía lógico realizar un análisis farmacológico general de otros compuestos cannabinólicos conocidos, que si bien se encuentran en menor proporción en la resina, podrían producir efectos similares a los del THC.

Para valorar la implicación de otros cannabinoides en la producción de los efectos farmacológicos atribuidos a *Cannabis*, decidimos administrar Cannabinol (CBN) y Cannabidiol (CBD), por ser dos de los cannabinoides más conocidos y de los que disponíamos con mayor facilidad. La consulta de la bibliografía existente nos orientó a escoger la dosis de 100 mg/kg. Por debajo de ella, utilizando la vía intraperitoneal, no se detecta efecto alguno; por otro lado, emplear una dosis mayor que ésta tampoco parecía lógico, dada la pequeña proporción en que se suelen encontrar dichos cannabinoides en las diferentes muestras. Por ello, se administraron en paralelo a diferentes lotes, 100 mg/kg de CBD y 100 mg/kg de CBN, vehiculizados en 0,2 ml de aceite de sésamo. Siguiendo la misma metodología empleada en los experimentos anteriores, los animales se sometieron a los diferentes tests de la Bateria Farmacológica, obteniéndose los resultados expuestos anteriormente.

Tras la administración de la dosis de CBD encontramos que se produce una **hipotermia** de alrededor de 1°C en los animales tratados, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (** $p < 0,01$). Por el contrario, la administración de CBN, muestra un efecto mucho menor, aunque al compararlo con el control, se aprecian también diferencias significativas.

Si observamos los resultados obtenidos en el test de la **Catalepsia**, ninguno de los dos compuestos es capaz de producir un Índice de inmovilidad superior al 20%, con lo que se puede decir que no tienen capacidad cataléptica. Se obtienen diferencias significativas respecto al control en el caso del CBD con un índice del 8,34%, que nos indica un ligero efecto sedante de este compuesto. Corroboramos así lo que Pertwee demostró en cuanto a la ausencia de efecto cataléptico del Cannabidiol (Pertwee, 1972).

Respecto a la **Actividad motora** vemos que una vez más solamente el Cannabidiol consigue disminuir el número de movimientos con respecto al lote control, tanto en la

actividad vertical como en la horizontal (* $p < 0,05$). Con la administración de Cannabinol, los animales muestran un comportamiento similar a los controles.

Lo mismo ocurre con las pruebas de **analgesia**: el CBN no posee efectos antinociceptivos, como se puede comprobar observando los resultados obtenidos tanto con el analgesímetro de la Placa caliente, como con el del Foco calorífico. Tras la administración de CBD, sin embargo, se provoca una ligera analgesia valorable principalmente empleando el analgesímetro de la Placa Caliente, y tomando como umbral al dolor, el lamido de las patas traseras. Este ligero efecto antinociceptivo no es apreciable con el test del Foco luminoso.

No hemos observado tampoco otros efectos conductuales que aparecieron sin embargo en la administración de resina o THC como: **disminución** de movimientos estereotipados, posturas anormales, incoordinación motora, etc.

Por todo lo dicho, podemos concluir que Cannabidiol y Cannabinol son dos cannabinoides presentes en las muestras de *hashish*, que muestran una potencia farmacológica muy inferior al Tetrahidrocannabinol; los resultados demuestran, que de todos los efectos ensayados con la Batería Farmacológica de cannabinoides, el CBD a la dosis ensayada es capaz de producir hipotermia, una ligera analgesia y una pequeña disminución de la actividad motora. El CBN resulta aún menos activo, observándose exclusivamente, un efecto ligeramente hipotérmico. Queda por discutir si la combinación de ambos, e incluso la presencia de otros compuestos puedan contribuir a potenciar dichos efectos.

D.- Estudio del posible efecto de los otros componentes de la resina de *Cannabis*

Para abordar este tema, se nos ocurrió escoger cinco de las muestras de resinas de *Cannabis* y administrarlas tal que la dosis del THC que contengan sea fija, igual para todas ellas. Así, ya no hablaríamos de "dosis de resina", sino de "dosis de THC presente en la muestra". Claro está, aquellas resinas que presenten una gran riqueza en dicho cannabinoide, serán administradas en menor cantidad que aquellas que, por su pobreza en THC requieran un peso mucho mayor para lograr la proporción escogida. Suponiendo que el THC fuera el único responsable de los efectos producidos por la resina, la administración de las diferentes muestras debía arrojar resultados similares. Si por el contrario, éstos fueran muy diferentes, cabría la posibilidad de que el resto de los componentes presentes en la muestra, modificaran en una u otra medida la actividad de los principios activos.

Basándonos en los resultados hasta entonces obtenidos, decidimos fijar la dosis de THC en 20 mg/kg. Para disponer de un mayor espectro de resultados, las muestras ensayadas debían ser representativas tanto de aquellas que poseían una mínima, intermedia y elevada proporción de THC. Con cada una de ellas, se realizaron todas las pruebas de la batería farmacológica para cannabinoides, bajo las mismas condiciones de tratamientos establecidas en el capítulo correspondiente y con la misma secuencia de desarrollo de la experiencia.

En la tabla siguiente recogemos las cinco muestras probadas con la dosis de resina administrada (mg/kg) en cada caso una vez establecida la dosis de THC en 20 mg/kg. De la misma manera, incluimos también la dosis correspondiente de CBD y CBN (mg/kg, en función de su contenido) para cada muestra, así como la proporción conocida de cada uno de sus cannabinoides, pues son datos que nos pueden servir de ayuda a la hora de analizar los resultados.

MUESTRA	% THC	% CBD	% CBN	D RESINA (mg/kg)	D THC (mg/kg)	D CBD (mg/kg)	D CBN (mg/kg)
642	0,745	0,615	0,242	2700	20	16,6	6,5
778	2,355	2,838	2,187	849	20	24	18,5
291	6,025	7,913	1,683	332	20	26,3	5,5
261	8,804	5,107	1,010	247	20	12,6	2,5
241/2	13,70	6,690	1,272	146	20	9,7	1,8

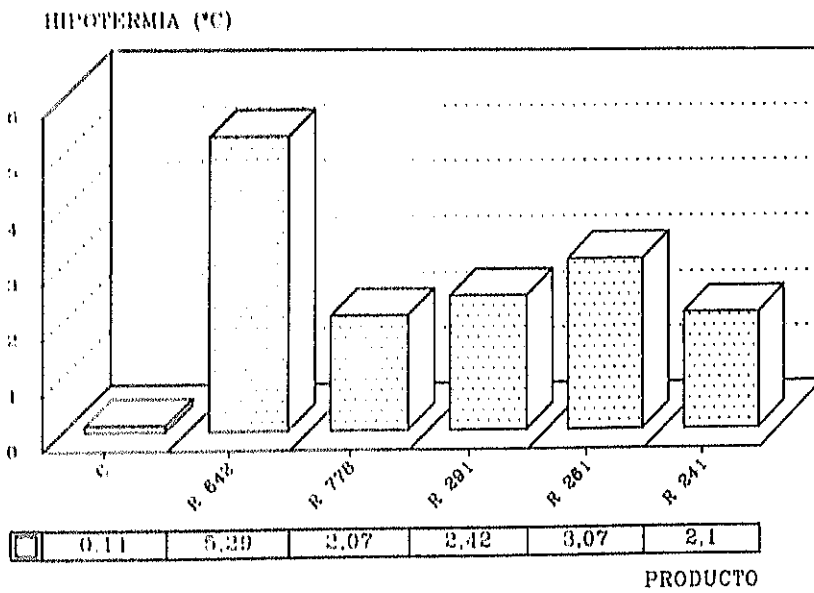
D.1.- RESULTADOS

Los datos obtenidos tras la administración de las distintas resinas fueron los siguientes:

	CONTROL.	RESINA 642	RESINA 778	RESINA 291	RESINA 261	RESINA 241
AT (°C)	0,11±0,15	5,29±0,56	2,07±0,17	2,42±0,15	3,07±0,22	2,10±0,19
FOCO (%MEP)	-9,84±1,08	16,32±7,19	0,21±1,74	3,38±1,49	-3,76±3,78	2,31±1,79
PLACA LD (sg)	9,52±0,26	20,16±1,01	18,85±2,30	17,85±3,39	17,84±2,45	17,47±1,33
PLACA LT (sg)	16,39±0,40	40,88±2,15	29,31±2,16	29,01±2,47	27,84±3,91	28,04±3,07
CATALIPSIA (%)	1,96±0,35	46,86±4,57	54,17±3,17	36,44±3,64	55,29±3,16	30,71±3,16
A.VERI(n°movim)	34,70±1,92	2,87±1,20	1,87±0,44	1,75±0,65	1,50±0,73	2,87±0,74
A.HOR.(n°movim)	115,5±3,14	19,12±3,64	20,00±4,21	32,75±4,83	24,75±5,65	31,62±5,21

nº8. Se representa la media ± el error estándar (xte). La significación estadística se representa al pie de cada una de las gráficas siguientes.

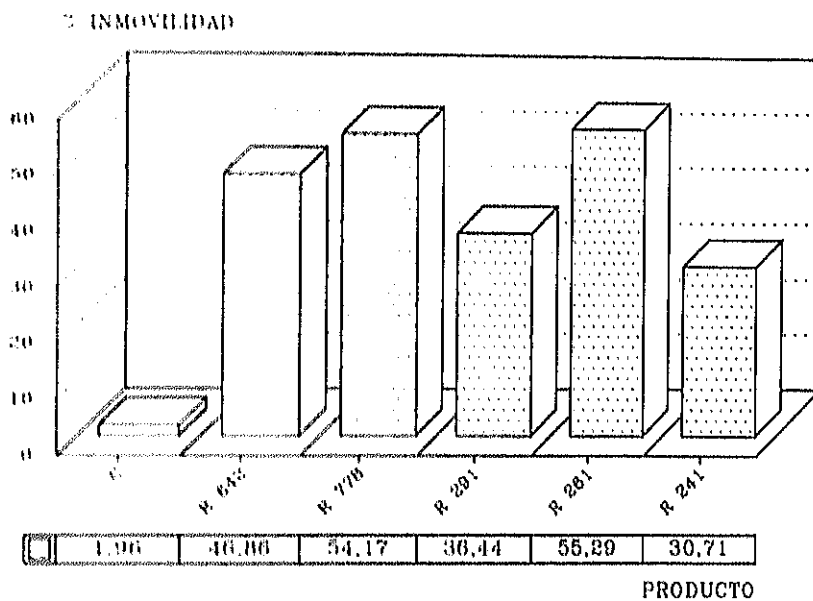
HIPOTERMIA RESINAS
D THC 20mg/kg



	R642	R778	R291	R261	R241/2
CONTROL.	**	**	**	**	**
R642		**	**	**	**
R261		**	*		**

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

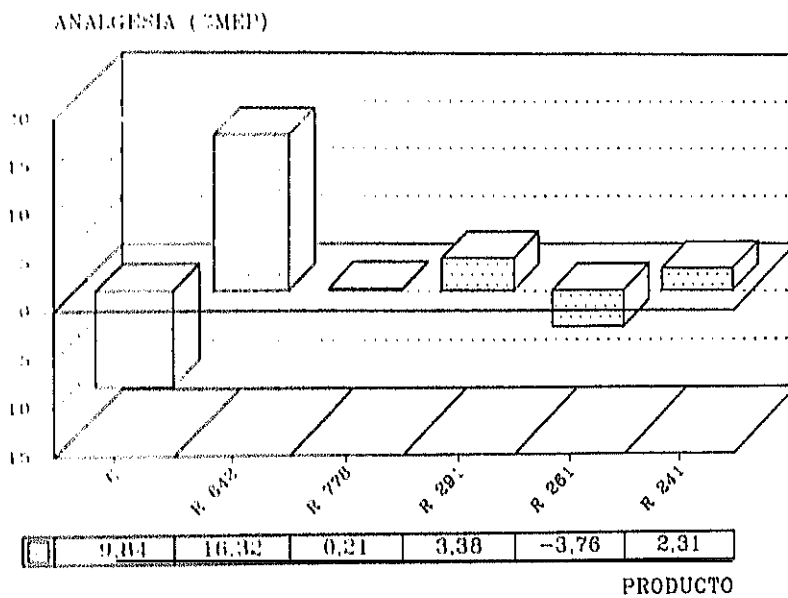
CATALEPSIA RESINAS
D THC 20mg/kg



	R642	R778	R291	R261	R241/2
CONTROL	**	**	**	**	**
R778	+		**		**
R261	+		**		**

**p<0,01; +p<0,05 (Newman-Keuls).

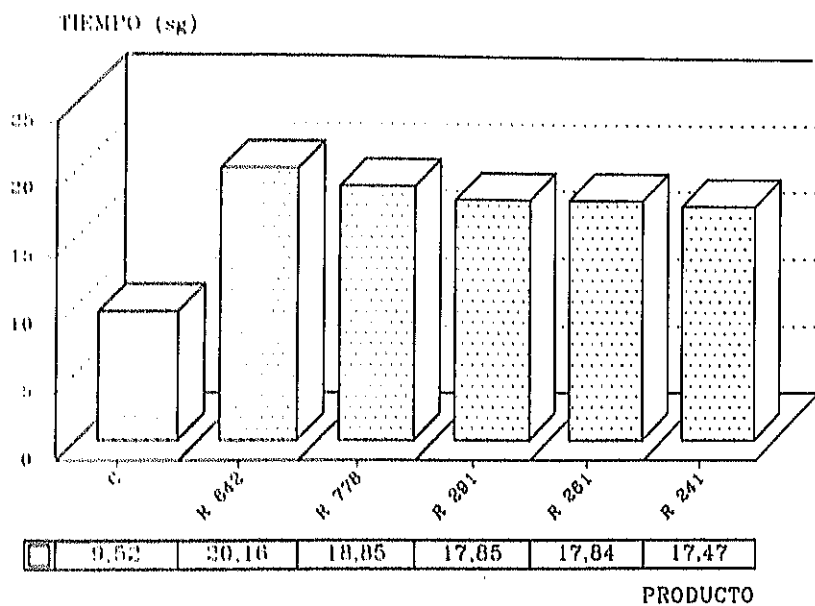
ANALGESIA FOCO RESINAS
D THC 20mg/kg



	R642	R778	R291	R261	R241/2
CONTROL	**	+	**		**
R642		**	**	**	**

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

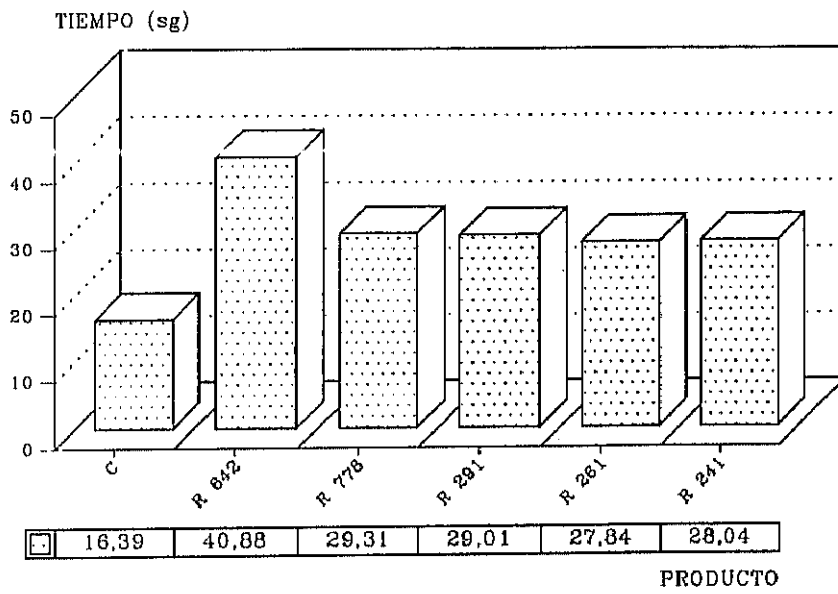
PLACA (LAMIDO PATAS DELANTERAS) RESINAS
D THC 20mg/kg



	R642	R778	R291	R261	R241/2
CONTROL	**	**	**	**	**

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

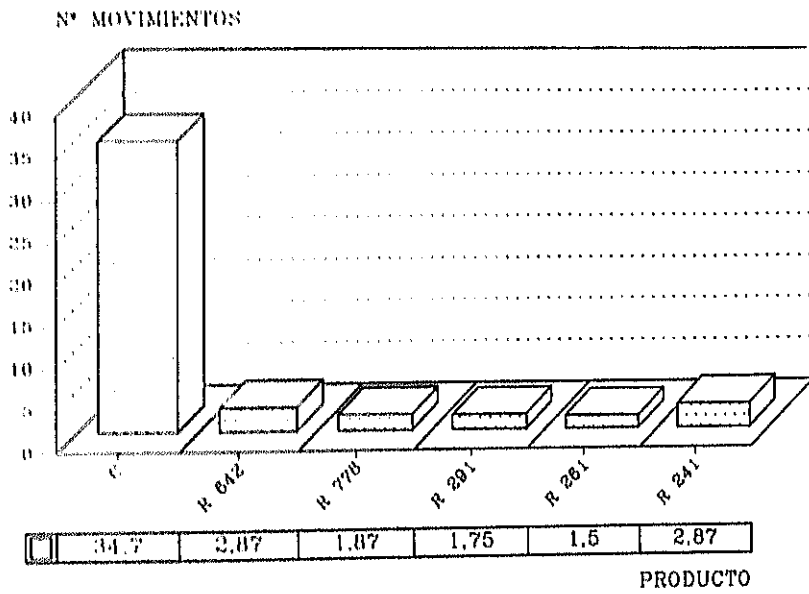
PLACA (LAMIDO PATAS TRASERAS) RESINAS
D THC 20mg/kg



	R642	R778	R291	R261	R241/2
CONTROL	**	**	**	**	**
R642		**	**	**	**

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

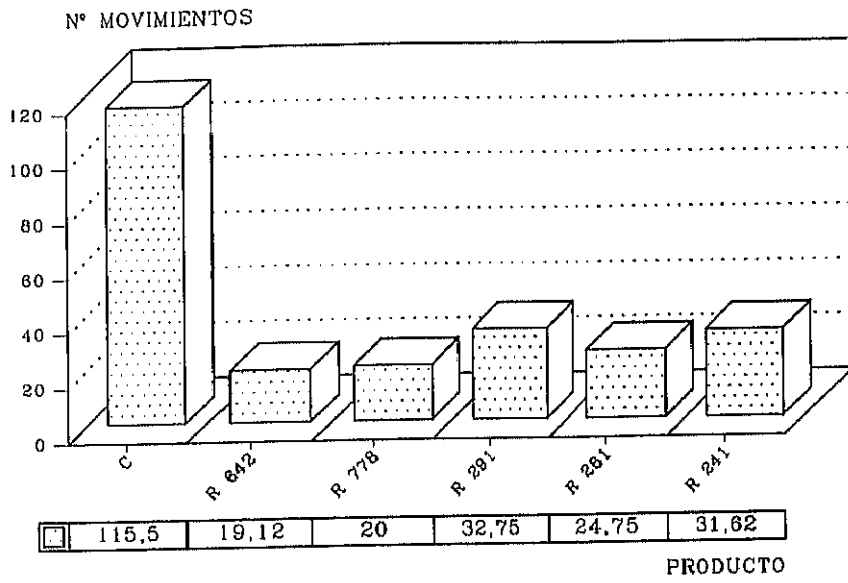
ACTIVIDAD VERTICAL RESINAS
D THIC 20mg/kg



	R642	R778	R291	R261	R241/2
CONTROL	**	**	**	**	**

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

ACTIVIDAD HORIZONTAL RESINAS
D THC 20mg/kg



	R642	R778	R291	R261	R241/2
CONTROL	**	**	**	**	**

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

D.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Tras la administración de las distintas muestras de resina de *Cannabis* (una vez fijada la dosis de 'THC' en 20 mg/kg), podemos observar que se produce en todos los casos los diferentes efectos farmacológicos y comportamentales característicos de dicha droga; si bien, es cierto, que encontramos notables diferencias entre unas y otras, después de comparar los resultados. Nuestro objetivo es conocer si estos efectos son debidos al THC, o si por el contrario a los otros cannabinoides u otros componentes pueden contribuir a la actividad; de ahí, el que hayamos decidido equiparar todas las muestras en lo que se refiere a la proporción de Tetrahidrocannabinol administrada. Hacemos a continuación una valoración de cada uno de los tests realizados, comparando el resultado de unas resinas con otras.

Respecto a la **hipotermia**, es la resina 642 la que logra una disminución de la temperatura corporal mayor, que alcanza los 5°C. El resto, provoca un efecto también notable, pero inferior. Hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en todos los casos; además, como hemos apuntado en la tabla anterior, también existen diferencias entre el efecto de la resina 642 y el resto de las muestras.

El efecto **ataléptico** también se deja notar tras la administración de todas las muestras de resina. En este caso el efecto mayor se logra con las muestras 261 y 778. Una vez más, todas ellas producen resultados con diferencias estadísticamente significativas respecto al control. Encontramos índices de inmovilidad que van desde el 30% hasta el 55%, en función de la muestra. Las diferencias estadísticas entre las diferentes resinas, quedan resumidas al pie de la gráfica correspondiente.

Curiosamente, en el caso de la **actividad motora**, se produce una reducción de movimientos similar en todas ellas, no encontrándose diferencias significativas entre unas y otras, pero, por supuesto, sí entre cada una de ellas y el control. Vemos en los gráficos la marcada hipoactividad tanto vertical como horizontal que acusan los animales después del tratamiento. Valorando al mismo tiempo los efectos conductuales, encontramos en la mayoría de los casos: disminución de movimientos estereotipados, sedación, posturas anormales, incoordinación motora, etc.

En el caso de los test de **analgesia**, es la resina número 642 la que de nuevo destaca por su mayor poder antinociceptivo, apreciable con los dos analgesímetros empleados. El resto de las muestras presentan un efecto analgésico detectado principalmente con el analgesímetro de la Placa caliente, como podemos apreciar al obtener mayores diferencias con respecto al control empleando dicho test, y especialmente considerando como umbral doloroso el lamido de las patas traseras.

Haciendo un resumen que destaque los efectos mayoritarios de cada una de las resinas ensayadas, podemos apreciar que:

- La muestra nº **642** produce marcados efectos de hipotermia, catalepsia, analgesia e hipoactividad.
- La segunda resina (**778**) destaca por la acción cataléptica, superior incluso a la de la muestra anterior, hipoactividad motora y disminución considerable de la temperatura corporal.
- La muestra nº **291** con efectos moderados de hipotermia y catalepsia, presenta marcada hipoactividad y cierto efecto analgésico.
- De la resina **261** destacar principalmente el potente efecto cataléptico, así como la fuerte hipoactividad que manifiestan los animales tratados con ella. Respecto a los otros tests, se presentan características similares al resto de las demás muestras, con excepción de la 642.
- Por último, la muestra **241/2** aunque presenta todos los efectos descritos anteriormente, es menor en la mayoría de los casos.

Como ya hemos dicho, las dosis de resina administradas están ajustadas respecto a la de THC. Queriendo encontrar un cannabinoide responsable de la potenciación de los efectos, hemos ido comparando muestra por muestra, estudiando la proporción de CBD y CBN presente en cada una de ellas. Es ahora cuando nos apoyamos en la tabla que recoge la relación entre proporción y dosis de estos dos cannabinoides en función de la dosis administrada de resina una vez establecida la de THC. Resulta difícil establecer una relación clara y congruente con la que podamos responsabilizar a uno u otro cannabinoide de la

implicación en los efectos farmacológicos. Podemos comprobar, que precisamente la muestra 642, que resulta ser una de las más potentes, es la más pobre en lo que se refiere a % de cannabinoides; por ello, llegamos a la conclusión de que al tener que administrar una cantidad (en mg) mayor de resina para lograr establecer los 20 mg/kg de THC establecidos, sean el resto de los componentes resínicos los que produzcan esa potenciación de los efectos. Precisamente, la muestra 241/2, que presenta mayor riqueza en THC y por tanto es administrada en menor dosis resínica, es la que produce efectos menores, aunque ciertamente los produzca.

E.- Potenciación o inhibición del efecto farmacológico de los diferentes principios activos tras una administración conjunta

Por último, y para completar este análisis farmacológico de la resina de *Cannabis* y los principales cannabinoides, decidimos estudiar la posible modificación de los efectos farmacológicos de estos principios activos al ser administrados conjuntamente; comparando éste con el efecto de cada uno de ellos por separado, intentamos elucidar si son ellos mismos los causantes de la potenciación o inhibición de dichos efectos.

El planteamiento del experimento, en este caso, fue sencillo:

- Administrar en primer lugar CBD+CBN conjuntamente a un lote problema (por supuesto, contrastado siempre con un lote control), y someterlo a los tests de la tantas veces nombrada Bateria Farmacológica para Cannabinoides.
- En segundo lugar, y de la misma manera, hacer una administración triple, es decir, inyectar los tres cannabinoides (THC+CBD+CBN), todos ellos disueltos en un volumen de 0,2 ml/ratón del vehículo adecuado (aceite de sésamo), y estudiar los efectos producidos.
- EN tercero y último lugar, comparar los resultados con los obtenidos tras la administración del principal principio activo (THC).

Con todo esto, y los datos obtenidos en el resto de los experimentos planteados anteriormente, podríamos sacar información interesante para nuestros propósitos.

Las dosis escogidas para la administración simultánea de dichos compuestos fueron las siguientes: 100 mg/kg para el CBD; 100 mg/kg para el CBN y 50 mg/kg para el THC, todos ellos siempre administrados en un volumen de 0,2 ml/ratón del vehículo.

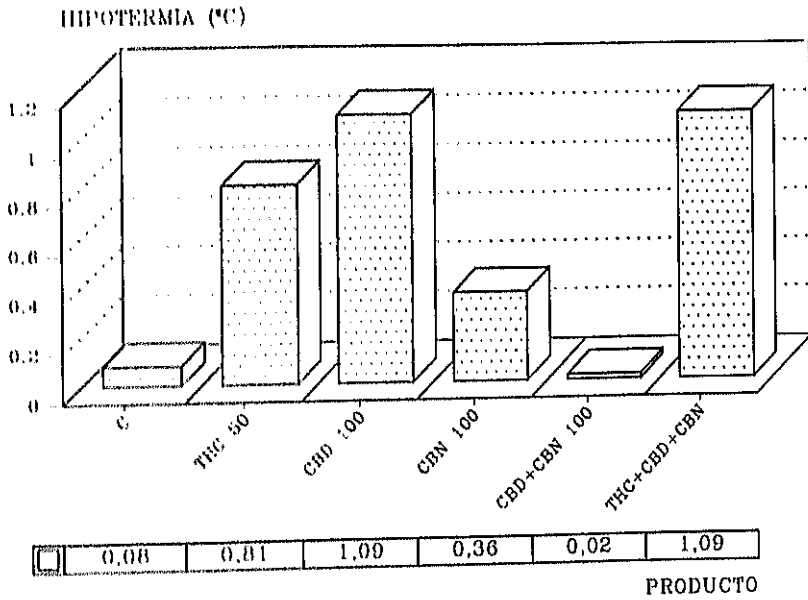
Los animales fueron sometidos a todos los tests de la Bateria Farmacológica, siguiendo el orden establecido en un principio y bajo las mismas condiciones que en el resto de los experimentos desarrollados anteriormente. Paralelamente, trabajamos con un lote control; los resultados se sometieron al test estadístico de *Newman-Keuls* para valorar las diferencias estadísticas existentes entre los diferentes lotes establecidos.

E.1.- RESULTADOS

	CONTROL	THC	CBD	CBN	CBD+CBN	THC+CBD+CBN
ALT(°C)	0,08±0,01	0,81±7,90	1,09±0,22	0,36±0,08	0,02±0,03	1,09±0,13
FOCO (%MEP)	-10,52±1,46	7,57±2,55	-16,84±3,29	-6,74±2,45	-6,71±3,19	2,55±2,93
PLACA LD (sg)	9,57±0,35	13,26±0,83	11,92±1,01	11,21±0,99	11,54±0,79	13,89±0,75
PLACA LT (sg)	19,39±0,35	31,14±1,38	27,85±3,47	18,07±0,91	21,82±1,29	29,42±1,52
CATALEPSIA(%)	1,92±0,26	34,14±4,13	8,34±0,89	2,87±0,58	10,59±2,81	70,55±6,81
A. VERT(n°mov)	35,58±2,82	2,00±0,75	13,87±4,30	30,12±3,58	19,00±4,62	1,87±0,64
A. HORI(n°mov)	114,15±4,70	26,37±5,65	76,25±8,01	93,87±8,68	67,25±8,48	20,12±5,30

n°8. Se representa la media ± el error estándar (x±e). La significación estadística se representa al pie de cada una de las gráficas siguientes.

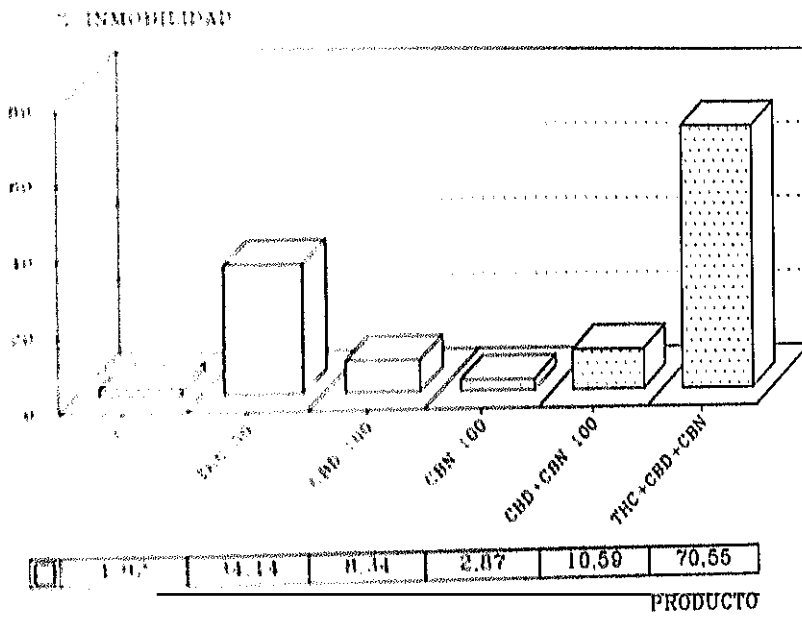
HIPOTERMIA



	THC	CBD	CBN	CBD+CBN	CBD+CBN+THC
CONTROL	**	**	**		**
THC		*	**	**	
CBD	*		**	**	**
CBN	**	**		*	**

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

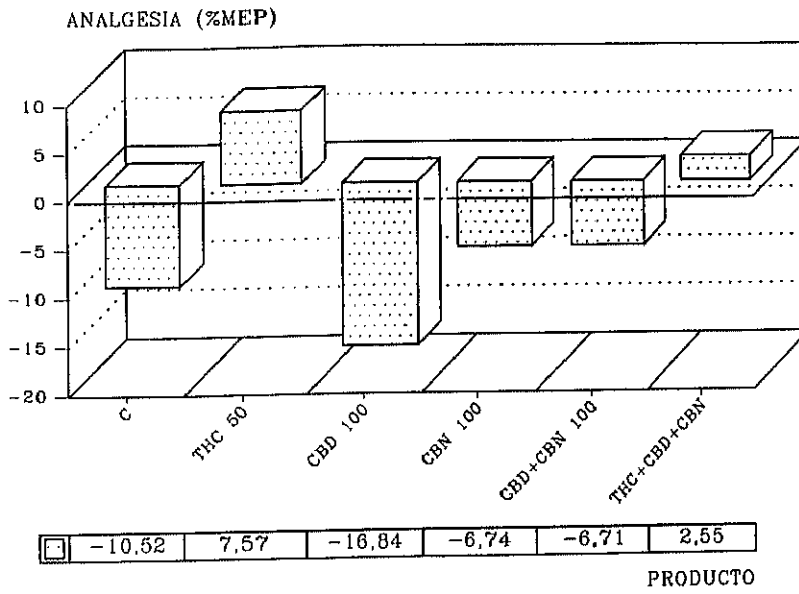
CATALEPSIA



	THC	CBD	CBN	CBD+CBN	CBD+CBN+THC
CONTROL	**			*	**
THC		**	**	**	
THC+CBD+CBN	**	**	**	**	

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

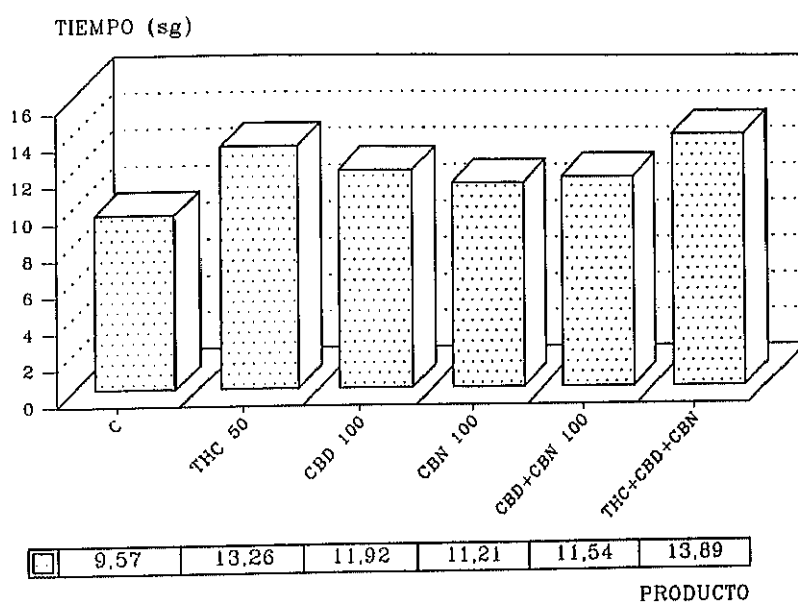
ANALGESIA FOCO



	THC	CBD	CBN	CBD+CBN	CBD+CBN+THC
CONTROL	**				**
THC		**	*	**	
THC+CBN+CBN	**	**		*	

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

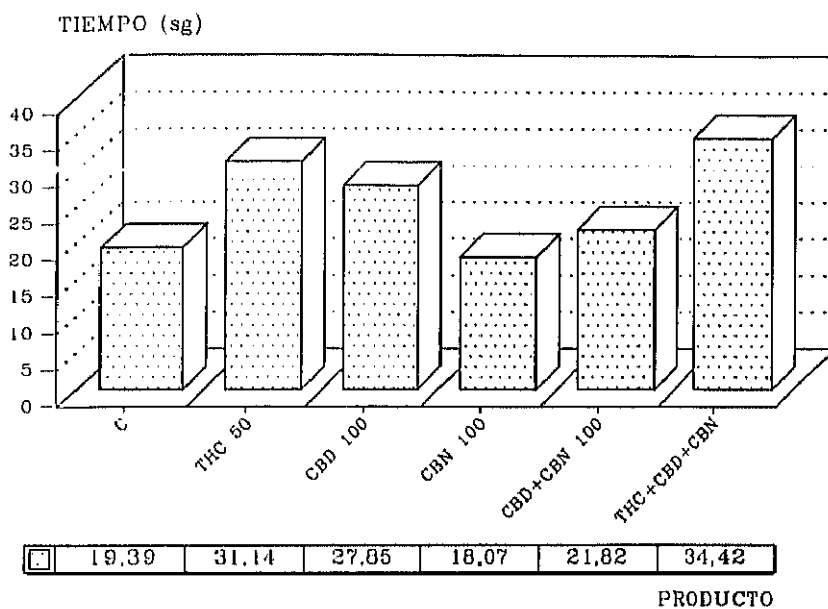
PLACA (LAMIDO PATAS DELANTERAS)



	THC	CBD	CBN	CBD+CBN	CBD+CBN+THC
CONTROL	**				**

** p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

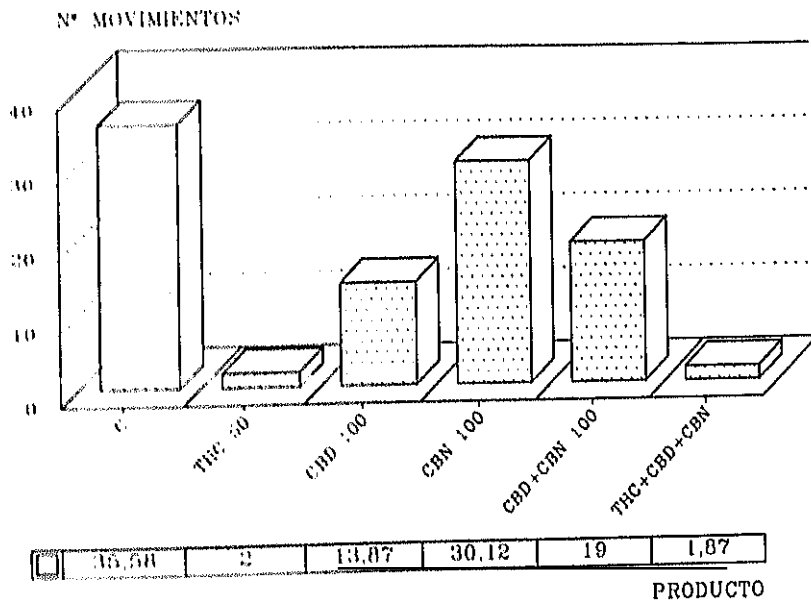
PLACA (LAMIDO PATAS TRASERAS)



	THC	CBD	CBN	CBD+CBN	CBD+CBN+THC
CONTROL	**	**			**
THC			**	**	
THC+CBN+CBN			**	**	

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

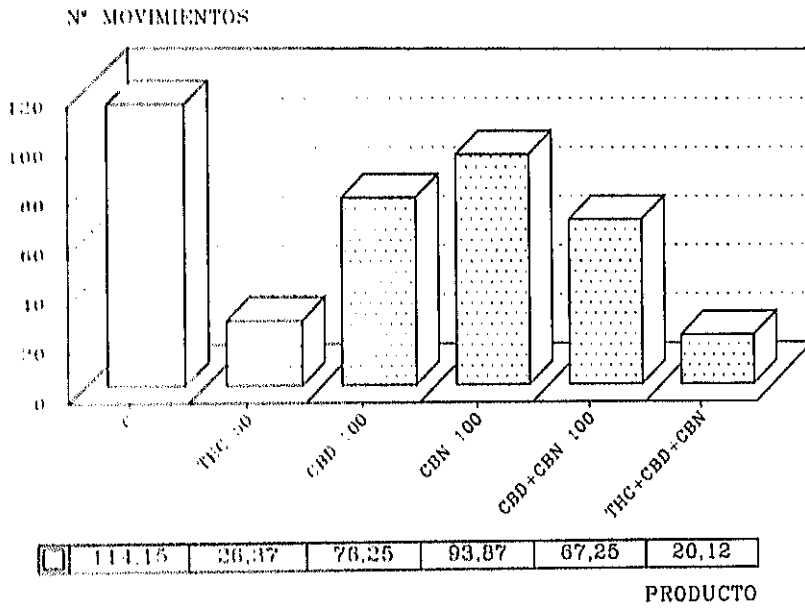
ACTIVIDAD VERTICAL



	THC	CBD	CBN	CBD+CBN	CBD+CBN+THC
CONTROL	**	**		**	**
THC			**		
THC+CBD+CBN			**		

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

ACTIVIDAD HORIZONTAL



	THC	CBD	CBN	CBD+CBN	CBD+CBN+THC
CONTROL	**	**	*	**	**
THC		**	**	**	
THC+CBD+CBN		**	**	**	

**p<0,01; *p<0,05 (Newman-Keuls).

E.2.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Para terminar con este estudio farmacológico de la resina de *Cannabis* y de sus principios activos, no podíamos dejar a un lado el estudio de la potenciación de los propios cannabinoides entre sí. Por ello, al disponer de tres de ellos, decidimos administrarlos conjuntamente, con el fin de establecer una analogía con la resina entera, y luego comparar su efecto con el de ellos mismos por separado.

En la representación gráfica correspondiente a la medida de la **temperatura**, podemos observar la existencia de hipotermia principalmente en los lotes administrados con THC (50 mg/kg), CBD (100 mg/kg), siendo mucho menor después de la administración de CBN (100 mg/kg). Tras la administración de los dos cannabinoides minoritarios (CBD+CBN, 100 mg/kg), se produce sorprendentemente una inhibición del efecto hipotérmico del CBD. Sin embargo la administración concomitante de los tres produce una ligera potenciación del efecto inicial de THC. En todos los casos se observan diferencias estadísticamente significativas con respecto al control.

Respecto a la **catalepsia**, ya habíamos visto que el THC es el cannabinoide responsable de dicho fenómeno; no obstante se logra una gran potenciación del efecto una vez administrados en conjunto, pasando de un índice para el THC del 30% a más del 70%. La estadística nos lo demuestra, pues se obtienen diferencias significativas (** $p < 0,01$) entre el lote THC+CBD+CBN y el resto de los lotes establecidos.

En cuanto a la **actividad motora**, tenemos que decir que tanto para la vertical como para la horizontal, la administración de CBD+CBN consigue una disminución del número de movimientos mayor que la administración de dichos cannabinoides por separado. Los animales tratados con la mezcla de los tres cannabinoides muestran una fuerte disminución motora, que es similar a la que presentan aquellos tratados exclusivamente con THC, sin que exista potenciación del efecto; así podemos ver que entre estos dos grupos no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Por último, siguiendo el orden establecido desde el principio, valoraremos ahora los resultados obtenidos en los test de **analgesia**. En el primer caso, con el analgesímetro del Foco luminoso, el lote de animales que presenta un %MEP mayor es el tratado con THC,

obteniéndose diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de los lotes, salvo el lote THC+CBD+CBN, respecto al cual no existen diferencias. En este caso no podemos decir que exista potenciación del efecto antinociceptivo del THC, aunque sí es cierto que el conjunto de los tres produzca un efecto mayor que por sí solos. Con el analgesímetro de la Placa caliente, sí observamos una ligera potenciación tras la administración conjunta de los tres compuestos en estudio, considerando el umbral doloroso el lamido de patas delanteras y traseras.

Vistos los resultados anteriores y haciendo un análisis comparativo de los datos obtenidos llegamos a la conclusión de que CBD y CBN pueden potenciar en mayor o menor medida algunos de los efectos del THC; tal es el caso de la catalepsia, la hipotermia y la analgesia. Si bien, parece claro que es el Tetrahidrocannabinol el cannabinoide responsable de la mayoría de las acciones. Por otro lado, la interacción de estos compuestos puede ser indiferente o incluso ligeramente inhibitoria en el resto de las propiedades estudiadas.

CONCLUSIONES

"... para la policía, una amenaza; para los traficantes, un lucro peligroso;..."

CONCLUSIONES

1.- El Tetrahidrocannabinol es el responsable no sólo de los efectos farmacológicos, sino también de la letalidad que poseen las muestras de Cáñamo: a mayor proporción de THC, menor DL_{50} . Sin embargo, se puede considerar la resina de *Cannabis* como atóxica en cuanto a letalidad, dadas las DL_{50} tan elevadas que se obtienen con las muestras ensayadas.

2.- Con el método empleado y bajo nuestras condiciones experimentales, podemos decir que el *hashish* induce una insuficiencia cardíaca de tipo aguda, que se manifiesta por congestión generalizada, especialmente a nivel pulmonar con edema y microhemorragias; en hígado se observan cambios inespecíficos iniciales, y posteriormente alteraciones citoplasmáticas de tipo "tóxico" similares a las observadas en la hepatopatía alcohólica humana.

3.- Tanto la resina como otros derivados de *Cannabis*, así como los principales cannabinoides, son capaces de producir hipotermia, analgesia, disminución de la actividad motora y catelepsia.

4.- Con el estudio farmacológico realizado con el *hashish*, se demuestra que la mayoría de las pruebas de la Bateria Farmacológica para cannabinoides guardan una relación dosis/efecto lineal. Por el contrario, encontramos gran variabilidad en la valoración de la analgesia; esta prueba farmacológica puede sufrir grandes variaciones en función de múltiples factores (vía de administración, sexo del animal, estación del año, hora del día,...).

5.- Hemos confirmado la mayor potencia farmacológica del Tetrahidrocannabinol respecto al resto de cannabinoides estudiados, Cannabidiol y Cannabinol, siendo a su vez el CBD más activo que el CBN. Estos dos cannabinoides, administrados por vía intraperitoneal muestran actividad hipotermizante, y una ligera disminución motora y analgésica.

6.- La administración de la resina entera proporciona efectos mayores que los producidos tras la administración de dosis equivalentes de THC; esto hace suponer que en la resina de *Cannabis* existen otros componentes, cannabinólicos o no, que contribuyen en los efectos descritos.

7.- Podemos decir que tras la administración conjunta de los tres cannabinoides mayoritarios de la resina de *Cannabis*, se produce una ligera potenciación del efecto inicial del Tetrahidrocannabinol. Sin embargo, todo parece indicar que sean el resto de los componentes resínicos los principales responsables de la potenciación de dichos efectos.

Queda por elucidar cuáles son los compuestos implicados en la potenciación farmacológica de los cannabinoides, estudio que será objeto de futuras investigaciones. Consideramos también que sería preciso profundizar en el estudio histológico evolutivo, no sólo a nivel ultraestructural sino también a nivel histoquímico. El modelo experimental empleado para el estudio de toxicidad aguda, dada su sencillez y el escaso tiempo necesario para su realización, podría ser útil para el mejor conocimiento de los cambios inespecíficos hepatocitarios que se inducen frente a múltiples agentes agresores tanto tóxicos como infecciosos.

BIBLIOGRAFÍA

"... para los convictos y sus familias, una fuente de desgracias."

T.H. Mikuriya

BIBLIOGRAFÍA

- ABOOD, M.E.; MARTIN, B.R.-"Neurobiology of marijuana abuse". *Trends Pharmacol. Sci.*, 3, 201-206, (1992).
- AGURELL, S.; HALLDIN, M.; LINDGREN, J.E.; OHLSSON, A.; WIDMAN, M.; HILLESPIE, H.; HOLLISTER, L.-"Pharmacokinetics and metabolism of Δ^1 -tetrahydrocannabinol and other cannabinoids with emphasis on man". *Pharmacol. Rev.*, 38, (1), 11-4, (1986).
- ANDRÉASSON, S.; ALLEBECK, P.; ENGSTRÖM, A.; RYDBERG, U.-"Cannabis and schizophrenia. A longitudinal study of swedish conscripts". *Lancet*, 1483-1485, (1987).
- BARNETT, G.; LICKO, V.; THOMPSON, T.-"Behavioral pharmacokinetics of marijuana". *Psychopharmacol.*, 85, 51-56, (1985).
- BARINAGA, M.-"Pot, Heroin unlock new areas for neuroscience". *Science*, 258, 1882-1884, (1992).
- BIDAUT-RUSSELL, M.; DEVANE, W.A.; HOWLETT, A.C.-"Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain". *J. Neurochem.*, 55, (1), 21-25, (1990).
- BONABOULA, M.; RINALDI, M.; CARAYON, P.; CARILLON, C.; DELPECH, B.; SHIRE, D.; LEFUR, G.; CASELLAS, P.-"Cannabinoid-receptor expression in human leukocytes". *Eur. J. Biochem.*, 214, 173-180, (1993).
- CHEREK, D.R.; ROACHE, J.D.; EGLI, M.; DAVIS, C.; SPIGA, R.; COWAN, K.-"Acute effects of marijuana smoking on aggressive, escape and point-maintained responding of male drug users". *Psychopharmacology*, 111, 163-168, (1993).
- COMPTON, D.R.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; MARTIN, B.R.-"Pharmacological profile of a serie of bicyclic cannabinoid analogs: Classification as cannabimimetic agents". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 260, (1), 202-209, (1991).

-
- * COMPTON, D.R.; PRESCOTT, W.R.; MARTIN, B.R.; SIEGEL, C.; GORDON, P.M.; RAZDAN, R.K.-"Synthesis and pharmacological evaluation of ether and related analogues of Δ^8 -, Δ^9 -, and $\Delta^{9,11}$ -Tetrahydrocannabinol". *J. Med. Chem.*, 34, 3310-3316, (1991).
- * COMPTON, D.R.; MARTIN, B.R.-"Pharmacological evaluation of water soluble cannabinoids and related analogs". *Life Sci.*, 46, 1575-1585, (1992).
- * COMPTON, D.R.; GOLD, L.H.; WARD, S.J.; BALSTER, R.L.; MARTIN, B.R.-"Aminoalkylindole analogs: Cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from Δ^9 -Tetrahydrocannabinol". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263, (3), 1118-1126, (1992).
- * COMPTON, D.R.; KENNER, C.R.; DE COSTA, B.R.; RAZDAN, R.K.; MELVIN, L.S.; JOHNSON, M.R.; MARTIN, B.R.-"Cannabinoid structure-activity relationships: Correlation of receptor binding and *in vivo* activities". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265, (1), 218-226, (1992).
- * D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L.-"A method for determining loss of pain sensation". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 72, 74-79, (1941).
- * DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; HOWLETT, A.C.-"Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain". *Mol. Pharmacol.*, 34, 605-613, (1988).
- * DEVANE, W.A.; BREUER, A.; SHESKIN, T.; JÄRBE, T.U.C.; EISEN, M.S.; MECHOULAM, R.-"A novel probe for the cannabinoid receptor". *J. Med. Chem.*, 35, 2065-2069, (1992).
- * DEVANE, W.A.; HANUŠ, L.; BREUER, A.; PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R.-"Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor". *Science*, 258, 1946-1949, (1992).
- * DEWEY, W.L.-"Cannabinoid pharmacology". *Pharmacol. Rev.*, 38, (2), 151-178, (1986).
-

-
- * DIGREGORIO, G.H.; STERLING, G.H.-"Marijuana pharmacology and urine testing". *Clin. Pharmacol.*, 35, (6), 209-212, (1987).
- * DI MARZO, V.; FONTANA, A.; CADAS, H.; SCHINELLI, S.; CIMINO, G.; SCHWARTZ, J.C.; PIOMELLI, D.-"Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons". *Nature*, 372, 686-691, (1994).
- * EVANS, A.T.; FORMUKONG, E.A.; EVANS, F.J.-"Actions of *Cannabis* constituents on enzymes arachinodato metabolism antiinflammatory potential". *Biochem. Pharmacol.*, 36, (12), 2037-2040, (1987).
- * FELDER, C.C.; VELUZ, J.S.; WILLIAMS, H.L.; BRILEY, E.M.; MATSUDA, L.A.-"Cannabinoid agonist stimulates both receptor- and non- receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones". *Mol. Pharmacol.*, 42, 838-845, (1992).
- * FELDER, C.C.; BRILEY, E.M.; AXELROD, J.; SIMPSON, J.T.; MACKIE, K.; DEVANE, W.A.-"Anandamide, an endogenous cannabimimetic eicosanoid, binds to the cloned human cannabinoid receptor and stimulate receptor-mediated signal transduction". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90, 7656-7660, (1993).
- * FORMUKONG, E.A.; EVANS, A.T.; EVANS, F.J.-"The medicinal uses of *Cannabis* and its constituents". *Phytother. Res.*, 3, (6), 219-228, (1989).
- * FRIDE, E.; MECHOULAM, R.-"Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent". *Eur. J. Pharmacol.*, 231, 313-314, (1993).
- * GÉRARD, C.M.; MOLLEREAU, C.; VASSART, G.; PARMENTIER, M.-"Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expresse in testis". *Biochem. J.*, 279, 129-134, (1991).
- * GRLIÉ, L.-"Recent advances in the chemical research of *Cannabis*". *Bull. Narcotics*, 16, 29-35, (1964).
-

-
- * GUIMARAES, F.S.; DE AGUIAR, J.C.; MECHOULAM, R.; BREUER, A.-"Anxiolytic effect of cannabidiol derivatives in the elevated plus-maze". *Gen. Pharmac.*, 25, (1), 161-164, (1994).
- * GUYTON, A.C.-"Temperatura corporal, regulación térmica y fiebre", En "*Tratado de Fisiología Médica*", 7ª edición, Madrid, Ed. Interamericana-McGrawHill, pag. 842-852, 1990.
- * HANŮŠ , L.; GOPHER, A.; ALMOG, S.; MECHOULAM, R.-"Two new unsaturated fatty acid ethanolamides in brain that binds to the cannabinoid receptor". *J. Med. Chem.*, 36, 3032-3034, (1993).
- * HARRIS, L.S.; PIERSON, A.K.-"Some narcotic antagonists in the benzomorphan series". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 141-148, (1963).
- * HARVEY, D. J.-"Oxidative cleavage of the pentyl side-chain of cannabinoids". *Drug Metabolism and Disposition*, 18, 350-355, (1990).
- * HEPLER, R.S.; FRANK, I.M.-"Marihuana smoking and intraocular pressure". *J. Am. Med. Assoc.*, 217, 1392-1394, (1971).
- * HERKENHAM, M.; LYNN, A.B.; LITTLE, M.D.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; COSTA, B.R.; RICE, K.C.-"Cannabinoid receptor localization in brain". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1932-1936, (1990).
- * HERKENHAM, M.; GROEN, B.G.S.; LYNN, A.B.; DE COSTA, B.R.; RICHFIELD, E.K.-"Neuronal localization of cannabinoid receptors and second messengers in mutant mouse cerebellum". *Brain Res.*, 552, 301-310, (1991).
- * HERKENHAM, M.; LYNN, A.B.; DE COSTA, B.R.; RICHFIELD, E.K.- "Neuronal localization of cannabinoid receptors in the basal ganglia of the rat." *Brain Res.*, 547, 267-274, (1991).
- * HILL, S.Y.; SCHWIN,R.; GOODWIN, D.W.; POWELL, B.J.-"Marihuana and pain". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 188, (2), 415-418, (1974).
-

-
- * HOLLISTER, L.E.-"Marihuana in man: Three years later". *Science*, 172, 21-29, (1971).
- * HOLLISTER, L.E.-"Health aspects of *Cannabis*". *Pharmacol. Rev.*, 38, (1), 1-20, (1986).
- * HOLTZMAN, D.; LOVELL, R.A.; JAFFE, J.H.; FRIEDMAN, D.X.-" Δ^9 -Tetrahydrocannabinol: Neurochemical and behavioral effects in the mouse". *Science*, 163, 1464-1467, (1969).
- * HOUSTON, D.B.; HOWLETT, A.C.-"Solubilization of the cannabinoid receptor from rat brain and its functional interaction with guanine nucleotide-binding proteins". *Mol. Pharmacol.*, 43, 17-22, (1992).
- * HOWLETT, A.C.-"Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes". *Mol. Pharmacol.*, 27, 429-436, (1985).
- * HOWLETT, A.C.-"Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase: Relative activity of constituents and metabolites of marihuana". *Neuropharmacology*, 26, (5), 509-512, (1987).
- * HOWLETT, A.C.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; MILNE, G.M.-"Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: Development of a cannabinoid receptor model". *Mol. Pharmacol.*, 33, 297-302, (1987).
- * HOWLETT, A.C.; QUALY, J.M.; KACHATRIAN, L.L.-"Involvement of G_i in the inhibition of adenylate cyclase: Development of a cannabinoid receptor model". *Mol. Pharmacol.*, 33, 297-302, (1988).
- * HOWLETT, A.C.-"Reverse pharmacology applied to the cannabinoid receptor". *Trends Pharmacol. Sci.*, 11, 395-397, (1990).
- * HOWLETT, A.C.; BIDAUT-RUSSELL, M.; DEVANE, W.A.; MELVIN, L.S.; JOHNSON, M.R.; HERKENHAM, M.-"The cannabinoid receptor: Biochemical, anatomical and behavioral characterization". *Trends Neurosci.*, 13, (10), 420-423, (1990).
-

-
- * HUNT, C.A.; JONES, R.T.-"Tolerance and disposition of tetrahydrocannabinol in man". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215, 35-44, (1980).
- * IBAÑEZ, M.L.-"Estudio de contaminantes en drogas estupefacientes y psicótropas decomisadas", Madrid, ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, pag. 123-149, 1990.
- * JANSEN, E.M.; HAYCOCK, D.A.; WARD, S.J.; SEYBOLD, V.S.-"Distribution of cannabinoid receptors in rat brain determined with aminoalkylindoles". *Brain Res.*, 572, 93-102, (1992).
- * JÄRBE, T.U.C.; HILTUNEN, A.J.; LANDER, N.; MECHOULAM, R.-"Cannabimimetic activity (Δ^1 -THC cue) of cannabidiol monomethyl ether and two stereoisomeric hexahydrocannabinols in rats and pigeons". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 25, (2), 393-399, (1986).
- * JONES, R.T.; BENOWUIT, N.-"The 30-day trip-clinical studies of *Cannabis* tolerance and dependence", En "*Pharmacology of Marijuana*", ed. M.C. Braude y S. Szara, pag. 627-342, Raven Press, New York, 1976.
- * KALOFOUTIS, A.; LEKAKIS, J.; KOUTSELINIS, A.-"effects of Δ^9 -THC on human platelet phospholipids". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 12, 697-699, (1980).
- * KAMINSKI, N.E.; ABOOD, M.E.; KESSLER, F.K.; MARTIN, B.R.; SCHATZ, A.R.-"Identification of a functionally relevant cannabinoid receptor on mouse spleen cells that is involved in cannabinoid-mediated immune modulation". *Mol. Pharmacol.*, 42, 736-742, (1992).
- * KETTENES VAN DEN BOSCH, J.J.- "New constituents of *Cannabis sativa* L. and its smoke condensate". Tesis Doctoral, pag. 3-4, Utrecht, 1978.
- * KUSTER, J.E.; STEVENSON, J.I.; WARD, S.J.; D'AMBRA, T.E.; HAYCOCK, D.A.-"Aminoalkylindole binding in rat cerebellum: Selective displacement by natural and synthetic cannabinoids". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 264, (3), 1325-1363, (1993).
-

-
- * LICHTMAN, A.H.; MARTIN, B.R.-"Spinal and supraspinal components of cannabinoid-induced antinociception". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 258, (2), 517-523, (1991).
- * MACKIE, K.; HILLE, B.-"Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 3825-3829, (1992).
- * MAILLEUX, P.; VANDERHAEGHEN, J.J.-"Distribution of neuronal cannabinoid in the adult rat brain : A comparative receptor binding radioautography and *in situ* hybridization histochemistry". *Neuroscience*, 48, (3), 655-668, (1992).
- * MAILLEUX, P.; VERSLIJPE, M.; VANDERHAEGHEN, J.J.-"Initial observations on the distribution of cannabinoid receptor binding sites in the human adult basal ganglia using autoradiography". *Neurosci. Lett.*, 139, 7-9, (1992).
- * MARTIN, B.R.-"Structural requirements for cannabinoid-induced antinociceptive activity in mice". *Life Sci.*, 36, 1523-1530, (1985).
- * MARTIN, B.R.-"Cellular effects of cannabinoids". *Pharmacol. Rev.*, 38, 45-75, (1986).
- * MARTIN, B.R.; COMPTON, D.R.; THOMAS, B.F.; PRESCOTT, W.R.; LITTLE, P.J.; RAZDAN, R.K.; JOHNSON, M.R.; LAWRENCE, S.M.; MECHOULAM, R.; WARD, S.J.-"Behavioral, biochemical and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 40, 471-478, (1991).
- * MATHEW, R.J.; WILSON, W.H.; HUMPHREYS, D.; LOWE, J.V.; WEITHE, K.E.-"Middle cerebral artery velocity during upright posture after marijuana smoking". *Acta Psychiatr. scand.*, 86, (2), 173-178, (1992).
- * MATHEW, R.J.; WILSON, W.H.; HUMPREYS, D.; LOWE, J.V.; WEITHE, K.E.-"Depersonalization after marijuana smoking". *Biol. Psychiatry*, 33, 431-441, (1993).
- * MATSUDA, L.A.; LOLAIT, S.J.; BROWSTEIN, J.; YOUNG, A.G.; BONNER, T.I.-"Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA". *Nature*, 346, 561-564, (1990).
-

-
- * MECHOULAM, R.- "Marihuana chemistry". *Science*, 168, 1159-1166, (1970).
- * MECHOULAM, R.; EDERY, H.-"Structure-activity relationships in the cannabinoid series", En *The cannabinoids: Chemical, pharmacological and therapeutics aspects*. S.Agurell et al. ed. Academic Press Inc., pag. 1567-1571. Orlando, 1984.
- * MECHOULAM, R.; DEVANE, W.A.; BREUER, A.; ZAHALKA, J.-"A random walk through a *Cannabis* field". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 40, 461-464, (1991).
- * MECHOULAM, R.; HANÜS, L.; MARTIN, B.R.-"Search for endogenous ligands of the cannabinoid receptor". *Biochem. Pharmacol.*, 00, (1994).
- * MENDELSON, J.H.; ELLINGBOE, J.; MELLO, N.K.-"Acute effects of natural and synthetic *Cannabis* compounds on prolactin levels in human males". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 20, 103-106, (1984).
- * MILLSAUGH, C.F.-"*American medicinal plants*", ed. Dover Publications Inc., pag. 617-619. New York, 1974.
- * MOHAMED, M.I; HAKIM, H.A.; EL KHEIR, Y.M.-"Enviromental and climatic conditions effect on THC and CBD contents of *Cannabis* plants growing in Sudan". *Fitoterapia*, 58, (3), 163-166, (1986).
- * MUNRO, S.; THOMAS, K.L.; ABU-SHAAR, M.-"Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids". *Nature*, 365, 61-65, (1993).
- * MUÑOZ MONTES, R.-"Sobre el hachish...". *Farmacéuticos*, 185, 25-28, (1994).
- * MUTSY, R.E.; CONSROE, P.; MAKRIYANNIS, A.-"Introduction". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 40, 457-459, (1991).
- * NEUMEYER, J.L.; SHAGOURY, R.A.-"Chemistry and pharmacology of Marihuana". *J. Pharm. Sci.*, 60, (10), 1433-1457, (1971).
-

-
- * NYE, J.S.; SELTZMAN, H.H., PITT, C.G.; SNYDER, S.H.-"High-affinity cannabinoid binding site in brain membranes labeled with [³H]-5'-trimethylammonium- Δ^8 -THC". *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 234, 784-791, (1985).
- * PACHECO, M.A.; WARD, S.J.; CHILDERS, S.R.-"Identification of cannabinoid receptors in cultures of rat cerebellar granule cells". *Brain Res.*, 603, 102-110, (1992).
- * PERTWEE, R.G.-"The ring test: A quantitative method for assessing the "cataleptic" effect of *Cannabis* in mice". *Br. J. Pharmacol.*, 46, 753-763, (1972).
- * PERTWEE, R.G.; GREENTREE, S.G.-" Δ^9 -Tetrahydrocannabinol induced catalepsy in mice is enhanced by pretreatment with flurazepam or chlordiazepoxide". *Neuropharmacology*, 27, 485-491, (1988).
- * PERTWEE, R.G.; STEVENSON, L.A.; ELRICK, D.B.; MECHOULAM, R.; CORBETT, A.D.-"Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine". *Br. J. Pharmacol.*, 105, 980-984, (1992).
- * PERTWEE, R.G.-"The evidence for the existence of cannabinoid receptor". *Gen. Pharmacol.*, 24, 811-824, (1994).
- * PETRO, D.J.; ELLENBERGER, C.E.-"Treatment of human spasticity with Δ^9 -tetrahydrocannabinol". *J. Clin. Pharmacol.*, 21, 4135-4165, (1981).
- * PORTERO GARCÍA, L.-"Breve comentario crítico a las soluciones jurídicas referentes al tráfico de drogas y toxicomanías". Bol. Inf. Ministerio de Justicia, nº 1299. Madrid, 15 de Enero 1983.
- * RAMOS ATANCE, J.A.-"Receptores cannábicos endógenos: las anandamidas". *Farmacéuticos*, 185, 16-21, (1994).
- * RAZDAN, R.K.-"Structure-activity relationships in cannabinoids". *Pharmacol. Rev.*, 38, 75-149, (1986).
-

-
- * RINALDI-CARMONA, M.; BARTH, F.; HÉAULME, M.; SHIRE, D.; CALANDRA, B.; CONGY, G.; MARTÍNEZ, S.; MARUANI, J.; NÉLIAT, G.; CAPUT, D.; FERRARA, P.; SOUBRIÉ, P.; BRELIÈRE, J.C.; LE FUR, G.-"SR141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor". *FEBS Lett.*, 305, 240-244, (1994).
- * SCHATZ, A.R.; KESSLER, F.K.; KAMINSKI, N.E.-"Inhibition of adenylate cyclase by Δ^9 -THC in mouse spleen cells: A potential mechanism for cannabinoid mediated immunosuppression". *Life Sci.*, 51, 25-30, (1992).
- * SEMUS, S.F.; MARTIN, B.R.-"A computer graphic investigation into the pharmacological role of the-cannabinoid phenolic moiety". *Life Sci.*, 46, 1781-1785, (1990).
- * SINGH, N.; AGAWAL, A.K.; SHANKER, K.; BHARGAVA, K.P.-"Evidence of abstinence syndrome in *Cannabis*-treated albino rats". *Quart. J. Crude Drug Res.*, 19, (2-3), 65-74, (1981).
- * SINGH, N.; VRAT, S.; ALI, B.; BHARGAVA, K.P.-"An assessment of biological effects of chronic use of *cannabis* (Marihuana) in human subjects". *Quart. J. Crude Drug Res.*, 19, (2-3), 81-91, (1981).
- * SMALL, E.; CRONQUIST, A.-"A practical and natural taxonomy for *Cannabis*". *Taxon*, 25, (4), 405-435, (1976).
- * SMITH, P.B.; MARTIN, B.R.-"Spinal mechanisms of Δ^9 -tetrahydrocannabinol-induced analgesia". *Brain Res.*, 578, 8-12, (1992).
- * SNYDER, S.-"Planning for serendipity". *Nature*, 346, 508, (1990).
- * THOMAS, B.F.; COMPTON, D.R.; MARTIN, B.R.; SEMUS, S.F.-"Modeling the cannabinoid receptor: A three-dimensional quantitative structure-activity analysis". *Mol. Pharmacol.*, 40, 656-665, (1991).
-

-
- * THOMAS, B.F.; WEI, X.; MARTIN, B.R.-"Characterization and autoradiographic localization of the cannabinoid binding site in rat brain using [³H]-11-OH- Δ^9 -THC-DMH". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 263, (3), 1383-1390, (1992).
- * TURNER, C.E.-"Active substances in marijuana". *Arch. Invest. Med.*, 5, (1), 135-140, (1974).
- * TURNER, C.E.; ELSOHL, M.A.; BOEREN, E.G.-"Constituents of *Cannabis sativa* L. XVIII: A review of natural constituents". *J. Nat. Prod.*, 43, (2), 169-231, (1980).
- * VAYSSE, P.J.; GARDNER, E.L.; ZUKIN, R.S.-"Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 241, (2), 534-539, (1987).
- * VOGEL, Z.; BARG, J.; LEVY, R.; SAYA, D.; HELDMAN, E.; MECHOULAM, R.-"Anandamide, a brain endogenous compound interacts specifically with cannabinoid receptors and inhibits adenylate cyclase". *J. Neurochem.*, 61, 352-355, (1993).
- * WELCH, S.P.; STEVENS, D.L.-"Antinociceptive activity of intrathecally administered cannabinoids alone, and in combination with morphine, in mice". *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262, (1), 10-18, (1992).
- * WENGER, T.; CROIX, D.; TRAMU, G.; LEONARDELLI, J.-"Prenatally administered Δ^9 -THC temporarily inhibits the developing hypothalamo-pituitary system in rats". *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 40, (3), 599-602, (1991).
- * WENGER, T.; CROIX, D.; TRAMU, G.; LEONARDELLI, J.-"Effects of prenatally administered Δ^9 -THC on hypothalamic neuropeptide Y content in rat offsprings". *Neuroendocrinol. Lett.*, 13, (1), 15-21, (1991).
- * ZUARDI, A.W.; TEIXEIRA, N.A.; KARNIOL, I.C.-"Pharmacological interaction of cannabidiol on serum corticosterona levels in rats". *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 269, 12-19, (1984).
-

OBRAS DE FRECUENTE CONSULTA

- * BURCK, H.C.-"*Técnica histológica*", Madrid, Ed. Paz Montalvo, 1969.

- * CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L.- "*Robbins. Patología estructural y funcional*". 4ª edic. Vol I. Madrid, Ed. Interamericana. Mac Graw-Hill, 1990.

- * CARSON, F.L.-"*Histotechnology. A self-instructional text*", Chicago, Ed. ASCP Press, 1990.

- * FERNÁNDEZ CALVO, M.I.-"*Estudio comparativo por cromatografía en capa fina de los principales componentes de Cannabis sativa L.*" Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. U.C.M. Madrid, 1993.

- * LÓPEZ ÁLVAREZ, M.; LÓPEZ CORRAL, J.M.; SEGURA ABAD, L.; ABENZA ROJO, J.M.; BANDRÉS MOYA, F.-"*Informe sobre la Marihuana*". Ed. U.C.M. Madrid, 1984.

- * MECHOULAM, R.-"*Marihuana: Chemistry, pharmacology, metabolism and clinical effects*", New York, Ed. Academic Press, 1973.

- * RECUENCO SÁNCHEZ-AGUILERA, M.C.-"*Estudio fitoquímico comparativo de los principales componentes de Cannabis sativa L. por cromatografía líquida de alta resolución*". Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. U.C.M. Madrid, 1993.

- * RODRÍGUEZ DE FONSECA, F.A.-"*Efectos de la exposición perinatal a extracto crudo de hachis sobre el desarrollo de la transmisión dopaminérgica*". Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. U.C.M. Madrid, 1992.

- * STYMEL, B.-"*Tratamiento farmacológico del dolor*". México, Ed. Científica PML., 1985.