



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**Estudio sobre Hipersensibilidad celular
al A⁹ - THC. (A¹ - THC) en pacientes
farmacodependientes**

T E S I S

que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

Benjamín Reyes Hernández



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

-LAS Tesi-
ABQ _____
FECHA _____
REC 340
S _____



QUIMICA

Jurado asignado originalmente según el tema.

Presidente:

Ignacio Diez de Urdanivia

Vocal:

Magdalena Acosta Segura

Secretario:

Ernestina Ballesteros Rueda

1er. Suplente:

César A. Domínguez Camacho

2do. Suplente:

Ana Marfa Méndez Chávez

Sitio donde se desarrolla el tema: Centro Médico Universitario

Nombre completo y firma del sustentante:

Benjamín Reyes Hernández

Nombre completo y firma del asesor del tema:

Q. F. B. Magdalena Acosta S.

TODO LO QUE TE VINIERE A LA
MANO PARA HACER, HAZLO SEGUN
TUS FUERZAS, PORQUE EN EL SE
PULCRO A DONDE TU VAS, NO --
HAY OBRA, NI INDUSTRIA, NI -
SABIDURIA, NI CIENCIA.

ECCLESIASTES 9:10

Aún cuando no siempre éste trabajo se llevo a cabo con la tranquilidad y el gusto que merecia, todo se da por bien pasado a cambio de la satisfacción que trae consigo el haber contribuido en algo a la creciente demanda de conocimientos que la humanidad reclama. Este estudio es ciertamente pequeño y no pretendemos con el resolver el problema del que se ocupa, sin embargo pensemos que se requieren varias toneladas de piedra para obtener una onza de oro.

Los múltiples y grandes beneficios recibidos del seno familiar, que en el ejemplo diario me enseñó todo cuanto de valor hay para el hombre, me mueve a dedicar con cariño y humildad, este pequeño trabajo a mis padres Ma. de la Paz y Lorenzo, en quienes he visto la real nobleza, a mis innumerables hermanos, familiares y amigos a quienes tantos favores debo y que son testigos anónimos de todos los esfuerzos requeridos para poder llegar a la feliz culminación de esta etapa de mi vida; haciendo mio el pensamiento del Salmista cuando dice "Los que sembraron con lágrimas con regocijo cegaran irán andando y llorando el que -- lleva la preciosa simiente más volvera con regocijo tra--

yendo sus gabilas, pues los que esperan en Jehóva tendrán nuevas fuerzas y levantarán alas como águilas; correrán y no se cansarán; caminarán y no se fatigarán".

Quiero así mismo agradecer a todas aquellas personas que con su consejo desinteresado y su acertada crítica, me auxiliaron para llevar a feliz término este estudio; primeramente a los colaboradores que contribuyeron con su conocimiento especializado, aumentando así la escasa utilidad que el trabajo tenía como son el Dr. Jaime E. Megia-Laguna y la maestra Magdalena Acosto Segura, a Esther quien me brindo su valiosa ayuda. Con respeto al Centro Médico Universitario, a mi querida Facultad de Química donde he pasado los años más agitados pero felices de mi vida, a mis maestros, a las personas que me han brindado su amistad a todos y cada uno de ellos ofresco aquí mi gratitud permanente por su cooperación ilimitada y su tolerancia amistosa que ha sido una de las experiencias más inolvidables de mi vida.

C O N T E N I D O

- I.- Introducción
- II.- Generalidades
- III.- Material y método
- IV.- Resultados
- V.- Resumen y conclusiones
- VI.- Bibliografía

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

Antecedentes sobre los efectos de los agentes psicotrópicos en la hipersensi- bilidad

El problema de la farmacodependencia plantea un sinnúmero de interrogantes de las más diversas categorías. En la actualidad sabemos que el número, tipo y efectos de los psicotrópicos es de lo más variable, así por ejemplo, tenemos a la marihuana, el alcohol, heroína, L.S.D., cocaína, anfetaminas, barbitúricos, etc. Es conocido el hecho de el uso no médico que estos agentes tienen cuando son empleados como "estimulantes", por supuesto sin prescripción de facultativo, y por períodos variables -- puede tener manifestaciones en diferentes órganos y sistemas, por ejemplo, la aparente disminución de los niveles de testosterona en el suero de fumadores crónicos de marihuana como lo refiere Mendelson y colaboradores (1) La liberación de histamina por la heroína y morfina a nivel pulmonar tisular (2).

Por lo que al sistema inmune se refiere tenemos los siguientes hechos: en 1973 Rabin y D'Amada (3) demuestran hiperinmunoglobulinemia M "selectiva" en pacientes adictos a heroína. Nickerson y colaboradores en 1970 (4) muestran en un grupo de pacientes adictos a este psicotrópico incremento de la capacidad opsonica en su suero. Fridman y colaboradores en 1974 (5) encuentran una asociación directa de nefropatía y adicción a heroína. Ringle y Herndon en 1972 (6) encuentran que es posible -

inducir respuesta humoral a la morfina en conejos. --
Weksler y colaboradores (7) en cambio, no logran demos-
trar actividad de unión a la morfina en el suero de pa-
cientes adictos a ella.

Berkowitz y Spector (8) logran inducir la producción de anticuerpos en ratones en contra de la morfina. Por --
otro lado Gupta y colaboradores en 1974 (9) Nahas y co-
laboradores (10) en el mismo año, encuentran disminu-
ción en el número de células formadoras de rosetas T --
circulantes en fumadores crónicos de marihuana, e inhi-
bición de la inmunidad celular in vitro respectivamente
Nahas y colaboradores (11) reportan una respuesta de hi-
persensibilidad celular positiva en cultivos de linfocⁱ
tos de ratones previamente inmunizados con A⁹-Tetrahi-
drocannabinol (A⁹-THC) en adyuvante de Freund completo.

Estos entre otros hallazgos clínicos y experimentales,
muestran que el sistema inmune es uno de los afectados
y que el efecto de los agentes psicotrópicos en los sis-
temas T y B es innegable. Nuestro interés principal en
este estudio es el efecto que sobre la hipersensibili-
dad T dependiente pudiera presentar la marihuana, ----
A⁹-THC en particular el tratar de demostrar la posible
sensibilización del tipo celular o timodependiente a es-
ta sustancia en pacientes fumadores crónicos de marihua-
na.

GENERALIDADES

Hipersensibilidad celular y humoral

A partir de las teorías de Erlich y Metchnikoff a fines del siglo pasado, se inician los conocimientos en relación a los mecanismos de inmunidad específicos. - Erlich postulaba que los mecanismos de defensa en contra de los agentes agresores se encontraban en el sugro o humores. Metchnikoff pensaba que estos mecanismos de defensa radicaban en las células. Estos autores ya vislumbraban desde entonces la dicotomía de -- los mecanismos específicos de la inmunidad es decir, - la inmunidad humoral y la inmunidad celular.

En el momento actual sabemos que ambas teorías son correctas; sus conceptos se han ampliado en forma muy - importante y aún más, una gran variedad de funciones- específicas para los sistemas timo y bazo-dependientes están íntimamente correlacionadas. En la inmunidad humoral se observan interacciones antígeno anti- cuerpo en la inmunidad celular. También hay interacción entre el linfocito sensibilizado y su antígeno.

Estos tipos de respuestas no siempre dan como resulta- do un beneficio en el organismo inmunológicamente competente, hay muchos casos en que la reacción antígeno anticuerpo produce daño tisular que puede ser tan se- vero que se produzca desenlace fatal. Esto sucede --

tanto en la inmunidad humoral como en la celular, ya que dentro de esta, también se llevan a cabo una serie de acontecimientos que pueden desembocar en manifestaciones de beneficio o de lesión para un organismo. Por ejemplo la sensibilización del tipo retardado que se sufre por exposición a ciertos haptenos de naturaleza química como es el dinitrociorobenceno. Por otro lado podemos tener una manifestación benéfica como en la inmunidad contra: virus, bacterias, hongos, protozoarios y células.

Dentro de la inmunopatología podemos agrupar a la autoinmunidad, hipersensibilidad por contacto, algunas reacciones medicamentosas, degeneraciones malignas, etc.

Fue Von Pirquet quien acuñó la palabra "alergia" para denominar la respuesta de algunos individuos a determinados elementos, tales como el polen. En la actualidad el concepto de alergia se asigna a todas aquellas respuestas que son provocadas por alérgenos y que en una buena mayoría de ellas es posible demostrar el incremento de la inmunoglobulina E o reagina, dejándole el calificativo de hipersensibilidad a el resto de las manifestaciones que son desencadenadas por la presencia de un antígeno y la respuesta puede ser celular o humoral (12).

Hace algunos años los efectos patológicos de los fenómenos inmunes se dividían en dos, la hipersensibilidad inmediata y la hipersensibilidad tardía. Al progresar las investigaciones en el campo de la inmunología se vio que por las manifestaciones de la lesión tisular,-

podían clasificarse dentro de cinco diferentes grupos, estableciéndose así la clasificación de Gell y Coombs.

- I.- Las reacciones de hipersensibilidad inmediata.-
Tipo anafilactico
- II.- Efectos tóxicos de anticuerpos contra células y tejidos. Tipo citotóxico
- III.- Efectos tóxicos de complejos antígeno-anticuerpo.
- IV.- Reacciones de hipersensibilidad tardía o mediada por células.
- V.- Estimuladora

Trataremos aquí de describir brevemente cada una de -- ellas con el objeto de situar nuestro trabajo.

Las reacciones de hipersensibilidad inmediata que, como su nombre lo indica se presenta en unos cuantos minutos a unas horas se denomina anafilaxia, esta se caracteriza porque tiene una reacción fulminante, puede ser local o sistémica teniendo en común la liberación de sustancias farmacológicamente activas tales como la histamina, serotonina y una sustancia que es capaz de inducir la contracción prolongada del músculo liso; a partir de células que se conocen como Mastocitos o células cebadas y basófilos. Los efectos primarios de esta --- reacción son, la contracción del músculo liso y el aumento de la permeabilidad vascular.

El segundo mecanismo de hipersensibilidad tipo citotóxico, produce daño tisular por acción directa de los anticuerpos que se unen a células blanco, activándose de esta forma el Sistema del Complemento y facilitando la -- muerte de esta célula blanco por los fagocitos.

La hipersensibilidad Tipo V o estimuladora, se presenta cuando hay células que reciben instrucción por agentes tales como hormonas, a través de receptores de superficie, esta combinación puede llevar a cambios alostericos en la configuración del receptor o de moléculas adyacentes, las cuales transmiten una señal al interior de la célula. Un ejemplo de esta es la tirotoxicosis, es una reacción mediada por anticuerpos, no hay fijación de complemento, los antígenos están en la superficie celular y se puede transferir por anticuerpos sericos.

La lesión tisular del grupo tres es la del mecanismo - activado por acción de complejos antígeno-anticuerpos. Al combinarse estos entran en acción determinados mecanismos efectores como la fagocitosis, encaminados a -- eliminar los complejos inmunes. En ciertas reacciones, estas se acompañan de manifestaciones inflamatorias, - de tal manera que la lesión producida por complejos inmunes puede dividirse en cuatro etapas que son:

- a) Combinación del antígeno con el anticuerpo
- b) Localización de estos complejos en determinados lugares del organismo
- c) Acumulación de factores humorales - como el complemento, y
- d) Producción de daño tisular.

Tipo IV

El cuarto mecanismo inmune de lesión tisular denominado hipersensibilidad tardía. Se le llama también inmunidad celular o portada por células (T - Dependiente), y se puede definir como la presencia de reactividad de células sensibilizadas, frente a antígenos específicos. Este fenómeno fue observado inicialmente por Jenner y

estudiado más tarde por Koch y Von Pirquet, se distingue de la reacción de hipersensibilidad inmediata porque requiere entre 48-72 horas para alcanzar su máxima intensidad. Un ejemplo de ésta es la prueba de Mantoux o tuberculinorreacción, si la tuberculina se aplica después de la sensibilización, la secuencia de eventos es la siguiente, aparece eritema, edema que suele ser máximo de las 48-72 horas después de la inyección, para después disminuir. En las reacciones intensas suele haber necrosis.

Histológicamente se caracteriza por una infiltración de células mononucleares, aún cuando pueden encontrarse algunos neutrófilos dentro de las primeras 6 horas después de la inyección. Alrededor de los vasos se observan cúmulos de macrófagos y linfocitos, estos macrófagos invaden los tejidos circunvecinos al sitio de la inyección. La salida de líquido del espacio intravascular a los tejidos es la causa del edema local.

Una característica de la hipersensibilidad T - dependiente, es que puede ser transferida a receptores normales mediante linfocitos de un donador sensibilizado, esto no puede lograrse con el suero ya que carece de eficacia al respecto. En especies diferentes al hombre se han empleado para estas transferencias células de bazo, de ganglios linfáticos, de exudados peritoneales. Si las células del donador son alogénicas o xenogénicas en relación al receptor, las reacciones positivas, así -- transferidas desaparecen en poco tiempo. En células -- singénicas el efecto es perdurable.

En el hombre la hipersensibilidad T - dependiente se --

puede transferir mediante linfocitos de sangre periférica, además de que los extractos de estos linfocitos también permiten transferir la sensibilidad específica, y la sustancia responsable de este efecto se le ha llamado factor de transferencia o factor de Lawrence; este es dializable y su peso molecular se piensa que es inferior a 10,000. Otras de sus propiedades son: resistente a la tripsina, a la ribonucleasa, y es termoestable. Este factor se libera lo mismo que otras linfocinas cuando se incuban in vitro los linfocitos con el antígeno al cual están sensibilizados.

Una de las vías por la cual se puede lograr un estado de hipersensibilidad T-dependiente es por contacto, y se puede producir por aplicación en la piel de sustancias de bajo peso molecular, la sensibilización sigue el mismo esquema general que la reacción habitual T-dependiente o retardada, se caracterizan estos procesos por el bajo peso molecular de las sustancias que se usan como antígenos, las sustancias de este tipo no suelen ser inmunogénicas "per se" y sólo actúan como haptenos unidas a proteínas portadoras.

En el hombre uno de los mejores ejemplos de sensibilización por contacto, es la dermatitis alérgica debida a exposición al zumaque, éste se trata de un catecol vegetal que actúa en la misma forma que ciertos haptenos químicos como son el ácido pícrico, el dinitroclorobenceno, el dinitrofluorobenceno, y algunos cosméticos. Aunado a las circunstancias anteriores sabemos también que existe un hecho real que se refiere a la facilidad de sensibilizarse por vía respiratoria a ciertos alérgenos como son el pólen o el polvo casero. En base a las circunstancias

mencionadas anteriormente una hipótesis de este estudio esta en considerar que la marihuana pudiese actuar como antígeno sensibilizante por vía respiratoria (13,14,17)

Marihuana.- Farmacología y efectos sobre el sistema inmune.

Respecto a la farmacología de la marihuana se sabe que la duración del efecto varía si la droga se administra por vía oral o si se inhala por el humo de cigarrillo de marihuana. Por vía oral se puede ingerir en forma de resina purificada y tarda de 30 a 60 minutos en manifestar sus efectos. Sea ingerida o inhalada produce taquicardia y congestión vascular conjuntival, se observa además sequedad de la boca y de la garganta, hay vértigos, náusea y en ocasiones vómito, aumenta el apetito especialmente para las cosas dulces, aunque no se han encontrado alteraciones en la glicemia ni de otros parámetros bioquímicos; no hay una alteración notable del tamaño de la pupila, de la frecuencia respiratoria, de la presión sanguínea ni de los reflejos profundos. En cuanto a los efectos psíquicos de la droga, estos dependen no sólo de la personalidad del individuo, sino también de la dosis, la vía de administración, y las circunstancias ambientales en que se usa la droga. (15) La reacción más frecuente es un estado onírico de conciencia alterada en la cual las ideas son deshilvanadas e incontrolables, apareciendo en series fragmentadas, la percepción se altera, los minutos parecen horas y los segundos minutos, el espacio se amplía y los objetos cercanos parecen muy distantes, con dosis mayores, fumadas o tomadas surge un estado de miedo o pánico a la

muerte, el sujeto ve su imagen corporal deformada, siente la cabeza hinchada y las extremidades pesadas, con dosis suficientemente elevadas el cuadro clínico es de psicosis tóxica con despersonalización, alucinaciones auditivas y visuales con pérdida de la introspección. En casos de uso crónico o duradero las personas se vuelven indolentes y no productivas, descuidan su higiene personal, pierden rápidamente interés en las tareas asignadas. El menoscabo de las funciones intelectuales es variable según la dosis, complejidad de la tarea, etc. La notable semejanza entre las descripciones de los efectos subjetivos por efecto del A^9 -THC y los del LSD, es la base para la clasificación del primero como agente psicodélico, no obstante la marihuana tiene efecto sedante que no se ve en LSD.

Por otro lado se han aislado de la orina de pacientes a los cuales se les administro A^9 -THC., dos metabolitos diferentes que son el 11-OHA⁹-THC. y el 8,11-OHA⁹-THC., son psicológica, y fisiológicamente activos, tal como lo reportan Pérez-Reyes y colaboradores (16). Otros estudios realizados por Kreuz y colaboradores (17) nos muestran que el A^9 -THC. es transportado en el suero por medio de la albúmina, y que su retención en diferentes tejidos es variable siendo predominante para el tejido adiposo, ya que en éste se encontraban concentraciones 10 veces más grandes que en cualquier otro tejido, persistiendo en él por dos semanas aproximadamente. Con dosis repetidas el A^9 -THC., se acumula en el tejido adiposo y en el cerebro.

Berkowitz, Spector y colaboradores (8). Logran inducir la producción de anticuerpos contra morfina en ratones,

y probaron una tolerancia a la morfina en estos ratones así inmunizados, postulando que el desarrollo a la tolerancia se asocia con el uso crónico en muchas drogas. - Dos de los mecanismos para explicar esta tolerancia son la adaptación de las células del sistema nervioso central y un incremento del metabolismo periférico de la droga, sin embargo hay observaciones que indican que un mecanismo de tipo inmune pudiera estar involucrado en la creación de la tolerancia a estos narcóticos, ya que algunos tipos de esta tolerancia persisten por muchos años y además se han aislado factores de tejido y suero de animales, los cuales son tolerantes y que contienen material que puede ser transferido pasivamente a un segundo animal, y junto con este material la tolerancia a estos narcóticos. En cuanto a el Δ^9 -THC o marihuana y su relación con el sistema inmune, hay datos para afirmar que su mecanismo de acción podría ser como depresor del sistema inmune o bien que lo activara, a este respecto tenemos los siguientes hechos, Nahas y colaboradores (10) en uno de sus trabajos evalúan la respuesta T-dependiente de 51 jóvenes adictos crónicos a marihuana, por medio de cultivo mixto de linfocitos y cultivo de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (FHA). Empleando como controles, cultivo de células de pacientes en los cuales se conoce que están inmunodeprimidos, los resultados obtenidos son los siguientes: los valores medios del grupo de fumadores crónicos de marihuana fueron significativamente más bajos que los controles normales pero mucho más altos que el grupo control de inmunodeprimidos. En otro estudio hecho por Nahas y Schwartz (11) demuestran inmunogenicidad del Δ^9 -THC en roedores. Tomando en cuenta que la intoxicación crónica de marihuana en todas las especies, se acompaña de una marcada

tolerancia farmacológica, teniéndose la necesidad de incrementar la dosis para obtener los mismos efectos de la dosis inicial como ya está demostrado. Además se sabe que en el perro y en roedores el período requerido para desarrollar tolerancia es del orden de 5 a 9 días. Estos hechos son similares a los que se requieren para el desarrollo de una respuesta inmune celular. Se sabe -- además que tres días después de una inyección intravenosa de Δ^9 -THC tritiado (H^3) hay una alta actividad específica en el bazo. Tomando como base estos hechos Nahas y Schwartz (11), diseñaron los siguientes experimentos para demostrar el hecho de que la marihuana pudiera funcionar como inmunógeno, el primero consistió en probar el efecto inmunodepresor de la azatioprina en el desarrollo de tolerancia al Δ^9 -THC y un segundo experimento para ver el efecto del Δ^9 -THC en la transformación blastoide de linfocitos de ratones sensibilizados. En el primer experimento, se encontró que los animales tratados con azatioprina y el Psicotrópico desarrollaban tolerancia inmunológica al canabinoil durante los trece días que duró el experimento. El segundo estudio está encaminado a demostrar la sensibilización de los ratones, por medio de la estimulación en cultivo de células de bazo. Los resultados muestran una transformación blastoide mayor en las células sensibilizadas en contraste con las células control, concluyendo que la transformación blastoide de células sensibilizadas en cultivos de linfocitos, es similar a la que se observa con otros antígenos, pero menor a la observada en los cultivos de fitohemaglutinina.

Estos hechos demostrados experimentalmente con el Δ^9 -THC nos sugieren que una respuesta similar podría ocurrir en el hombre, de aquí la eosinofilia y las respuestas "alérgicas".

gicas" que se han observado en fumadores crónicos de marihuana reportados por Liskow en 1971 y Tennat en 1972 - (11). Sin embargo no debemos olvidar que en nuestro medio la marihuana se usa exclusivamente en cigarrillos, y en el reporte de Nahas se hizo la inmunización por vía intravenosa, en la cual hay contacto directo con los linfocitos.

Un contacto inicial de las células inmunológicamente competentes con el antígeno puede iniciar una serie de fenómenos celulares metabólicos relacionados con la captura y manejo del antígeno para terminar en la producción de linfocitos sensibilizados. Los linfocitos tradicionalmente se dividen por su morfología en pequeños, medianos y grandes. Estudios recientes nos demuestran la heterogeneidad de funciones del linfocito, a este respecto las diferencias de tamaño no se han podido relacionar con funciones específicas, sin embargo, se pueden considerar dos funciones principales de los linfocitos que son, la producción de anticuerpos (inmunoglobulinas) y las interacciones de origen celular dependientes del timo.

El origen de estas células parece provenir de una población de células común que se denominan células primitivas, estaminales o hemocitoblastos, que se encuentran en los tejidos hematopoyéticos. Los órganos linfopoyéticos dan lugar a las células linfoides, que pueden sufrir dos diferenciaciones distintas que son, las células B y la de los linfocitos T, estos últimos son los que bajo la influencia del timo adquieren la capacidad para desempeñar las funciones de la inmunidad de origen celular. Se ignora si este "aprendizaje" tiene lugar directamente en el timo o por efecto de una hormona producida por éste -

órgano y que se identifica como timosina. Esta población de linfocitos circula por los sistemas linfático y vascular y se instala en determinadas regiones de los ganglios linfáticos que se conocen como zonas T-dependientes.

Ha sido conocida desde hace tiempo la necesidad de cooperación entre cuando menos tres tipos de células que se hallan involucradas en la respuesta inmune, dentro de éstas tenemos a las células T, las células B que son linfocitos bajo la influencia de la hormona formada en la Bursa de Fabricio o su equivalente y los macrófagos, los métodos empleados para elucidar estos mecanismos de cooperación son varios. Se cree que las células T ayudantes captan antígenos y los presentan a las células B formadoras de inmunoglobulina IgM a IgA por las células B parece requerir de las células T y la evidencia presentada recientemente muestra que las células T, tienen influencia regulatoria sobre la afinidad de fijación de inmunoglobulinas producidas por células B.

Por otro lado, cuando un linfocito T sensibilizado se pone en contacto con su antígeno se activa, iniciándose dentro de éste una serie de procesos biológicos que finalmente dan lugar a la aparición de una reacción de hipersensibilidad T dependiente. Los efectores de ésta activación son las linfocinas que son sintetizadas y liberadas por linfocitos sensibilizados y que a su vez fueron activados mediante el contacto con su antígeno.

Actualmente se han identificado varias linfocinas, además del factor de transferencia antes mencionado éstas son: una sustancia que inhibe las actividades migratorias de los macrófagos, denominada factor inhibitorio de la migra

ción (MIF), una sustancia que es quimiotáctica para los leucocitos o leucotaxina, ésta atrae a los leucocitos a la vecindad de los linfocitos así activados. Una sustancia que tiene actividad tóxica específica contra las células vivas llamada linfocitotóxina un inhibidor inespecífico de la replicación viral o interferón un factor de inhibición de la permeabilidad vascular (PIF) y una sustancia mitógena para los linfocitos no sensibilizados. Los linfocitos por ser células nucleadas pueden cultivarse, si al cultivo se adiciona fitohemaglutinina se observa un incremento en la síntesis de RNA, seguido por una aceleración en la síntesis de DNA, presumiblemente reflejando el proceso de duplicación cromosómica anterior a la mitosis.

Se han observado que en un cultivo de células linfoides transcurren alrededor de 24 horas a partir del estímulo al momento de la síntesis de RNA, y que después de esto, hay un período de síntesis de DNA, de 8 horas, seguido de un período de división celular de 5 a 6 horas aproximadamente, de tal manera que la primer mitosis se efectúa a las 36 horas, y a partir de éste los siguientes períodos de división celular se llevan a cabo cada 13 ó 14 aquí que al incubar un cultivo por 72 horas se logra observar la respuesta por tres generaciones al cabo de las cuales la división celular alcanza su máximo.

Han sido empleados varios métodos para reconocer y evaluar estos eventos, algunos investigadores han contado el número de células blastoides o el número de mitosis, otros han usado autorradiografías de las células, mientras que otros han medido la incorporación de timidina

tritiada (T-H³) como índice de síntesis de DNA. Este último método fue descrito por Michalowski en 1963 y - Aisenberg en 1969 en cultivos de leucocitos humanos (18) y por Dutton en suspensiones de células de bazo de conejo. Posteriormente una gran cantidad de investigadores han empleado el cultivo de linfocitos y la incorporación de T-H³ como un método de valoración de la respuesta inmune T-dependiente de los linfocitos.

Por otro lado se ha pensado también, en que la intensidad de la respuesta celular en un cultivo de linfocitos depende de la fuerza del estímulo y del número de linfocitos que responden, hechos demostrados por los mismos investigadores en cultivos de linfocitos sincronizados con hidroxiaurea. Por otro lado Yamamura y colaboradores (21), efectuaron experimentos para tratar de estandarizar los parámetros dentro de los cuales el cultivo de linfocitos se lleva a cabo en condiciones óptimas, encontrando que los mejores resultados se obtuvieron cuando incubaban 200.000 linfocitos /ml de cultivo con un miligramo de FHA, en tubos de 12 x 100 mm de fondo redondo, 1mC de T-H³ adicionada 44 horas después de la adición de FHA medio con 10% de suero autólogo. En este estudio se emplea el cultivo de linfocitos para tratar de demostrar una posible sensibilización del tipo celular en pacientes adictos crónicos a marihuana.

Fitohemaglutinina

La fitohemaglutinina (FHA), es una mucoproteína que se extrae de la semilla de Phaseolus vulvaris, aunque también es posible aislarla de otras especies de legumino-

sas. Sus propiedades biológicas conocidas son dos:

Produce eritroaglutinación y leucoaglutinación, ésta en menor escala; es capaz de inducir transformación blastoide de los linfocitos y más aún su división celular (22), estudios recientes han demostrado que el efecto de la fitohemaglutinina esta determinado por la especie de planta de la que se extrae (23). Por otro lado se ha encontrado en otro tipo de plantas, sustancias con estas mismas propiedades, por ejemplo en la raíz, tallo y semillas de Dolichos biflorus, se ha encontrado una --- sustancia con acción aglutinante, en cambio la aislada de raíz y hojas de Phitolaca americana, tiene un alto poder mitogénico y muy poco o ningún efecto aglutinante, tal como lo refieren Downing y colaboradores (24). Existen especies de plantas en las cuales se manifiestan ambas características y un ejemplo de éstas es Phaseolus vulgaris. En 1960 Nowell (25) descubrió que la FHA, -- además de su capacidad aglutinante poseía también actividad mitogénica, posteriormente este mismo autor estudió los posibles cambios en la actividad mitogénica de la FHA con la variación de parámetros tales como:

cambios menores de pH, temperatura, tensión de oxígeno, tensión de bióxido de carbono, concentración de plasma, y concentración de células, observando que éstos producían cambios cuantitativos moderados en la actividad mitogénica.

En el año de 1960 Elves y colaboradores (26), observaron el mismo fenómeno de transformación celular "in vitro" utilizando suero antileucocitos, el mismo hecho se ha observado con una gran variedad de antígenos, tales como: toxoide tetánico, Bordetella pertusis, toxoide

diftérico, virus de la poliomiélitis, vacuna contra la viruela, y tuberculosis entre otros, siempre y cuando -- los linfocitos del donador para el estudio hayan tenido experiencia inmunológica con estos antígenos.

El estímulo de FHA, parece ser mediado por un efecto sobre la membrana celular, que inicia una pinocitosis intensa, las vacuolas pinocíticas resultantes se unen con los lisosomas y estas partículas combinadas y limitadas por membranas, dejan escapar enzimas proteolíticas que afectan al citoplasma y al núcleo y podrían representar el estímulo final para la transformación blastoide, tal como lo proponen Hirschon y colaboradores (27).

A⁹-tetrahydrocannabinol (A⁹-THC)

Canabis sativa o marihuana, es una planta dioica, su tamaño habitual con frecuencia es de 1.50 m en condiciones óptimas puede alcanzar 6 m. de altura. Probablemente es originaria del Asia Central. Su clasificación de acuerdo con Linneo es la siguiente:

División	Tracheofita
Subdivisión	Pleropsida
Clase	Angiospermae
Sub clase	Dicotyledonae
Orden	Urticales
Familia	Cannabaceae
Género	Cannabis
Especie	sativa

Se ha pensado que existen diferentes especies de cannabis o marihuana pero actualmente sólo se conocen diferentes -

variedades según su contenido en alcaloides, un mismo - quimiotipo cultivado en dos zonas diferentes, en cuanto a clima se refiere, se desarrollará en dos variedades - diferentes en lo que concierne a su morfología, pero -- idénticas en su contenido de principios activos.

Hay diferentes nombres para referirse a la misma planta, dependiendo del lugar geográfico y la forma del prepara do utilizada para su consumo, algunos de ellos son los- siguientes: En Arabia le llaman hashish, en Persia beng, en Marruecos kif, en el Africa del Sur dagga, en Brasil maconha, en la India charas, bhang, o gangha, en México y los Estados Unidos marihuana, y en el lenguaje técni- co Cannabis sativa (*C. sativa*)

Su cultivo data de hace mucho tiempo por ser fuente de fibra (cañamo). Contrariamente a lo que suele creerse, la planta femenina no es la única que contiene sustan-- cias psicoactivas, pues existen pruebas convincentes de que también las contiene la planta masculina.

Los constituyentes químicos de *C. sativa* son muy comple jos y comprenden un grupo singular de sustancias químicas denominadas cannabinoides, además contiene caras, al midones, terpenos, aceites y huellas de otras sustan--- cias aún no identificadas. Los cinco cannabinoides más- importantes en cuanto a su actividad biológica son, el- A^9 -tetrahidrocanabinol, (A^9 -THC) A^8 -tetrahidrocanabinol (A^8 -THC) Acido cannabinólico, Canabidiol, --- (CBD), y el Canabinol. El ácido cannabinólico no es activo si se ingiere, pero al fumarlo se convierte en -- A^9 -THC, como lo muestran Mechoulam y colaboradores en 1970. (15, 28)

De todos los cannabinoides anteriores, el Δ^9 -THC produce la mayoría de los efectos de C. sativa, tanto en el animal como en el hombre, por lo que se le atribuye la mayor parte de la actividad farmacológica psicoactiva. - Tanto el Δ^9 -THC, como el Δ^8 -THC, se volatilizan al fumarlos y en el pulmón se absorben rápidamente, hecho demostrado por Manno y colaboradores en 1970 (29). Por vía digestiva también se absorbe aunque más lentamente.

En la actualidad, es posible determinar el contenido de cannabinoides en la C. sativa, por medio de extracción con benceno, éter o alcohol y cromatografía en capa fina o de fases gas-líquido, tal como lo refieren Mechoulam y colaboradores (28). De tal modo encontramos que muestras diferentes de marihuana provenientes de Canadá y Estados Unidos dan un contenido de Δ^9 -THC igual a 0.2% en promedio con respecto al peso de la planta, en tanto que las de México y Tailandia dan hasta el 4.8% (15).

El contenido de tetrahidrocanabinol de las preparaciones de cannabis varía de acuerdo con las características de la planta y del lugar y condiciones en que ésta crece, pero también esta sujeto a factores tales como: Edad de la planta, métodos de conservación de los productos cosechados, así como de la parte de la planta -- que se analiza. Por otra parte, en la actualidad suele aceptarse que el Δ^9 -THC es el responsable de gran parte de la actividad farmacológica psicoactiva de las preparaciones de cannabis. Se han empleado dos nomenclaturas -- para denominar a los cannabinoides, la primera los hace derivar del pirano como anillo principal de la molécula, sin embargo esta forma de hacerlo no es la más aceptada puesto que cuando la parte principal de la molécula tie

ne otros sustituyentes, la numeración de ésta cambia y -
crea confusión. La segunda forma de nombrar este tipo -
de compuestos es tomando la estructura principal como un
compuesto del tipo monoterpenoide, teniendo de esta maner
a la misma numeración aún cuando tenga diferentes sustitu
yentes.

MATERIAL Y METODO

En este capítulo se describe el material y equipo empleado en este estudio así como los reactivos y productos biológicos.

Equipo

Centrifuga refrigerada. Sorvall RC-3 DU-PONT
Instruments Sorvall.

Incubadora de temperatura controlada a 37°C

Contador de centelleo líquido

Microscópio

Horno para secado de material

Autoclave

Filtro millipore

Agitador para pipetas cuenta glóbulos

Material

Jeringas desechables de: 1.0, 2.5 y 20.0 ml

Agujas desechables de las siguientes especificaciones 20 x 38 mm., 21 x 32 mm. y 25 x 16 mm.

Tubos de vidrio PYREX con tapón de rosca de 13 x 100 mm.

Perlas de vidrio de 5 mm. de diámetro

Pipetas Pasteur desechables CMS Cutin Mathenson Scientific.

Frascos de paredes rectas de vidrio neutro de 50 ml.

Tapones de hule de OO.

Pipetas de 2, 5, y 10 ml graduadas en 0.1 ml

Pipetas cuenta glóbulos blancos (Propper)

Cámara de Neubauer

Tubos cónicos de vidrio PYREX de 10 ml graduados en 0.1 ml

Propipetas de hule

Portaobjetos de 26 x 76 mm.

Cubreobjetos de 22 x 22 mm.

Frascos para líquido de centelleo, Bechman Instrument Inc. Scientific instruments Division

Tubos de vidrio PK de 15 x 100 mm.

Reactivos Biológicos

Medio de cultivo TC-19910X (Hanks), Difco Laboratories Detroit.

Ficoll, Pharmacia Fine Chemicals.

Hypaque, Winthrop products Ins.

Ampulas de solución salina estéril

Ampulas de agua bidestilada.

Fitohemaglutinina P (Difco)

Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC)

Sulfato de estreptomina Farmacéuticos Lakeside

Acido tricloroacético

F.P.O 2,5-difeniloxazol

F.D.P.C.P 1,4-bis-2-(5 feniloxasolil) benceno.

Biosolv Beckman Instruments Inc. Scientific instruments division

Bicarbonato de sódio

Colorante de Wright

Fenol

Muestras Biologicas

- Sangre venosa humana de pacientes clinicamente sa nos, y de fumadores crónicos de marihuana.
- Fitoemaglutinina, la FHA empleada en este estu--
dio, fue de la marca comercial Difco lote 0528-56 rehidratada con 5 ml de agua destilada estéril y conservada en refrigeración, habiéndose observado que es estable durante un mes.
- A⁹-tetrahidrocanabinol, el A⁹-THC empleado en este estudio, fue cedido por amabilidad del Centro Mexi-
cano de Estudios en Farmacodependencia (CEMCF) a -
partir del cual se hicieron las diluciones corres-
pondientes para tener las μmol empleadas como esti-
mulantes de los cultivos problema.
- Ficoll-Hypaque, se disolvieron 2.7 gr. de Ficoll -
en 30 ml de agua libre de hierro y a 10 ml de Hypa-
que (50%) se le agregaron 4.7 ml de agua libre de
hierro, para hacer la mezcla se medieron 12.5 ml -
de Hypaque más 30 ml de Ficoll.
- Líquido de centelleo, el líquido de centelleo se -
prepara de la siguiente forma:

PPD	4 gr.
POPOP	100 gr.
Tolueno	1000 ml.

Lavado y manejo del material de vidrieria. El lavado y manejo del material de vidrieria empleado para el culti-
vo de linfocitos, debe ser muy cuidadoso, con el objeto de eliminar cualquier contaminante que pudiera resultar nocivo o tóxico para las células en cultivo.

Dicho material se coloca en tinas de plástico que contien

nen detergente 7X o Extran al 1% sumergiéndolo completamente con esta solución. Se deja durante 10 a 12 horas. Se cepilla perfectamente el material con esta solución. Se enjuaga en agua destilada. Después se sumerge nuevamente el material en agua destilada durante una hora -- aproximadamente. Se deja escurrir, se seca en el horno a 80°C y se envuelve para su esterilización en autoclave a 20 libras de presión, temperatura de 120°C, durante 30 minutos.

M E T O D O

El presente estudio se llevó a cabo en 28 pacientes que se distribuyeron en dos grupos. A todos ellos se les solicitó que contestaran el contenido del cuestionario - Exp. Cod. S.I.No E6-a, que se muestra en las siguientes hojas.

- GRUPO I.- 13 pacientes del sexo masculino que tienen dentro de sus antecedentes el hábito de fumar marihuana.
- GRUPO II.- 15 pacientes del sexo masculino y femenino cuya edad varió de 14 a 38 años clínicamente "sanos" los cuales tenían el antecedente de no haber usado psicotrópicos.

A cada individuo control o problema se le practicaron -- tres diferentes tipos de cultivos. Con FHA, con Δ^9 -THC y con solución salina al 0.85%. El método que se siguió en este estudio fue el siguiente:

Exp. Cod. D.I.NoE₆-a

FICHA DE IDENTIFICACION

NOMBRE _____ SEXO _____ EDAD _____ AÑOS _____

EDO. CIVIL _____ OCUPACION _____ LUGAR DE ORIGEN _____

LUGAR DE RESIDENCIA _____ ESCOLARIDAD _____

REG. No. _____ FECHA DE ESTUDIO _____

1.- Le gusta tomar refresco ?

SI (1) NO (2) CUAL (ES) _____

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

2.- Suele acompañar los refrescos de pastillas ?

SI (1) NO (2) CUAL (ES) _____

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

Acostumbra tomar alguna(s) pastilla(s) para sentirse bien ?

SI (1) NO (2) CUAL (ES) _____

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

Para trabajar mejor ?

SI (1) NO (2) CUAL (ES) _____

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

Para estar despierto ?

SI (1) NO (2) CUAL (ES) _____

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

Toma usted bebidas embriagantes ?

SI (1) NO (2) CUAL (ES) _____

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

Junto con otros estimulantes ?

SI (1) NO (2) CUAL (ES) _____

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

8.- Llega a emborracharse ?

SI (1) NO (2)

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

9.- Fuma usted tabaco ?

SI (1) NO (2)

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

10.- Acostumbra usted usar tiner ?

SI (1) NO (2)

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

11.- Acostumbra usted usar marihuana ?

SI (1) NO (2)

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

12.- Acostumbra usted usar cemento ?

SI (1) NO (2)

a) desde cuando ? _____

b) hasta cuando ? _____

c) frecuencia _____

13.- Actualmente usa cualquier otro estimulante

SI (1)

NO (2)

CUAL (ES) _____

14.- Solos ?

SI (1)

NO (2)

CUAL (ES) _____

15.- Combinados ?

SI (1)

NO (2)

CUAL (ES) _____

Toma de la muestra.- La toma de la muestra se hizo por medio de punción venosa periférica, previa asepsia, obteniéndose 15 ml de sangre que se separaron en 3 alícuotas de 5 ml.

De cada muestra se tomaron 10 ml que se depositaron en -- dos tubos con tapón de rosca los cuales contenían una perla de vidrio por cada ml de sangre, y se agitó durante 12 minutos para desfibrinar.

La sangre desfibrinada se separó de las perlas de vidrio y se diluyó 1:1 con solución salina 0.85%

Los 5 ml restantes se depositaron en tubos con tapón de rosca y se dejaron coagular para posteriormente separar el suero.

Obtención de linfocitos por gradiente isocinético

- 1.- En los tubos PK de 15 x 100 mm. Se midieron 4 ml de la mezcla de Ficoll Hypaque se le adicionaron 6 ml de la muestra de sangre diluida 1:1 con solución salina, se procuro que la sangre resbalara por las paredes del tubo para formar dos fases.
- 2.- Se centrifugaron los tubos a 1350 rpm durante 35 minutos a 22°C procurando que esta centrifugación fuera hecha de inmediato, después de adicionar la sangre al gradiente.
- 3.- Se separó con pipeta Pasteur el anillo formado en la interfase que estaba constituido por los linfocitos.
- 4.- Se centrifugó para quitar el plasma tomado junto con los linfocitos, a 1200 rpm por 10 minutos y se resuspendió el botón de linfocitos en 2 ml de medio de cultivo TC-199

- 5.- Se centrifugó para lavar los linfocitos a 1200 rpm durante 10 minutos desechando el sobrenadante, y repitiendo este paso 2 a 3 veces más, se resuspendieron las células en 1 ml de medio de cultivo se contaron y se diluyó para poner 0.5 ml de esta suspensión a cada frasco.

Tratamiento de las células para el cultivo

- 1.- En cada botella de cultivo se midieron 5 ml del medio TC-199 mezclado con suero autólogo a tener el 8% de concentración final y 0.1 ml de la suspensión de eritrocitos.
- 2.- En los cultivos control negativo se midió 0.1 ml de solución salina.
- 3.- Se adicionaron 0.4 μ Mol contenidas en 0.4 ml, 0.6 μ Mol en 0.6 ml, ó 0.8 μ Mol en 0.8 ml de A⁹-tetrahidocannabinol a cada uno de los diferentes cultivos - problema.
- 4.- Se ajusto el pH con bicarbonato de sodio al 10% hasta obtener un valor de aproximadamente 6.4
- 5.- Se adiciono 0.5 ml de la suspensión celular a todos los diferentes cultivos. Se taparon herméticamente las botellas de cultivo con tapones de hule.
- 6.- Se incubaron los cultivos a 37^oC durante 48 horas - cuidando que dentro de este lapso el pH no variara.
- 7.- A las 48 horas se agregó a todos los cultivos 1.0 μ C de timidina tritiada (T-H³).
Se continuó la incubación por 24 horas más a la misma temperatura.

Cosecha

Al tiempo de la cosecha se centrifugaron los cultivos a 1000 rpm durante 15 minutos.

Se descartó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 2 ml de agua destilada, con el objeto de lisar los eritrocitos para que la hemaglobina no aumentara el "apagamiento" del centelleo líquido.

Se agregó 1.0 ml de biosolv a cada tubo, dejando que se llevara a cabo la digestión del cultivo por 24 horas a temperatura ambiente.

El contenido de cada tubo se transfirió al frasco para centelleo líquido lavando el tubo con 0.6 ml de etanol absoluto.

Se incubó el frasco para centelleo líquido entre 70 a -75°C por una hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se agregaron 15 ml. de la solución de líquido de centelleo a cada frasco.

La radiactividad de los frascos se midió en contador de centelleo líquido. El resultado se expresa como cuentas por minuto (cpm) y como incorporación específica de T-H^3 .

La relación de actividad está dada por la incorporación de T-H^3 por las células en presencia de antígeno, entre la incorporación de T-H^3 en ausencia de antígeno, es decir el índice mitótico.

$$\text{Índice Mitótico} = \frac{\text{Incorporación de } \text{T-H}^3 \text{ por las células en presencia de Ag.}}{\text{Incorporación de } \text{T-H}^3 \text{ por las células en ausencia de Ag.}}$$

RESULTADOS

Este estudio se llevó a cabo en 28 pacientes, que se distribuyeron en dos grupos:

Grupo I.- Pacientes control constituido por 15 personas, tanto mujeres como hombres no adictos.

Grupo II.- Pacientes en estudio constituido por 13 personas, únicamente del sexo masculino.

Los 15 pacientes del grupo control tenían edades de 14 a 38 años, dos pacientes casados y el resto solteros, una persona tenía como lugar de residencia La Paz, B. C. y el resto residían en el D.F. como se muestra en la tabla No. 1

Los 13 pacientes del grupo II ó grupo en estudio tenían de 19 a 29 años de edad, de estos dos pacientes eran casados y el resto solteros. Diez de ellos residían en el D. F. y los otros tres en diferentes estados de la República Mexicana, - estos datos se muestran en la tabla No. 2

Algunas de las características de la forma como fue usada la marihuana y algunos otros psicotrópicos en los pacientes del grupo II son las siguientes:

Todos ellos refirieron el consumo de marihuana en forma de cigarrillo, cuatro de ellos refirieron usar además otro tipo de estimulantes tales como, hongos, L.S.D., anfetaminas, barbitúricos, peyote, etc. El tiempo de consumo de los psicotrópicos en este grupo varió de 4 a 10 años. Es importante mencionar que el paciente No.12 en el momento del estudio te

nía dos años de no consumir ningún agente psicotrópico, estos datos se especifican en la tabla No. 3

Dependiendo del estimulante empleado como mitógeno, se llevaron a cabo cuatro diferentes tipos de cultivos para cada una de las 28 muestras. Así tenemos cultivos - estimulados con tres diferentes concentraciones de A^9 -THC, un cultivo estimulado con FHA y un cultivo con solución salina, éste último usado como control negativo para una de las muestras.

A todos los cultivos se les controlaron los siguientes parámetros: estimulante empleado, concentración de antibiótico, $\mu\text{mol.}$ de A^9 -THC, μC de timidina ($T-H^3$), variación en la concentración de suero autólogo, variación en la concentración de suero autólogo, variación de pH, así como cuenta diferencial de los linfocitos se parados en el gradiente isocinético.

La concentración de A^9 -THC para los diferentes cultivos fué la siguiente: 0.4, 0.6 y 0.8 $\mu\text{mol.}$ por cada cultivo. Para los cultivos estimulados con FHA se utilizó - 0.1 ml del liofilizado comercial reconstituido en 5 ml. de agua destilada. Se empleo 0.1 ml de solución salina 0.85% para los cultivos control negativo. En ningún momento se varió la concentración de estos, siendo la FHA del mismo lote y el A^9 -THC de la misma muestra.

En cuanto al empleo del antibiótico, éste fué usado en dos diferentes concentraciones que fueron de 50 y 5 mg. por cultivo. Con las dos diferentes concentraciones no se observó ningún cambio apreciable en los resultados - obtenidos.

El volumen de eritrocitos autólogos como fuente de oxígeno para el cultivo fué de 0.1 ml estos se emplearon en una suspensión ajustada 1:2 con solución salina al 0.85%

El número de células por cultivo que se empleó en las pruebas de los pacientes del grupo I fue de 475×10^3 a 240×10^3 y de 280×10^3 a 530×10^3 para los pacientes del grupo II. La cuenta diferencial de los linfocitos separados por medio del gradiente isocinético dio una variación de 95 a 97% de pureza de linfocitos en todas las preparaciones. Se adicionó suero autólogo con el fin de enriquecer el medio de cultivo, su cantidad varió para cada muestra desde 6% -- hasta 10% de concentración final en el cultivo, tanto en el grupo control como en el grupo problema. No se encontró -- concordancia en los resultados al variar la concentración -- del suero.

A todos los cultivos del estudio se les adicionó un volumen de 0.1 ml de timidina tritiada (T-H³) equivalente a 1 uC de T-H³.

Por último la variación de pH valorada en forma comparativa fué mínima en todos los cultivos y por ello no fué necesario ajustarlo durante el período de incubación.

Los índices mitóticos se presentan en las tablas 4 y 5. En la tabla No. 4 se presentan los índices mitóticos obtenidos en el grupo de los pacientes control con los resultados siguientes: en cinco muestras los índices mitóticos fueron elevados para los cultivos estimulados con A⁹-THC en relación a los de FHA. Tres muestras presentaron un mayor índice mitótico para los cultivos estimulados con FHA.

En la tabla No. 5 se presentan los índices mitóticos obtenidos en el grupo II es decir de los pacientes en estudio, con los siguientes resultados: Cinco muestras en las cuales el índice mitótico es mayor para los cultivos estimulados con FHA, dos cultivos en los cuales la estimulación mitótica es similar tanto en los cultivos estimulados con A^9 -THC como en los cultivos estimulados con FHA, hay únicamente dos muestras en las cuales el índice mitótico es mayor para los cultivos estimulados con A^9 -THC.

En el grupo de los individuos control, el promedio de la cifra de los índices mitóticos fué mayor, para los cultivos estimulados con 0.4 μ mol de A^9 -THC en relación con los cultivos estimulados con 0.6 y 0.8 μ mol de A^9 -THC y FHA, éstos últimos tienen un índice semejante. Estos resultados se presentan en forma esquemática en la gráfica No. 1

En el grupo de los pacientes problema el mayor índice mitótico promedio observado correspondió a los cultivos estimulados con FHA. En los cultivos estimulados con A^9 -THC tuvieron cierta predominancia los estimulados con 0.8 μ mol de A^9 -THC en relación a los estimulados con 0.4 y 0.6 μ mol. Estos resultados también se presentan en forma esquemática en la fig. No. 2

Finalmente en la gráfica No. 3 esta representado el promedio de índices mitóticos de acuerdo con el estimulante empleado, y se compra el grupo de pacientes control con el grupo de los pacientes adictos.

CARACTERISTICAS DEL GRUPO CONTROL

PACIENTE N°	SEXO	EDAD	ESTADO CIVIL	LUGAR DE RESIDENCIA
M.L.S.	F	25	soltera	D. F.
M.R.H.	M	16	soltero	D. F.
A.P.C.	F	25	soltera	D. F.
R.R.G.A.	F	20	soltera	LA PAZ, B.C.
B.R.H.	M	27	soltero	D. F.
J.M.M.G.	M	22	soltero	D. F.
I.R.H.	M	19	soltero	D. F.
J.E.M.L.	M	38	casado	D. F.
D.R.H.	M	21	soltero	D. F.
L.R.H.	M	20	soltero	D. F.
S.J.A.S.	F	22	soltera	D. F.
J.R.H.	F	24	casada	D. F.
E.R.H.	F	14	soltera	D. F.
S.R.H.	F	17	soltera	D.F.
I.T.A.	F	24	soltera	D.F.

CARACTERISTICAS DEL GRUPO PROBLEMA

PACIENTE N°	SEXO	EDAD	ESTADO CIVIL	LUGAR DE RESIDENCIA
1	M	21	soltero	D. F.
2	M	23	soltero	D. F.
3	M	25	casado	TIJUANA, B. C.
4	M	22	soltero	D. F.
5	M	19	soltero	D. F.
6	M	29	soltero	D. F.
7	M	25	casado	D. F.
8	M	25	soltero	TAMAULIPAS
9	M	27	soltero	TEXCOCO
10	M	23	soltero	D. F.
11	M	22	soltero	D. F.
12	M	--	soltero	D. F.
13	M	23	soltero	D. F.

TIEMPO Y FRECUENCIA DEL USO DE MARIHUANA FUMADA EN EL GRUPO PROBLEMA

<u>PACIENTE N°</u>	<u>PSICOTROPICOS EMPLEADOS</u>	<u>TIEMPO DE USO</u>	<u>CANTIDAD Y FRECUENCIA EN PROMEDIO</u>
1	Marihuana	8 años	1 cigarrillo de 3 a 4 veces por semana.
2	Marihuana	8 años	2 cigarrillos diarios
3	Marihuana	6 años	1 cigarrillo diario
** 4	Marihuana y Pastillas	10 años	8-12 cigarrillos diarios
** 5	Marihuana y Pastillas	5 años	1 cigarrillo al día
6	Marihuana	5 años	3 ó 4 cigarrillos al mes
7	Marihuana	6 años	5-7 cigarrillos al mes
8	Marihuana	8 años	3 cigarrillos al mes
** 9	Marihuana y Hongos	9 años	1 cigarrillo al día
10	Marihuana, Hongos, L.S.D. y Peyote	9 años	1 ó 2 cigarrillos al día
11	Marihuana	6 años	1 a 2 cigarrillos al día
** 12	Marihuana y Pastillas	8 años	3 a 4 cigarrillos al día
13	Marihuana	4 años	3 a 4 cigarrillos a la semana

** Estos pacientes habian consumido otro tipo de estimulantes durante algun período pero no al tiempo del estudio

TABLA No. 4

INDICE MITOTICO OBTENIDO EN EL GRUPO N° 1 DE INDIVIDUOS CONTROL DE ACUERDO CON EL ESTIMULANTE MITOGENICO EMPLEADO Y NUMERO DE CELULAS

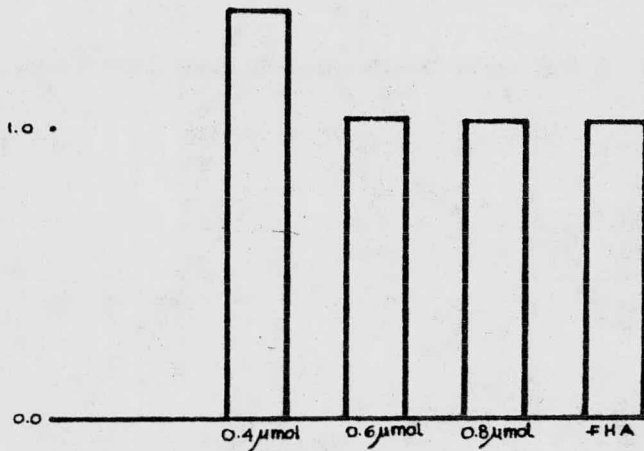
NOMBRE	N° DE CELULAS	Δ^9	-	T	H	C	F H A
		0.4 μ Mol.		0.6 μ Mol.		0.8 μ Mol.	
M. R. H.	800.000	1.30		1.40		1.28	0.89
A. P. C.	800.000	0.84		1.02		1.24	1.39
B. R. H.	500.000	1.72		1.08		1.59	1.45
J. M. L.	550.000	1.30		1.40		1.33	1.39
R. H. L.	650.000	0.70		0.72		0.76	0.92
E. R. H.	475.000	1.03		0.87		1.14	0.98
S. R. H.	650.000	0.87		0.91		0.79	0.91
I. T. A.	200.000	1.22		1.44		0.94	0.79
L. S. I.	1400.000	2.16		1.56		2.08	1.71
R. R. G.	1125.000	1.47		1.56		0.87	1.00
R. H. D.	1275.000	0.97		0.81		0.77	0.89
S. A. J.	1325.000	0.78		0.68		0.76	0.72
J. R. H.	1050.000	0.96		0.90		0.74	1.07
J. M. M.	2500.000	1.22		1.35		0.90	0.95
I. R. M.	2400.000	0.65		0.59		0.52	0.63

TABLA No 5

INDICE MITOTICO OBTENIDO EN EL GRUPO N° 2 DE PACIENTES
DE ACUERDO CON EL ESTIMULANTE MITOGENICO EMPLEADO Y NUMERO DE CELULAS

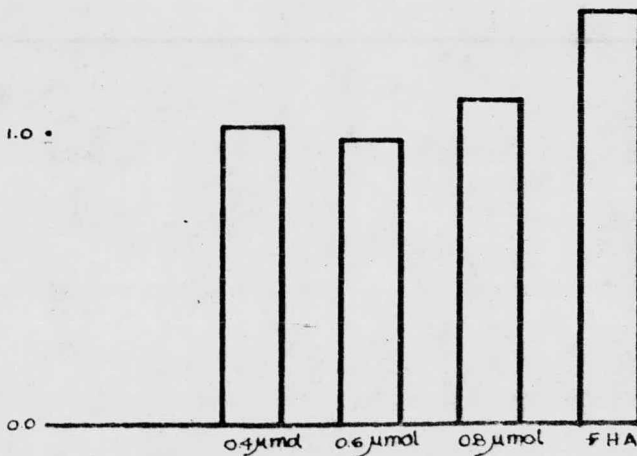
PACIENTE	N°	— T H C			F H A
		0.4 μ Mol.	0.6 μ Mol.	0.8 μ Mol.	
3	280.000	1.08	1.07	1.00	1.01
6	840.000	0.83	0.84	0.77	0.53
11	300.000	1.46	1.21	1.50	1.10
1	1150.000	0.44	1.08	0.79	0.75
2	1500.000	1.07	0.86	1.36	1.00
4	1395.000	0.94	0.87	0.74	3.95
5	1125.000	1.21	1.20	1.49	4.71
12	1600.000	1.26	0.99	0.90	1.18
13	1600.000	1.01	0.99	0.92	1.00
7	2200.000	0.69	0.79	0.75	0.68
8	5300.000	0.84	0.95	1.06	0.92
9	3800.000	1.77	1.09	2.13	0.91
10	3050.000	0.92	0.91	1.06	1.33

2.0 .



GRAFICA N° 1
INDICE MITOTICO EXPRESADO EN PROMEDIO
DE ESTIMULACION DEL GRUPO CONTROL.

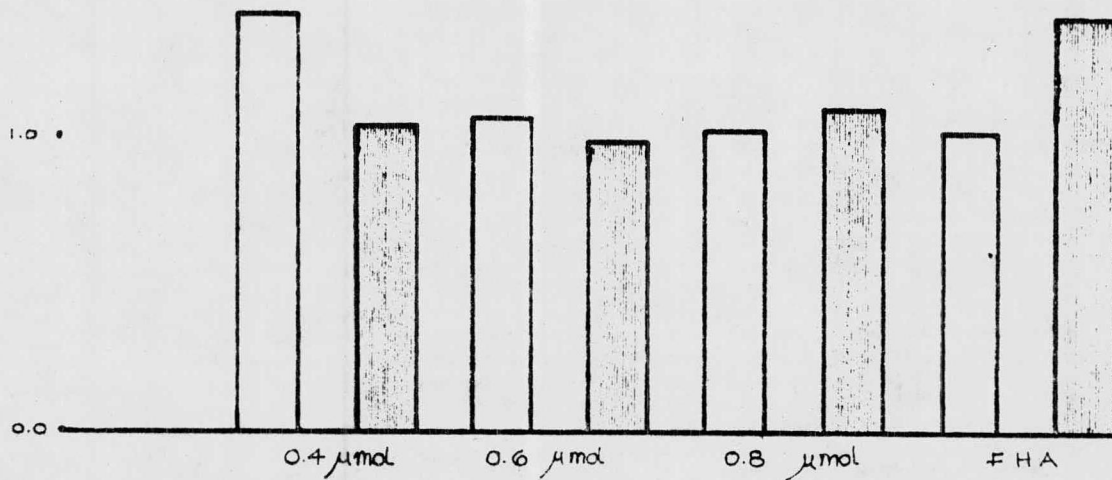
2.0 .



GRAFICA N° 2
INDICE MITOTICO EXPRESADO EN PROMEDIO
DE ESTIMULACION EN GRUPO PROBLEMA

RELACION DE INDICE MITOGENICO ENTRE LOS GRUPOS CONTROL Y PROBLEMA DE LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS, ESTIMULADOS CON F.H.A. Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE Δ^9 -THC.

2.0 •



GRUPO N° 2 (GRUPO PROBLEMA).

DISCUSION, RESUMEN Y CONCLUSIONES

Para hacer la discusión de los resultados de nuestro trabajo, debemos tomar en cuenta varios factores que pudieran en un momento dado influir en los resultados obtenidos, por ejemplo: las enfermedades virales y el estado de nutrición. Esto último es particularmente importante ya que los pacientes por su farmacodependencia dejan de ingerir alimentos que pudieran influir en la respuesta inmune. Una circunstancia muy importante a considerar en cuanto al manejo del paciente dependiente de psicotrópicos, es la enorme dificultad de que asistan a centros hospitalarios o de salud. En este trabajo en particular nos vimos en la necesidad de ir a tomar las muestras de sangre para el cultivo al lugar de residencia de estos pacientes sujetándonos a sus condiciones de tiempo y sólo se logró esto después de una ardua labor de convencimiento. A este respecto pensamos que para lograr el acercamiento de los pacientes con problema de farmacodependencia a los centros de rehabilitación, es conveniente el que se implementen campañas en los medios de difusión masiva para orientar a los pacientes y al público en general.

Analizando los resultados encontrados en este estudio se observa que los índices mitóticos son diferentes tanto en los cultivos de los pacientes como en los cultivos control. Sacando el porcentaje de pacientes que respondieron a los diferentes estimulantes, encontramos que este es diferente para los dos grupos, se nota un menor porcentaje de respuesta en el grupo control con respecto al grupo en estudio, tanto para la FHA como para el A^9 -THC en las diferentes concentraciones. Únicamente cuando se utilizaron $0.6 \mu\text{mol}$ de A^9 -THC como estimulante, -

el porcentaje de pacientes que respondieron fué mayor en el grupo control, sin embargo este valor es menor del 50%.

Si promediamos los índices mitóticos obtenidos, en grupos de acuerdo con el estimulante empleado, el promedio con mayor índice mitótico obtenido se encuentra en los cultivos estimulados con 0.4 umol de A^9 -THC en el grupo de los pacientes control, siendo este de 1.4, en cambio este promedio para los cultivos con FHA, 0.6 y 0.8 umol de A^9 -THC -- del mismo grupo es de 1.04, 1.05 y 1.04 respectivamente.

La forma como pretendemos explicar estos resultados es la siguiente: el índice mitótico de 1.4 obtenido en los cultivos de linfocitos de personas clínicamente sanas, incubados con 0.4 umol de A^9 -THC, nos hace pensar que aparentemente en estas condiciones el psicotrópico tiene una acción de estimulación mitogénica inespecífica, ya que hay incorporación de $T-H^3$ tanto en los cultivos control como en los cultivos en estudio, como se ve en los resultados promediados de índice mitótico, así como en el porcentaje de pacientes que respondieron, y la explicación del porqué de la diferencia en incorporación de $T-H^3$ entre los cultivos de incubados con 0.4 umol y los incubados con 0.6 y 0.8 umol, -- sería que la dosis de estimulación óptima es del orden de 0.4 umol. Sin embargo los resultados de 1.04, 1.05 y 1.04 para FHA, 0.6 y 0.8 umol de A^9 -THC nos sugiere que estos -- son negativos dada la poca diferencia entre estos y los -- cultivos estimulados con 0.4 umol.

En cambio en el grupo problema el mayor índice mitótico fue para los cultivos estimulados con FHA., esta estimulación corresponde a un índice mitótico de 1.46 en los cultivos -

estimulados con Δ^9 -THC hay índices mitóticos bajos, lo que nos hace pensar que este grupo en estas condiciones no presenta hipersensibilidad del tipo retardado a este psicotrópico, dado el bajo índice mitótico obtenido en promedio aún cuando el porcentaje de pacientes que respondieron es de 50 aproximadamente en las tres diferentes concentraciones de Δ^9 -THC. Sin embargo debemos considerar otro tipo de factores que pudieran afectar o influir en la capacidad mitogénica de las células al estimularse in vitro, y de aquí el haber obtenido estos resultados que se ven contradictorios en los dos grupos.

Si relacionamos el número de células con el índice mitogénico obtenido en este estudio, encontramos que no se aprecia una relación directa entre el número de células y el índice mitótico obtenido tanto en cultivos con menos de 1×10^6 células como en cultivos con más de 2×10^6 células. En los cultivos problema tampoco encontramos una relación directa entre el número de células por cultivo y el índice mitótico obtenido, sin embargo cabe mencionar que los índices más elevados para FHA se encuentran en los cultivos a los cuales se les adicionó entre 5×10^5 a 1.5×10^5 células.

Por otro lado si analizamos el tiempo de uso de la marihuana en estos pacientes con el tipo de respuesta obtenido podemos decir, que no hay una relación directa que nos de una explicación entre el tiempo de uso de la droga, ya que encontramos pacientes que tienen entre 6 y 10 años de usar marihuana con una frecuencia muy elevada de consumo, que presentan una buena respuesta a la FHA y sin respuesta al Δ^9 -THC (pacientes 4 y 8) así como pacientes con poco tiem-

po de usar este psicotrópico, los que no presentan respuesta a la FHA ni al A⁹-THC (pacientes 7 y 8).

En relación con el material empleado en este estudio, están las botellas de vidrio de 50 ml que no son las adecuadas pero que resultaron útiles en otro tipo de estudios de estimulación mitogénica tales como, los cultivos previos al estudio que se efectuaron como entrenamiento, sin embargo cabe mencionar que en estos cultivos la valoración de los resultados fué objetiva contándose el número de blastoides con el microscópio de luz. A este respecto pensamos que el no tener un recipiente adecuado para el cultivo influyo en los resultados obtenidos.

Nos llama la atención el hecho de que tanto en los cultivos de los pacientes problema como en los control éstos son siempre positivos o negativos independientemente de si se estimuló con FHA o A⁹-THC como se aprecia de acuerdo con los resultados obtenidos, de aquí el motivo para pensar que estos resultados esten bajo la influencia de otros factores para nosotros desconocido y que no fue posible abarcar en este estudio inicial, pensando que este tipo de dificultades puedan superarse en estudios posteriores.

RESUMEN

Se estudiaron treinta muestras divididas en dos grupos; - grupo I pacientes normales que aseguraron no consumir -- ningún tipo de psicotrópicos y grupo II formado por pa--- cientes con antecedentes de consumo de psicotrópicos, en especial la marihuana.

Se trató de evidenciar una posible sensibilización del ti po celular al A^9 -THC en estos pacientes fumadores cróni-- cos de marihuana, se empleo la transformación blastoide - de los linfocitos "T" in vitro por estimulación con FHA y A^9 -THC, este último en tres concentraciones diferentes. - La valoración de los resultados fué por la incorporación de timidina ($T-H^3$) en estos cultivos y contándose en centelleo líquido.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos fueron variables para los dos -- grupos, interpretando de esta forma los resultados, podemos concluir que el A^9 -THC no se comporta como estimulante mitogénico inespecífico que evoque una respuesta secundaria del tipo celular, y por lo tanto no hay una sensibilización del tipo retardado en estos pacientes fumadores -- crónicos de marihuana. Probablemente influyeron en los - resultados factores desconocidos quedando estos resultados a comprobación posterior y además la posibilidad de nuevas formas de enfoque para estudiar el problema de la farmacoddependencia y sus posibles relaciones con la respuesta inmune de tipo celular.

BIBLIOGRAFIA

1. Mendelson J. H., J. Kuennle., J. E. Uingboe and T. Sabor. 1974, Plasma testosterone levels before during and after chronic marihuana smoking; - The New England Journal of Medicine 291:1051
2. Brashear R. E., M. T. Kelly and A. White. 1974, Elevated plasma histamine after heroin and morphine. J. Lab. clin. Med. Vol. 7 451
3. Rabin B. S., and C. D'Amada. 1973, Immunoglobulin alterations associated with heroin addiction. Clin Exp. Immunol., 14:359
4. Mickerson D. S., R. C. Williams., M. Boxmeyer, - and P. G. Quie 1970. Increased Opsonic capacity of serum in chronic heroin addiction. Ann - Int. Med. 72:671
5. Friedman E. A., T. K. Sreepada; and N. D. Anthony 1974 Heroin associated nephropathy., Nephron 13:421
6. Ringle D. A., and B. L. Herndon, 1972. In vitro morphine binding by sera from morphine treated rabbits. J. Immunol. 109:174
7. Dekster M. E., C. Cherubin; M. Kilcoyne; G. Cooper and M. Yoel 1973. Absence of morphine- binding activity in serum from heroin addicts. Clin Exp. Immunol, 13:613

8. Berkowitz B. and S. Spector. 1972 Science 178:1292
9. Gupta S., M. H. Grieco and P. Cushman 1974. Impairment of rosette forming T lymphocytes in chronic - marihuana smokers. The New England Journal of Medicine 291:874
10. Nahas G. G., N. Suciú-Foca., J. P. Armand 1974. Inhibition of celular mediated immunity in marihuana smokers. Science 183:419-420
11. Nahas G. G., D. Zagury., I. M. Schwartz. 1973 Evidence for the possible immunogenicity of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) in rodents. Nature 243:407-408
12. Bellanti A. J. 1972. Inmunologia 1a. Ed. Interamericana. México, Méx.
13. Barret J. T. 1972. Inmunologia 1a. Ed. Interamericana, México, Méx.
14. Ivan M. Roitt. 1976 Inmunologia Esencial 2a. Ed. -- Editorial Jims Barcelona.
15. Org. Mund. Salud. Serv. Inf. Tecn; 1971; 478
16. Peres-Reyes M., M. C. Timmons and M. A. Lipton 1972 Science, 177:633
17. Kreuz S. D., and J. Axelroe; 1973. Δ^9 -Tetrahydrocannabinol: Localization in body fat. Science 179; 391

18. Michalowsky A. 1963; Time - course of D.N.A. synthesis in human leucocyte cultures. *Exp. Cell Res.* 32:609
19. Dutton R. W. and J. D. Tady; 1964. An in vitro system for the study of the mechanism of antigenic stimulation in the secondary response. *Immunology* 7:40
20. Lohrman P. H., M. C. Graw; and G. R. Graw, 1974 stimulated lymphocyte cultures; *The Journal of Experimental Medicine*, 139:1037.
21. Yamamura M. 1973. Standardization of lymphocyte transformation to phytohaemagglutinin, *Clin. Exp. Immunol* - 14:457-467
22. Rigas D. A., J. G. Li., and E. E. Osgood, 1951 Abstracts Western Society for Clinical Research Seattle; Jan. 26:27
23. Zamayoa Z., 1975 Purificacion de fitohemaglutinina tesis Facultad de Quimica U.N.A.M.
24. Downing. H. J., 1953 plant agglutinins and mitosis; *Nature*, 217:654-655
25. Nowell P. C., 1960. Phytohaemagglutinin an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes; *Cancer Res* 20:462
26. Elves M. W., and M. C. G. Israels; 1963. The mitogenic property of phytohaemagglutinin: studies on human leucocyte., *Brit. J. Haemat* 9; 406

27. Hirschhorn. R., G. Briltinger., K. Hirschhorn and G. Weissman; 1968 studies on lysosomes. XII Redistribution of acid hydrolases in human lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin; J. Cell. Biol, 37:412
28. Mechoulam R., 1970. Marihuana chemistry, Science, -- 168:1159-1166
29. Manno J. E., G. F. Kiplinger; S. E. Haine; I. F. Bennett and R. B. Forney, 1970. Comparative effects of smoking marihuana or placebo on human motor and mental performance. Clin pharmacol. Ther 11:805-8=5