



47
Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

Detección de Metabolitos de Marihuana en
Orina, por Radioinmunoensayo.



T E S I S

Que para obtener el título de

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Orientación: BIOQUIMICO MICROBIOLOGO

p r e s e n t a :

LUIS ESTEBAN TOCA PORRAZ



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.



... Tesis 1977 ...
... M-785 ...
... 384 815 ...



... LIBRERIA ...

Presidente
Vocal
Secretario
1' Suplente
2' Suplente

Ing. Ignacio Diez de Urdanivia
Q.F.B. Etelvina Medrano
Q.F.B. Enrique Calderón
Q.F.B. César Domínguez
Q.F.B. Salvador Martín Sosa

Sitio donde se desarrolló el Tema : Universidad Nacional
Autónoma de México. -

Nombre y firma del sustentante : LUIS ESTEBAN TOCA PORRAZ.

Nombre y firma del asesor del tema : IGNACIO DIEZ DE URDA--
NIVIA.

INTRODUCCION

Esta tesis tiene por objeto mencionar los adelantos - que hay en diferentes países para la detección de metabolitos de - Marihuana, teniendo en cuenta que dentro del panorama estudian- - til actual, se considera que algunos de los problemas más graves - que confrontan el alumnado de secundarias, preparatorias y univer- - sitarias, es el hábito de fumar o ingerir la Cannabis sativa.

En diversos países del Mundo, como son Inglaterra, - Suecia, Escandinavia, etc..., el análisis de orina en casos de dro- - gas de abuso se ha utilizado para distintos tóxicos, como narcóti- - cos, anfetaminas y barbitúricos, éstos han sido detectados por la - técnica de cromatografía, pero la inmunología ha tenido mayor im- - portancia debido a su especificidad con los cannabinoides que no - pueden ser detectados por otros métodos.

La introducción de un método exquisitamente sensi- - ble y de gran especificidad para derivados de Cannabis, en espe- - cial el 11-OH-THC y el delta 9 THC en líquidos corporales es el - Radioinmunoensayo, que puede darnos resultados positivos con solo - nanogramos de los metabolitos mencionados. Este método, que a - continuación se mencionará, es utilizado para cuantificar hormonas - corporales y fármacos ya sean de abuso o no, en México se ha uti - lizado y se utiliza para Difenilidantoina y se espera que pronto - se pueda poner en práctica para los metabolitos de la marihuana, - así pues esta tesis servirá para referencia y bibliografía, para los - futuros investigadores.

GENERALIDADES DE LA PLANTA. (1-4)

HISTORIA: La Marihuana fué conocida desde el siglo XV a.c., encontrándose mencionada en un tratado de Botánica chino llamado "Rhy-ya" el cual hace notar el hecho de que existen dos variedades de Marihuana, una productora de granos y otra únicamente de flores. Se ha pensado que se trata del macho y la hembra de la planta y no de dos variedades diferentes. Otros autores remontan su origen a 900 a.c., diciendo que el Nephentes de quien habla Homero, tenía como base dicha planta y por último que su antigüedad se remonta a la India donde se cultivo desde 800 ó 900 a.c., Posteriormente se menciona como medicamento en los escritos de "Susmuta", sobre la medicina Hindú. Herodoto mencionó que la planta crece en Seyhia y que los Tracios hacían trajes con élla. Dioscórides le reconoció propiedades benéficas y perjudiciales al hombre. Es descrita como hilarante en el "Zend-Avesta". En los tratados hindúes se le atribuye origen divino y es designada con el nombre de Vijahia y Ananda; productora de vida. En Grecia, Galeno la citó como carminativa y afrodisiaca; pero no como embriagante. Los escritos sánscritos mencionan las "Píldoras de la alegría" formadas de marihuana y azúcar, también Marco Polo detalla la Marihuana como un embriagante.

Parece ser que no fué sino hasta la edad media, cuando se difundió su empleo, siendo los árabes los encargados de ello, ya que la conocían de la India o Persia. Se considera que fué en el año 658 de la Egira, cuando un jefe Cheich llamado Haider la popularizó entre los árabes que la denominaron "Haschisch". Al tomar la carta de la ciudadanía entre las razas nómadas del desierto, algunos investigadores piensan que fué usada como arma política por el llamado "Viejo de la Montaña" (Hasam-Ben-Sabah-Homairi) que fundó la secta de los Hashishinos, a los cuales sometió a su voluntad gracias al empleo de la Marihuana. La campaña de Napoleón en Egipto dió múltiples enseñanzas respecto a los efectos de la planta, no obstante lo cual, sus propiedades -

terapéuticas fueron empleadas hasta el siglo pasado. Se presume -
 fué introducida en Europa por el naturalista Sonnerat, siendo utili-
 zada terapéuticamente por vez primera en Tours (Francia), como -
 auxiliar en algunos casos de alteraciones mentales por el profesor -
 Moreau, consecutivamente a los trabajos de O' Sanghenesy de Cal-
 cuta. Otras personas opinan que fué despues de las observaciones-
 de García de Orta en 1809 cuando se introdujo en Europa. Esto -
 contradice a los datos obtenidos en "Reconsideraciones de la Ma-
 rihuana" (3) que menciona que el Rey Enrique VIII estimuló su -
 cultivo en las granjas inglesas, para el uso en cordelería y la fa-
 bricación de velas para la flota inglesa. El clima de las colonias
 de América fué considerado ideal para el cultivo del Cábamo (nom-
 bre común de la planta) y el lino, los ingleses tuvieron motivos -
 para esperar una cosecha abundante. El Rey Jacobo I ordenó a -
 los colonos producir "Hierro, jarcias, cáñamo, lino y agáve...".-
 Un gran productor de la Marihuana fué George Washington, en sus
 anotaciones menciona: "12 a 13 de Mayo-Sembré cáñamo en la -
 cañada cenagosa, junto al pantano. 1o. de agosto. Comencé a -
 separar (sic) al cáñamo masculino del femenino... muy tardíamente,
 esto sucedió en el año 1765 (4). Si por lo que vemos, el proble-
 ma histórico universal de la Marihuana es tan complicado, en lo -
 referente al nacional encontramos muchas mas opuestas opiniones. -
 Múltiples investigadores han creído que nuestras razas aborígenes -
 conocieron y utilizaron la planta, sin embargo, el padre Sahagún -
 no hizo alusión a ella al describir las plantas de la Nueva España.
 Don Francisco Hernández, médico de Felipe II, que fué enviado -
 por éste a estudiar las plantas medicinales de la nueva colonia, -
 no cita ningún vegetal que tenga semejanza, remota siquiera, con-
 la Marihuana. Algunos autores quizá interpretando mal las citas -
 de las plantas que embriagan, creen ver en las mismas alguna re-
 lación con la Marihuana. Así, la planta llamada Coatlxaxouqui-
 y su semilla Ololinqui, citada por Sahagún, han querido identifi-
 carla con nuestra planta en estudio y posiblemente fundándose en -
 algunos de estos errores F. Flores en la "Historia de la medicina -
 en México" (2) cita a la Marihuana como conocida por los Aztec-
 cas y empleada como anestésico. Despues de muchas tesis, la mas

aceptable es que la planta no se conocía antes de la conquista - y que no fué introducida por los europeos ni como planta textil ni como inhalante, sino que fué introducida por Acapulco en el siglo pasado, viniendo de China o la India y debe su nombre a la - unión de las palabras "María" y "Juana", posiblemente porque alguna mujer de nombre María la había empezado a propagar entre - los soldados, que como sabemos se les llama vulgarmente "Juanes". La primera evidencia que tenemos del uso de la planta como inhalante, es en la Revolución con una canción ferrocarrilera que modifica sus estrofas en canto guerrero "La Cucaracha".

DESCRIPCION BOTANICA (5-8)

ASPECTO MACROSCOPICO : Algunos autores dicen que pertenece a la familia de las Moraceas (5) y otros a la familia de las Cannabinaceas (6). Esta última esta formada por tres especies, que son el Humulus lupulus (lúpulo común) el Humulus japonicus (Lúpulo japonés o chino) y Cannabis sativa (Cáñamo - indico). Estas plantas son hierbas aromáticas con hojas palmeadas - mas o menos divididas, alternas, sencillas, raramente opuestas, con bordes dentados, la estípula es caduca (5) y persistente (6). Ambos géneros son normalmente dióicos, pero la condición de monóicos puede ser incluida en ambos. Las flores son pequeñas, solitarias o frecuentemente en cabezuelas o en receptáculos planos o globosos y de colores variados; las flores masculinas poseen un perianto de cinco hojas y cinco estambres, mientras que las femeninas tienen un pequeño perianto en forma de cáliz (perigonio), un ovario unilocular, dos estigmas manifiestos y un solo óvulo. El fruto puede ser un aquenio (fruto seco, indehiscente y con pericarpio separable con facilidad del tegumento de la semilla) (7), encerrado por el perianto y es una nuez que contiene un embrión curvado (Cannabis) o enrollado (Humulus) con escaso endospermo. (ver fotografías).

CARACTER MACROSCOPICO : Es una planta herbácea, anual, dióica, áspera, que se da bien en tierras cultivadas y en suelos abandonados. El tallo es angular, pudiendo alcanzar alturas de 4.5 m., estos se hallan longitudinalmente asurcadas, con un diámetro interior menor a 3 mm., son pubescentes y tienen un color pardo claro o amarillo verdoso oscuro. Los tallos cortos (ramas) llevan brácteas foliáceas, éstas abrazan las braceolas que incluyen las flores pistiladas. Las bracteas son estipuladas y la lámina puede ser simple o trilobulada. Las hojas son plameadas y compuestas, teniendo de 5 a 7 folios que, cuando se mojan con agua y se extienden, aparecen lanceoladas lineales, con ápices acuminada y borde aserrado. Las hojas de las brácteas son ace-

rado-lanceoladas, pubescentes, encerrando cada una de ellas una o dos flores pistiladas o frutos más o menos desarrollados. El cáliz es de color verde olivo o pardo amarillento, pubescente y un poco doblado alrededor del ovario o del fruto. El ovario es unilocular y contiene un solo óvulo campilótropo, adheridos a él, se encuentran dos estilos flexibles y pubescentes. El fruto es de color verde claro o pardo amarillento, de forma elipsoidal ancha, un poco aplastada, hasta de 5 mm de longitud y finalmente arrugado o moteado. El olor es aromático muy marcado en la droga fresca.

CARACTERES MICROSCOPICOS: Se encuentran abundantes pelos cónicos, curvados, unicelulares, muchos de los cuales contienen cistolitos de Carbonato de Calcio en sus bases ensanchadas, (pelos cistolíticos); drusas de Oxalato de Calcio hasta de 5 a 30 micras de diámetro, masas resinosas y pelos de bracteas de tipo glandular, de unos 130 a 250 micras de longitud, cada uno de ellos con un tallo multicelular, largo y en forma de lengua y una cabeza globosa constituida por 8-16 células que contienen resina y aceite. (ver figura No. 1)



Herbario de Ecuador - Guayaquil - 1974
Provincia de Guayas
C. 1001 - 1001

Herbario de Ecuador

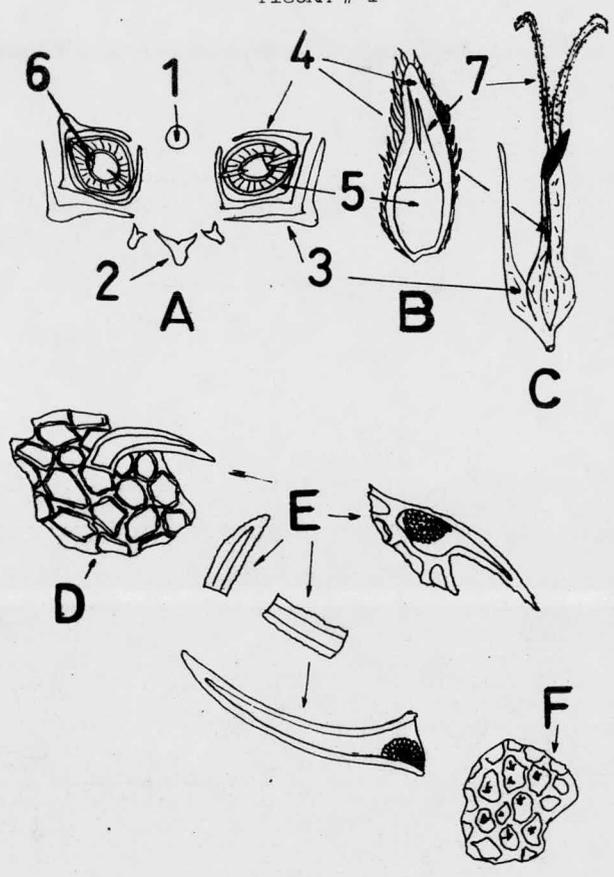
Herbario de Ecuador

Herbario de Ecuador

Herbario de Ecuador



FIGURA # 1



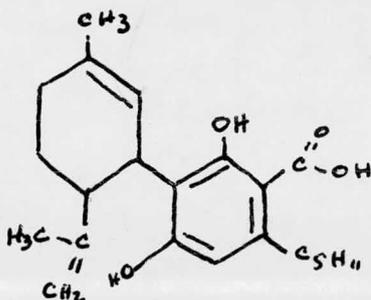
- A** ESQUEMA DE UNA RAMA DE LA PLANTA FEMENINA
- B y C** FLOR FEMENINA
- D** EPIDERMIS DE LA HOJA
- E** TRICOMAS CON CISTOLITOS
- F** PARENQUIMA CON DRUSAS
- 1** EJE FLORAL
- 2** BRÁCTEA
- 3** ESTÍPULA
- 4** BRACTEOLA
- 5** PERIGONIO
- 6** PARED DEL OVARIO
- 7** ESTIGMA

PRINCIPIOS ACTIVOS Y SUS PROPIEDADES FARMACOLOGICAS (3).

NOMBRE : Acido Cannabidiólico.

PROPIEDAD FARMACOLOGIA: Posee actividad sedante, antibacteriano y acelera el pulso.

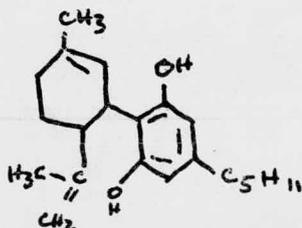
FORMULA :



NOMBRE : Cannabidiol.

PROPIEDAD FARMACOLOGICA: Carece de actividad psicométri--ca.

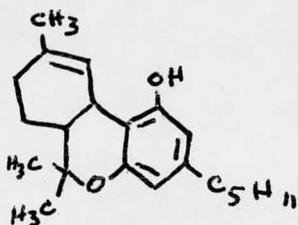
FORMULA :



NOMBRE : Delta 1 Trans-tetrahidrocannabinol.

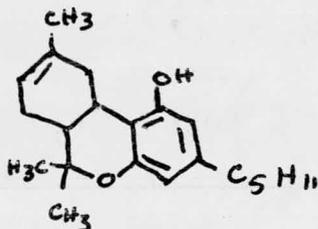
PROPIEDAD FARMACOLOGICA : Actividad euforígena, acelera el pulso y es el principal principio activo que produce los transtor-nos mentales, como son pérdida de la distancia, alucinaciones, - verborrea, ilusiones, delirio, etc... (9).

FORMULA :



NOMBRE : Delta 6 trans-tetrahidrocannabinol.

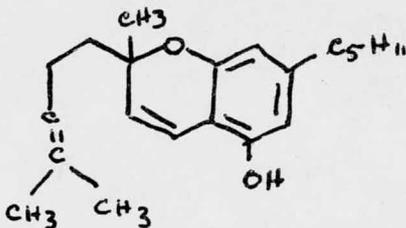
PROPIEDAD FARMACOLOGICA : Actividad euforígena, probable- mente acelera el pulso.



NOMBRE : Cannabicromeno .

PROPIEDAD FARMACOLOGICA : Poca o ninguna actividad euforígena .

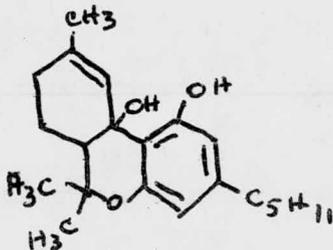
FORMULA :



NOMBRE : 11-OH- Tetrahydrocannabinol .

PROPIEDAD FARMACOLOGICA : No se ha reportado su actividad, pero es uno de los principios activos que mas se encuentran en las sustancias de excreción, como son orina y heces, se cree que se forma dentro del organismo, así como otras sustancias mas polares.

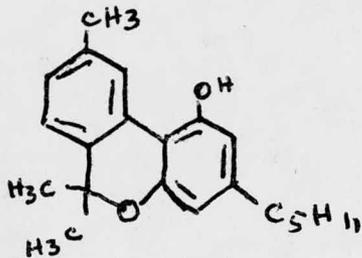
FORMULA :



NOMBRE : Cannabinol.

PROPIEDAD FARMACOLOGICA : Carece de actividad psicométrica.

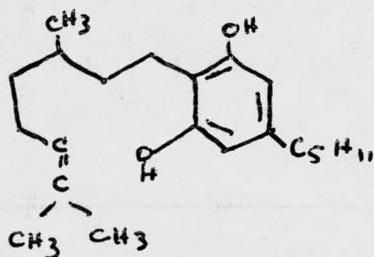
FORMULA :'



NOMBRE : Cannabigerol.

PROPIEDAD FARMACOLOGICA : Carece de actividad psicométrica.

FORMULA :



SINTOMAS Y SIGNOS DE INTOXICACION

AGUDA, CRONICA Y DE ABSTINENCIA.

ALUCINOGENOS Y PSICOMETRICOS (9)

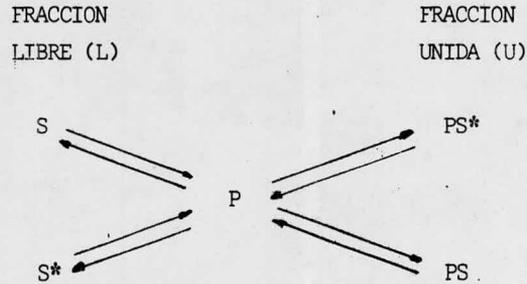
<u>I. Agudo</u>	<u>I. Crónico</u>	<u>Síndrome de Abstinencia.</u>
Agresividad	Recurrencias	No se ha reportado
Irritabilidad	Temblores	
Desorientación	Alteración en Memoria	
Alucinaciones	Desorientación	
Despersonalización	Sueño sobresaltado	
Delirio	Somnolencia	
Ilusiones	Apatía	
Ansiedad, pánico	Verborrea	
Euforia	Psicosis	
Medriasis		
Alteración coordinadoa de movimientos		
Hiperreflexia		
Hiperfagia		
Dolores musculares		
Taquicardia		
Taquisfigmia		
Sueño alterado		
Somnolencia		
Nausea		
Vómito		

GENERALIDADES DEL RADIOINMUNOANÁLISIS. (10-25) (37)

Desde su introducción hace más de una década (10)- el Radioinmunoanálisis (RIA) ha sido desarrollado considerablemente. Sus aplicaciones, que inicialmente fueron a la medición de solo - unas cuantas hormonas polipeptídicas naturalmente antigénicas, se - ha extendido a un número grande de sustancias de interés médico - y biológico, incluyendo hormonas, vitaminas, y drogas que no son - antigénicas por si solas.

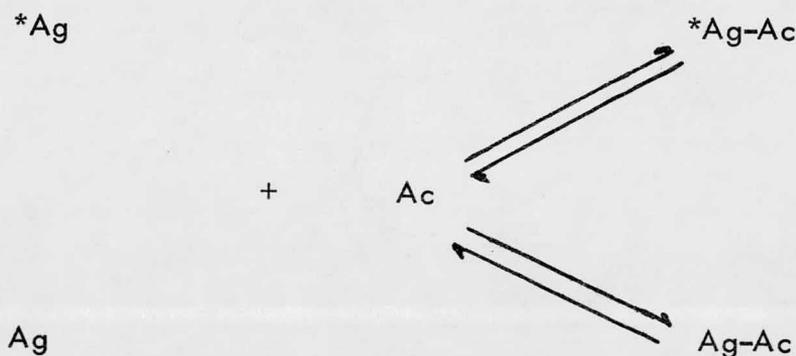
El RIA es una técnica de análisis fisicoquímico que - deriva del análisis por saturación establecido en 1960 por Ekins - (11). Aunque ambas técnicas utilizan hormonas marcadas con isó-- topos y una proteína que sirve de receptor a una hormona X (radio - activa y no radioactiva), el término radioinmunoanálisis o radioin-- munoensayo se emplea para técnicas que utilizan anticuerpos como - proteínas receptoras. El proceso está regido por la ley de acción - de masas y dependiendo de la naturaleza química del elemento - saturable, derivan además los procedimientos por competencia de - unión protéica (CPBA), los ensayos radioenzimáticos (REA) y los - análisis por radioreceptores (RRA), todos ellos tienen en común el - hecho de que emplean antígeno, o bien su equivalente (agente satu - rante) radioactivo, (ver cuadro No. 1).

Se han realizado muchas variaciones de la técnica - original, pero el principio que fundamenta el RIA (11-15), ha - permanecido igual y se basa en la reactividad entre un anticuerpo - (Ac), cuya concentración fija en el sistema in vitro, limita el nú - mero de sitios de acoplamiento por los cuales compiten fisicoquími - camente : el antígeno radiactivo (también a concentración limita - da y escasa masa) y el antígeno no radioactivo, que se agrega - en cantidades conocidas (estándares), o bien en cantidades variables en las muestra problemas. A medida que se incrementa la masa de



CUADRO # 1. El análisis por competencia de unión proteica (CPBA), se basa en que una proteína (P), que se sabe transporta por configuración complementaria a una hormona (S), forma con ésta un complejo (PS). Esto se usa experimentalmente para unir a la misma hormona o sustancia marcada isotópicamente (S*), formando también con ésta un complejo (PS*). Si la concentración de las sustancias (S y S*) excede a la capacidad de unión de la proteína, entonces S y S* competirán por los sitios de unión en forma proporcional a su concentración, quedando una fracción unida (U) y otra libre (L).

antígeno no radiactivo en el sistema, disminuye la posibilidad de que el antígeno radiactivo se acople al anticuerpo, lo que se manifiesta por una menor radioactividad medible en la fracción del anticuerpo, que es proporcional a la concentración de antígeno no radiactivo (fig. #2). Esto se expresa en la reacción de competencia :



En donde, *Ag = antígeno radiactivo (hormona o sustancia marcada isotópicamente); Ag = antígeno no radiactivo o "frío" (hormona usada como estándar o problema a medir); Ac = anticuerpo receptor; *Ag-Ac y Ag-Ac = complejos antígeno-anticuerpo radiactivo y no radiactivo respectivamente. En ella, deben hacerse notar los siguientes aspectos :

- A. El antígeno en concentraciones desconocidas puede ser determinado tomando en cuenta la observación de que las moléculas de antígenos radioactivos o marcados (*Ag), compiten fisicoquímicamente con las moléculas de antígeno no marcado (Ag), es decir, con los estándares o con los problemas, por los sitios limitados de unión que ofrecen los anticuerpos (Ac) en el sistema.

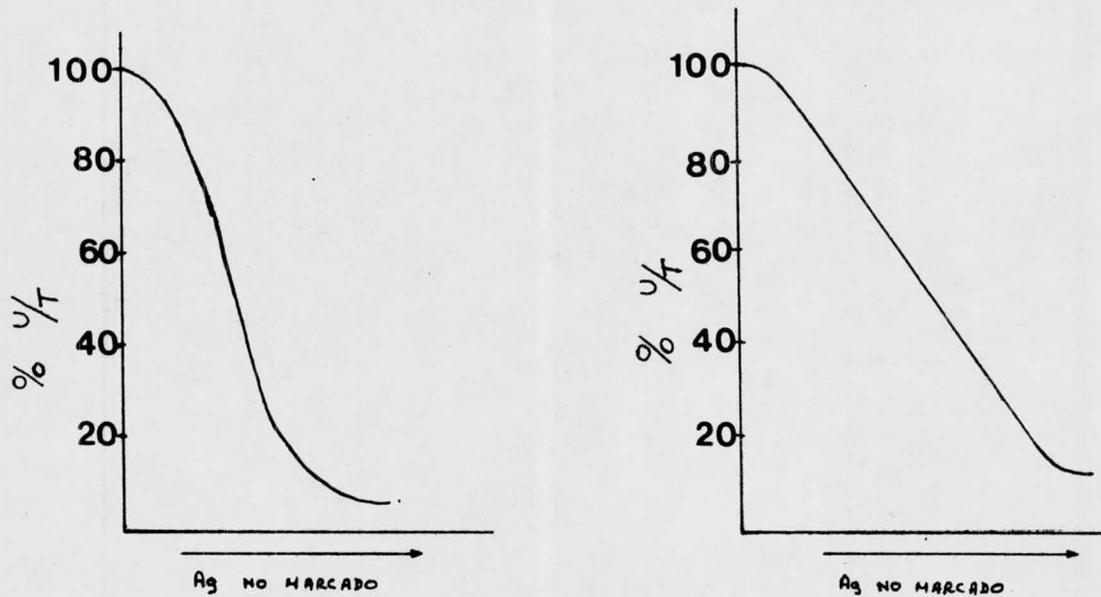


FIGURA # 2. Representación esquemática del desplazamiento porcentual de la radioactividad unida al antígeno, al agregar dosis crecientes del antígeno no maracdo. La primera curva de desplazamiento corresponde a una gráfica en papel milimétrico. La segunda es en papel semilogarítmico.

- B. Además, el ensayo requiere que el comportamiento - entre el estándar y el antígeno en concentración - desconocida o problema, sea semejante; es decir, - que ambas sean igualmente capaces en su capacidad para desplazar a las antígenas marcadas de los complejos antígeno-anticuerpo marcado y no un comportamiento idéntico entre el antígeno marcado y el estándar o desconocido.
- C. Los reactantes *Ag y Ac se agregan en cantidad - fija. El Ag no marcado, se agrega en concentración conocida (estándar) o en cantidad variable dependiendo del volumen o "alícuota" del problema utilizado para su medición. La reacción debe proceder en - condiciones ópticas para que la unión sea estable. - Aunque ésta puede efectuarse rápidamente a temperatura ambiente, o bien, a 37° C, muchas veces se - prefiere realizarlo a baja temperatura (4° C), por - periodo mas prolongado, a fin de obtener una mejor afinidad y estabilidad de la reacción.
- D. La solución de anticuerpo o antisuero, está diluida - de tal forma que permita unir un 50% de ésta *Ag - en ausencia del Ag no marcado.
- E. Después de la incubación de los tres componentes - (*Ag, Ag y Ac), es indispensable separar las fracciones Ag-Ac y *Ag-Ac de Ag y *Ag, para medir - así, la radioactividad de la fracción unida (U) al - Ac, o bien aquella en forma libre (L), o ambas. - En esta forma, se elabora posteriormente una curva - dosis respuesta con los resultados obtenidos a partir - de estándares. La separación de la fracción unida - al Ac (Ag-Ac + *Ag-Ac), de la unida (Ag + *Ag), - es crítica y de fundamental importancia.

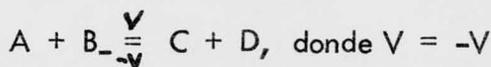
Esta se logra mediante varios procedimientos que se mencionarán más adelante.

- F. La proporción resultante de la radioactividad unida - entre la radioactividad total (U/T), que presentara - dentro de cierto intervalo una relación "dosis res- - puesta" respecto a la concentración de antígeno es - tándar, permite graficar e interpolar a éstas las pro- - porciones U/T observadas en los problemas y calcu- - lan así la concentración del antígeno o sustancia a - determinar como se verá más adelante.

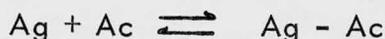
BASES CINÉTICAS DEL RIA

Puesto que toda la cinética de las reacciones en el RIA está regida por la primera ley de acción de masas, es conveniente recordar los fundamentos de ésta.

La ley de Acción de Masas se refiere a los esfuer- - zos aplicados a equilibrios mediante cambios en masa o cantidades- - reactantes. Dichas masas se expresan en términos de concentración- - molar, es decir, en moles por litro de las reactantes en solución. - El equilibrio consiste en una situación en la cual dos reacciones, - opuestas entre sí, ocurren simultáneamente y cuyas velocidades, - opuestas, son de igual valor (11).



La ley de acción de masas establece que las veloci- - dades de reacción son proporcionales a los productos de las concen- - traciones activas de los reactantes, elevadas a una potencia igual - a su coeficiente en la ecuación balanceada de la reacción (11, - 12). Así para la reacción general antígeno-anticuerpo en el equilibrio (suponiendo que la reacción es mol a mol), se tienen las siguien- - tes expresiones.



La velocidad hacia la derecha :

$$R_1 \propto [\text{Ag}] [\text{Ac}]$$

y la velocidad hacia la izquierda :

$$R_2 \propto [\text{Ag} - \text{Ac}]$$

en donde los paréntesis significan la actividad de los reactantes, que por ser casi igual a la concentración en moles-gramo por litro, se tomará como la concentración y el símbolo \propto significa proporcionalidad.

Para convertir estas proporciones en ecuaciones, se introducen las constantes de velocidad K_1 y K_2 . Estas constantes representan los efectos de la naturaleza de los reactantes, de los catalizadores, la temperatura y todos los otros factores, con excepción de las concentraciones, que afectan a las velocidades de reacción. En estas condiciones :

$$R_1 = K_1 [\text{Ag}] [\text{Ac}]$$

$$R_2 = K_2 [\text{Ag} - \text{Ac}]$$

Puesto que en el equilibrio R_1 y R_2 son iguales y dos cantidades iguales a una tercera son iguales entre sí, se puede expresar como sigue :

$$K_1 [\text{Ag}] [\text{Ac}] = K_2 [\text{Ag} - \text{Ac}]$$

Pasando todas las constantes de un lado de la igualdad y todas las variables del otro, tenemos :

$$K_1/K_2 = [Ag-Ac] / [Ag] [Ac]$$

Ya que la relación entre dos constantes es a su vez otra constante, la relación K_1 / K_2 se sustituye por K_e , resultando que :

$$K_e = [Ag-Ac] / [Ag] [Ac] \quad (\text{Ec. \#2})$$

Esta es la forma general de la constante de equilibrio en el caso de una reacción inmunológica antígeno-anticuerpo, la cual fundamenta y proporciona las bases de la cinética en los procedimientos del RIA.

Una vez que la reacción (ec. #1) haya alcanzado el equilibrio, podemos definir a la constante de equilibrio (Ec. #2) de la siguiente forma :

$$K_e [Ag] [Ac] = [Ag-Ac]$$

La relación del antígeno unido (U) y el antígeno libre (L) en el equilibrio es :

$$U/L = [Ag-Ac] / [Ag] \quad (\text{Ec. \# 3})$$

En este caso se supone que las constantes de equilibrio para los antígenos marcados, así como para los estándares y problemas son iguales (11, 13).

Bajo las condiciones del RIA, los componentes Ag y Ac están relacionados a la constante de equilibrio observando que:

$$[Ag] = [Agi - Ag-Ac] \quad (\text{Ec. \# 4})$$

en donde Agi es la concentración inicial del antígeno,

$$y : [Ac] = [Aci - (Ag-Ac)] \quad (\text{Ec. \# 5})$$

en donde Aci es la concentración inicial del anticuerpo. Entonces, la relación entre el antígeno unido y el libre es :

$$U/L = [Ag-Ac] / [Agi - (Ag-Ac)]$$

que puede arreglarse de la siguiente forma :

$$U/L [Agi - (Ag-Ac)] = [Ag-Ac]$$

$$\delta : [Ag - Ac] = [Agi] U/L / (U/L + 1) \quad (\text{Ec. \# 6})$$

combinando las ecuaciones 2, 4, 5 y 6 resulta :

$$\begin{aligned} Ke \left([Agi] - \frac{[Agi] U/L}{(U/L + 1)} \right) \left([Aci] - \frac{[Agi] U/L}{(U/L + 1)} \right) - \\ = \frac{[Agi] U/L}{(U/L + 1)} \end{aligned}$$

que arreglandose nos dará :

$$(U/L)^2 + U/L [1 + Ke Agi - Ke Aci] - Ke Aci = 0$$

Esto representa la ecuación de una hipérbola, como se muestra en la Fig. # 3 La relación entre U/L y la concentración del antígeno se describe por medio de la curva PQR que se aproxima en su extremo superior, a la asíntota STU, cuya pendiente es $-K_e$. Un cambio en la relación U/L es proporcional a un cambio en la concentración del antígeno unido, siendo la constante de proporcionalidad $-K$. La relación del anticuerpo unido (U) al antígeno marcado (L) disminuye a medida que la concentración del antígeno no marcado aumenta. Por lo tanto, los cambios en la relación U/L son mayores cuando la concentración del antígeno es pequeña comparada con la concentración del anticuerpo. En el punto Q, $U/L = K_e [Aci]$ y en el punto T, $U/L = (K_e Aci - 1)$ ver (Fig. # 3).

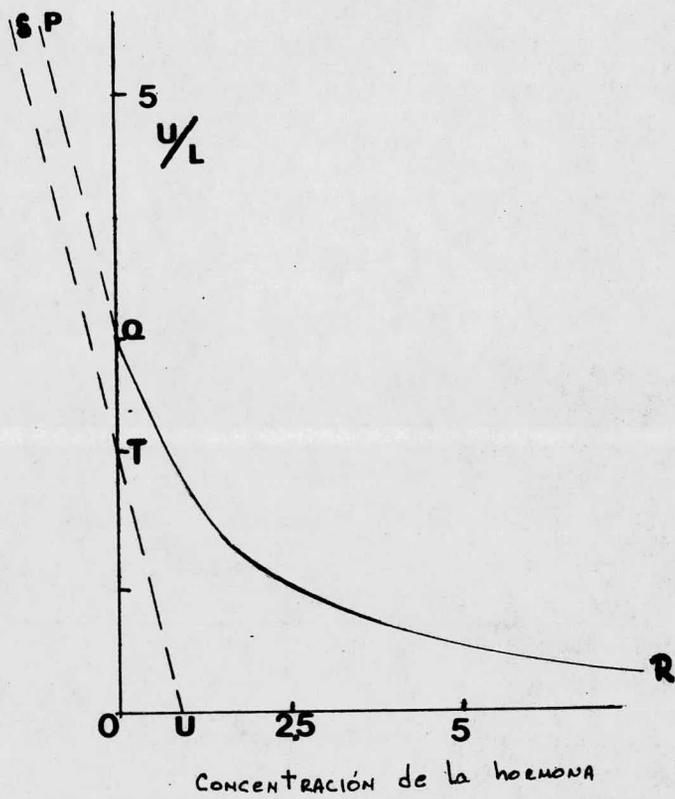


FIGURA # 3. Relación entre U/L y la concentración de la hormona.

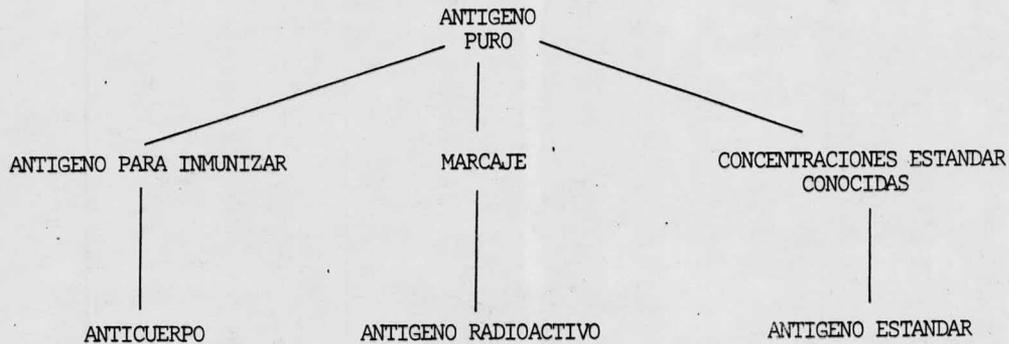
ASPECTOS TECNICOS DEL RADIOINMUNOANALISIS.

Los procedimientos del RIA requieren de la obtención, purificación y radiomarcaje del antígeno que se pretende medir; de la inducción de anticuerpos específicos y con afinidad por dicho antígeno y de una técnica adecuada para la separación del antígeno libre del unido. (Cuadro # 2).

ASPECTO INMUNOLOGICO DE RIA

EL ANTICUERPO : Los anticuerpos son proteínas séricas del tipo de las gamma globulinas o inmunoglobulinas (Ig) de peso molecular elevado mas de 200,000. La mayoría de estas inmunoglobulinas pertenecen a la clase IgG, pero todas ellas (IgA, IgM, IgD, e IgE), tienen la misma estructura básica (14); compuesta por dos tipos de cadenas polipeptídicas llamadas cadenas ligeras (L) y las cadenas pesadas (H). Estas cadenas están unidas por puentes disulfuro covalentes y por enlaces no covalentes de varias clases, de tal modo que forman unidades básicas de cuatro cadenas como se muestra en la figura # 4. Mediante el empleo de la papaina, enzima proteolítica que rompe a la IgG en presencia de cisteina (agente reductor), se ha demostrado la presencia de tres fragmentos, dos de ellos designados Fab y el otro Fc (fig. # 5), siendo el Fab el fragmento que contiene los sitios de unión del anticuerpo, mientras que el fragmento cristalino Fc es necesario para permitir la activación y fijación del complemento (15, 16).

En todos los animales superiores que se han estudiado (vertebrados) hasta la fecha, los sistemas de inmunoglobulinas y del complemento constituyen los mecanismos humorales de resistencia inmunológica más importante (17). El sistema de complemento consiste en un grupo de globulinas séricas del cual actualmente se conocen 11 proteínas. Los componentes del sistema del complemento se han designado C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉.



CUADRO # 2. REQUISITOS PARA EL DESARROLLO DEL RIA.

Se señalan las tres condiciones o elementos que deben reunirse para desarrollar e implementar un procedimiento de RIA. Obsérvese como todo tiene como punto de partida el disponer de un antígeno puro.

El componente C_1 es un complejo de tres proteínas (C_{1a} , C_{1r} y C_{1s}) unidas por un ión Ca^{++} . Algunos sistemas del complemento son termolábiles; por ejemplo, C_1 , C_2 , C_5 , C_8 y C_9 , que se inactivan al calentar el suero a $56^\circ C$ por 30 minutos. (16). El complemento puede activarse y unirse por medio de anticuerpos IgM e IgG unidas a un antígeno específico. La unión del complemento (C) se lleva a cabo por una secuencia de reacciones enzimáticas que ocurren en un orden específico a $37^\circ C$ y que requiere la presencia de iones Ca^{++} y Mg^{++} .

Aunque el título o concentración del anticuerpo es importante, el principal criterio para establecer si un antisuero es adecuado, es la energía de interacción que exista entre el antígeno y el anticuerpo, así como la afinidad y especificidad que presenta éste por el antígeno (18).

El método general para la inducción de anticuerpos, llamado inmunización, se efectúa inyectando a un grupo de animales de determinada especie, el antígeno (sustancia que debe ser pura, en este caso es el extracto purificado de Δ^9 THC) provenientes de una especie diferente, llamado antígeno heterólogo. Las especies animales generalmente utilizadas por su facilidad de manejo incluye a los cuyos, conejos, carneros, pollos y monos. Las técnicas de inmunización, varían de acuerdo con las rutas de administración del antígeno (intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intradérmica o directamente en los nódulos linfáticos), así como la dosis y la frecuencia de su administración. (18, 19, 20).

Debe recordarse que las moléculas que son demasiado pequeñas, como es en este caso, para inducir la formación de anticuerpos, son tratadas como haptenos, es decir, son unidas o acopladas a moléculas acarreadoras como proteínas o polipéptidos sintéticos, antes de ser inyectadas. (20, 21).

En la primera inmunización debe usarse una preparación de antígeno de gran calidad. Las siguientes inmunizaciones

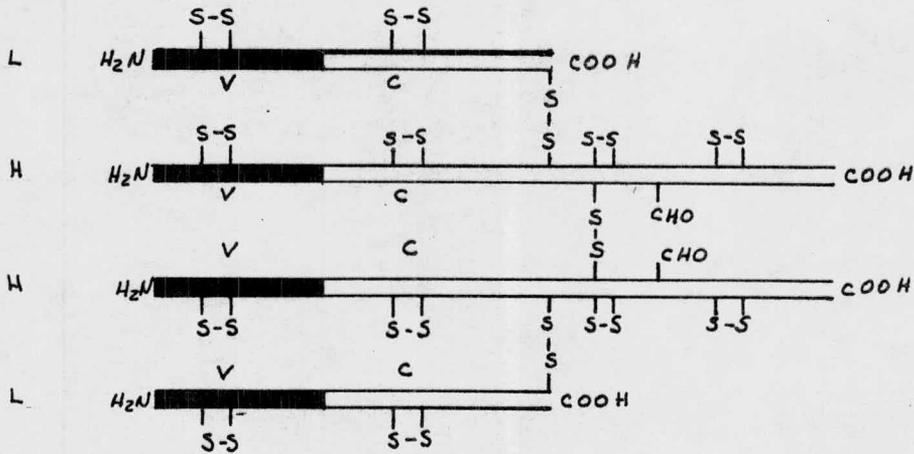
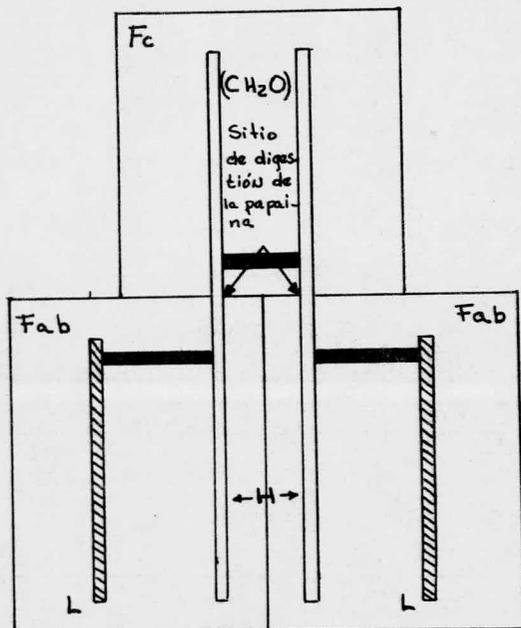


FIGURA # 4. ESTRUCTURA ESQUEMATICA DE LA IgG

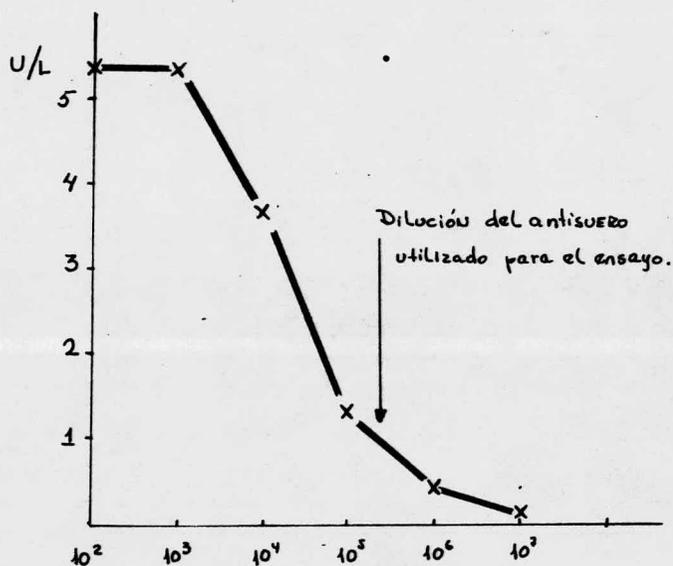
L = cadenas ligeras; H = cadenas pesadas; CHO = unidades de carbohidratos.
 Las porciones variables y constantes de la cadenas, con respecto a la secuencia de amino-ácidos, están indicadas por las letras V y C, respectivamente. No se sabe si V es de la misma longitud en las cadenas H y L.



■ Puente disulfuro

(CH_2O) Carbohidratos

FIGURA # 5. Modelo de R. R. Porter (1962) para la molécula de IgG.



Recíproco de la dilución
del antisuero.

FIGURA # 6. Curva producida con varias diluciones de un antisuero para buscar un título adecuado.

debe usarse una preparación de antígeno de gran calidad. Las siguientes inmunizaciones pueden hacerse con antígeno menos puro, - en un período o varios no muy cortos de tiempo, tomando muestras de sangre para titular. El tiempo total de inmunización será variable según el título obtenido. (19).

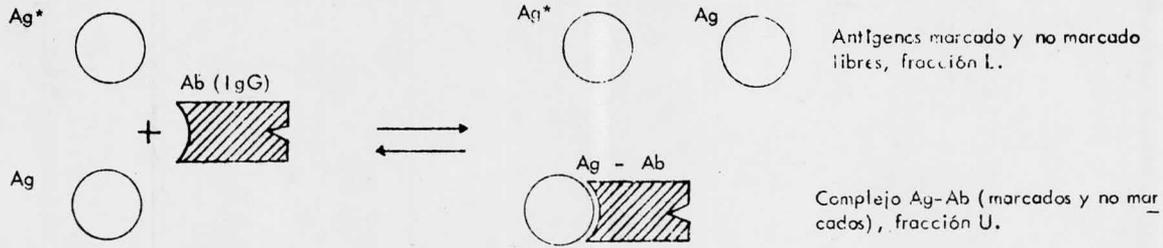
La concentración óptima o título del antisuero se de termina por un ensayo específico como el que se ilustra en la figu ra # 6. En este caso se mide la unión del antígeno al anticuerpo en varias diluciones. La dilución donde aproximadamente la mitad del antígeno marcado sea unido por el anticuerpo ($U/L = 1$) es la mas apropiada.

SEPARACION DEL ANTIGENO MARCADO LIBRE Y- UNIDO : Otro requisito para el desarrollo y estandarización de - un procedimiento de RIA, es disponer de un método adecuado para - la rápida y completa separación del antígeno marcado unido al - anticuerpo, de aquel que se encuentra libre (22), de tal forma que la radioactividad de una o ambas fases pueda ser correctamente - medida.

Existen diversos métodos de separación que se encuen tran esquematizados en la fig. # 7. De todos éstos, los que se - han impuesto en el uso, dada su practicidad, son la utilización - de antiglobulinas gamma de conejo, obtenida generalmente en ove - jas, cuando se trata de partículas de peso molecular mayor de - 5,000 y el empleo de carbón cubierto de dextranas para adsorber - estructuras con pesos moleculares habitualmente menores a los 5,000 (25).

No existe ningún método de separación que sea - superior a los demas. Sin embargo, deben considerarse las cualida des generales para los sistemas de separación y elegir un sistema - adecuado valorando los siguientes factores (23) :

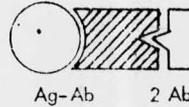
Fig. No. 7. Métodos de uso común para separar complejos antígeno-anticuerpo de antígeno libre.



La separación de la fracción libre L y la unida U, se realiza mediante diferentes métodos, los más empleados son:

METODO DEL DOBLE ANTICUERPO

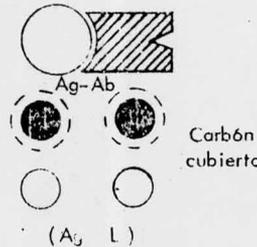
Se añade al sistema un segundo anticuerpo dirigido contra el primero, es decir, un anti-IgG.



Los complejos Ag-Ab o fracción unida U, son precipitados. La fracción L se localiza en el sobrenadante.

METODO DE ABSORCIÓN A MATERIAL INSOLUBLE

Los materiales más comunes son: carbón, talco, gel de sílice, florisil y algunas resinas. Estos son generalmente cubiertos con alguna proteína o un polisacárido, para disminuir su afinidad por los complejos Ag-Ab.



La fracción libre o L se precipita. La fracción U se localiza en el sobrenadante.

1. La separación completa de las fracciones libres y unidas.
2. El volumen de incubación que pueda ser manejado.
3. El efecto de las variaciones en la concentración de proteínas. (22)
4. El comportamiento del antígeno radioactivo dañado.
5. El efecto de factores no específicos presentes en los diferentes fluidos biológicos que contienen la sustancia por medir.
6. La rapidez de la separación.
7. El tiempo y facilidad de operación.
8. El costo de los materiales utilizados.

ESTANDARIZACION Y CONTROL DE CALIDAD -

DEL RIA : La estandarización del RIA es un gran problema para el caso de hormonas que no pueden obtenerse en forma pura. Aún cuando se tienen estándares puros, la validez de la especificidad y exactitud del ensayo en varias muestras, puede ser difícil.

Existen cinco criterios principales que se utilizan para valorar la seguridad de los procedimientos del RIA. Estos son : Precisión, sensibilidad, especificidad, exactitud y reproducibilidad. (24).

LA PRECISION : En este método, se define como -

la capacidad del sistema de ensayo para distinguir entre dos concentraciones de antígeno en cualquier posición de la curva de inhibición. La precisión del ensayo se valora cuantitativamente, por medio del coeficiente de variación (23), definido por la fórmula: $CV = S/\bar{X}$, donde S es la desviación estándar y \bar{X} es el promedio de las mediciones.

LA SENSIBILIDAD : En éste método, se define como la cantidad más pequeña de antígeno no marcado que puede ser detectado. La sensibilidad máxima depende de la afinidad del anticuerpo y se obtiene cuando la concentración del *Ag es insignificante y la concentración del Ag se aproxima a cero. La concentración del Ac en el ensayo o dilución final utilizada, está definida como el título (19), de éste, así como de la actividad específica del antígeno marcado, depende en forma directamente proporcional la sensibilidad del ensayo.

Una de las grandes ventajas del RIA sobre otros procedimientos cuantitativos, es la alta sensibilidad que resulta de la naturaleza de la interacción Ag-Ac, la cual hace posible medir concentraciones de antígeno tan pequeñas como micro, nano- y picogramos.

LA ESPECIFICIDAD : Es el grado de interferencia creado por otras sustancias que sean diferentes a las que se quiere medir. La especificidad del Ac por el Ag está influenciada por: Heterogeneidad de anticuerpos específicos, reactividad cruzada con antígenos similares o moléculas que puedan ocupar los sitios inmu--noreactivos y la interferencia de la reacción debida al bajo peso molecular del material que altera el medio o las condiciones de la reacción, (19, 22).

LA EXACTITUD : Se refiere al grado en el cual - la medición de una sustancia coincide con el valor de la medición estándar de dicha sustancia. Un método para evaluar la exactitud relativa, consiste en comparar los resultados obtenidos en un número diferente de ensayos semejantes. (23).

LA REPRODUCIBILIDAD : Puede definirse como la - repetición de los resultados dentro de los parámetros establecidos, - tanto entre ensayos, como durante un mismo ensayo. Un método - para limitar los resultados a parámetros establecidos es minimizar - las variables utilizables en el ensayo.

Esto incluye todos los lotes de reactivos que se - usan en el ensayo. También se deben reducir al mínimo las dife-- rencias en las variaciones técnicas de cada personas que pueda rea-- lizar un RIA (24).

Los parámetros más útiles es el control de calidad - son :

- a) El porcentaje total de *Ag unido en ausencia de - Ag y en ausencia de antisuero específico, es decir, el % de unión inespecífica.
- b) La pendiente de la curva estándar a una concen-- tración cero del antígeno y el 50 % del punto - de inhibición.
- c) La dosis de estándar en el 50% del punto de - inhibición.
- d) La variación intraensayo_x que es la variación - observada en determinaciones múltiples de mues-- tras "corridas" en el mismo ensayo.

- e) La variación interensayo, que es la variación de -
determinaciones múltiples de la misma muestra en -
diferentes ensayos.

Es esencial el desarrollo de un sistema de control de -
calidad para poder evaluar la estabilidad y reproducibilidad de un -
RIA.

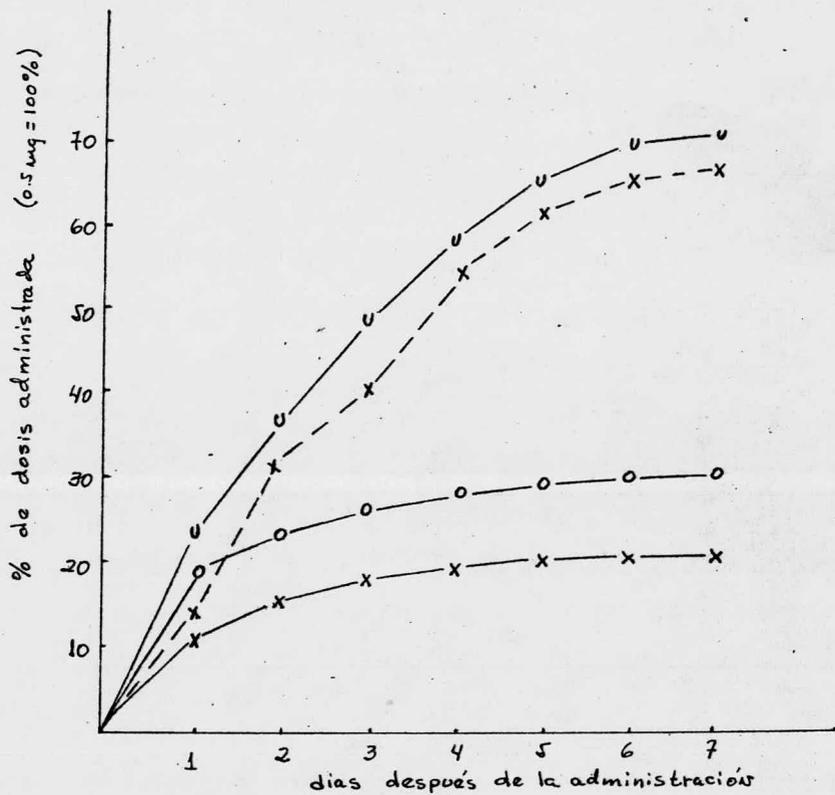
TRABAJOS REALIZADOS

BIOTRANSFORMACION Y ELIMINACION DE

Δ^9 THC. (26-30) : Los estudios realizados acerca de ésto, nos dicen que las vías de eliminación son la orina, principalmente y las heces, teniendo una transformación en el organismo, que pasa de Δ^9 THC a 11-OH-THC, esta biotransformación es poco cuantitativa pero debe tomarse en consideración, otra transformación es el paso de Δ^{11} THC a Cannabinol, de la cual no hablaremos. La vida media de los metabolitos es de 56 horas, para el caso de Δ^9 THC en plasma, es importante hacer notar que en la primera hora después de aplicada la dosis, declina considerablemente la cantidad de dicho metabolito, pero la desaparición a partir de ese momento es muy lenta. Se puede explicar este rápido decremento por una redistribución del metabolito por los compartimientos intravasculares en los tejidos, incluso el cerebro, y por el metabolismo intrínseco del individuo; otra explicación es que se forman rápidamente los metabolitos mas polares, durante el decremento rápido del Δ^9 THC, ya que dichos metabolitos aumentan su concentración al disminuir la de Δ^9 THC. En el hombre los efectos de la marihuana se presentan a los 15 minutos y empieza a declinar a los 30 minutos, desapareciendo totalmente a las tres horas, después de la ingestión. Las rutas metabólicas que siguen las dos vías de salida; para la orina, se puede decir que es directa ya que pasa de plasma a conductos renales, sin ninguna transformación aparente; para el caso de las heces, es diferente el mecanismo de eliminación ya que tiene que pasar primero por hígado, pasar a los conductos biliares y entrar al aparato digestivo a nivel de duodeno, para que posteriormente pase a las heces, es lógico pensar que el primer día no se encuentren los metabolitos en esta ruta, ya que tarda mas tiempo este metabolismo. (36) Las cantidades de Δ^9 THC en orina son mayores que en heces (28), no así para el caso de 11-OH-THC que es todo lo contrario. Los datos experimentales nos dan esa evidencia, pero no se ha logrado esclarecer el mecanismo que sigue el Δ^9 THC para pasar a 11-OH-THC y los demás metabolitos mas polares. La eliminación de los metabolitos es de

un 67 % para personas no fumadoras y 71% para personas que -
tienen el hábito de fumarla. (26) (Ver figura # 8).

FIGURA # 8



- X-X Orina de sujetos no fumadores
- O-O Orina de sujetos si fumadores
- X--X Orina y heces de sujetos no fumadores
- U-U Orina y heces de sujetos si fumadores

OBTENCION DEL A_c ANTI Δ^9 THC, PARA USO - EN RADIOINMUNOENSAYO. (31-35).

Después de haber explicado de una forma general - como y que es un anticuerpo, procederemos a explicar como los di-
ferentes autores han podido obtenerlo, bajo que condiciones y que-
resultados han obtenido.

Basándose en el artículo # 31 y complementando - con los otros mencionados con antelación se describe esta obten- -
ción así: 70 mg de Δ^9 THC y 172 mg de anhídrido succínico -
se disuelve en 5 ml de piridina. $20 \mu\text{Ci}$ ($10 \mu\text{g}$) de ^3H -THC -
se añaden con el objeto de conocer el grado de incorporación del-
THC dentro del conjugado. La mezcla es calentada a reflujo en -
obscuridad durante 4 horas. Se remueve la piridina por vacío a -
 45°C y el residuo se disuelve en cloroformo, se lava varias veces
con agua destilada y se seca con sulfato de sodio anhidro. El clo-
roformo es removido con vacío a 35°C y el residuo se disuelve -
en N-N Dimetil-formamida (5 ml).

Se añaden 100 ml de agua destilada con amortigua-
dor de fosfatos pH 5.5, conteniendo ésta, 250 mg de Albúmina de
suero de borrego (ASB). 120 mg de Etil CDI (Clorhidrato de 1 -
etil (3, 3 dimetil amino propil) Carbodiimida) (Edil CDI), se agre-
gan inmediatamente a la mezcla que se agita constantemente a tem-
peratura ambiente. Después de 30 minutos se agregan 40 mg más -
de etil CDI y se deja la solución en agitación toda la noche a -
temperatura ambiente. La mezcla de reactivos se extrae 3 veces -
con 100 ml de eter (para remover cualquier THC no conjugado) y -
el remanente acuoso se dializa con agua destilada por tres días a -
 4°C , para remover otras pequeñas moléculas que interfieren en la
inmunización. La solución dializada contiene Δ^9 THC-ASB conju-
gada que se liofiliza. La cantidad de las marcas presentes de -
 ^3H -THC en el conjugado es, en promedio, de 25 THC por cada -
molécula de Albúmina de suero de borrego. (32)

PROCESO DE INMUNIZACION : Para obtener el Ac se inmunizaron 6 borregos con diferentes conjugadores de THC-ASB; 5 mg de Δ^9 THC-ASB fueron disueltos con 2 ml de agua destilada y filtrada libre de pirógenos, se emulsificó con 4 ml de adyuvante de Freund, que es una mezcla de aceite mineral, ceras y bacilos de Mycobacterium tuberculosis muertos, que aumentan y prolongan la respuesta antígenica. La mezcla se inyectó en 6 lugares del muslo de los borregos. Se le pusieron tres refuerzos de 2.5 mg del conjugado a intervalos de un mes cada uno y se sanó de 7 a 10 días después de la última inyección. Un borrego produjo antisuero capaz de captar ^3H -THC y este material fue el utilizado para el RIA posteriormente, la dilución utilizada fué de 1/12. Los niveles de radioactividad usados en el proceso son de ^3H -THC ($2 \mu\text{c}/\mu\text{g}$), para fijar la capacidad de unión del antisuero. Un ng de THC marcado es incubado por una hora en una mezcla conteniendo una dilución de antisuero de 1/12. El amortiguador eluyente es preparado con 0.4 M de fosfato. pH 7.4, conteniendo 0.15 M de cloruro de sodio y 0.2% de gammaglobulina de borrego. La separación de la fracción libre de la unida, se efectúa con 5% de Carbón activado con dextranas (UCC). Alicuotas del sobrenadante contienen anticuerpos marcados y son detectados por medio de un contador de centelleo líquido. (ver tabla # 1).

La tabla # 2 muestra el incremento del grado de enlace de ^3H -THC marcado, hechas con la solución 1/12 después de los sucesivos refuerzos de inmunización. Los resultados se expresan en porciento de marcas presentes en la fracción del anticuerpo unido (% unido). El decremento en las marcas, es producido por el incremento de las Δ^9 THC no marcados. La figura # 9 nos muestra la curva de calibración obtenida con la solución de antisuero 1/12. La menor cantidad de THC no marcado que produce una inhibición de captación de ^3H -THC es de 2 ng. Con la mayor marca de actividad específica, puede ser posible la detección del límite más bajo de apreciación. Tal marca puede ser utilizada

en el sistema de incubación, conteniendo menor cantidad de anti--
suero y puede constituir la base para un ensayo inmunológico para-
THC, con igual o mayor sensibilidad que algunos métodos físico-quí-
mico que todavía están en uso.

TABLA # 1

PROTOCOLO PARA EL ENSAYO

	100 %	CERO	PROBLEMA.
AMORTIGUADOR ELUYENTE	0.5	0.4	0.4
SUERO NORMAL (1/2)	---	0.1	---
ANTISUERO (1/2)	---	---	0.1
³ H-THC (1 ng)	0.1	0.1	0.1
UCC (5 %)	---	0.2	0.2

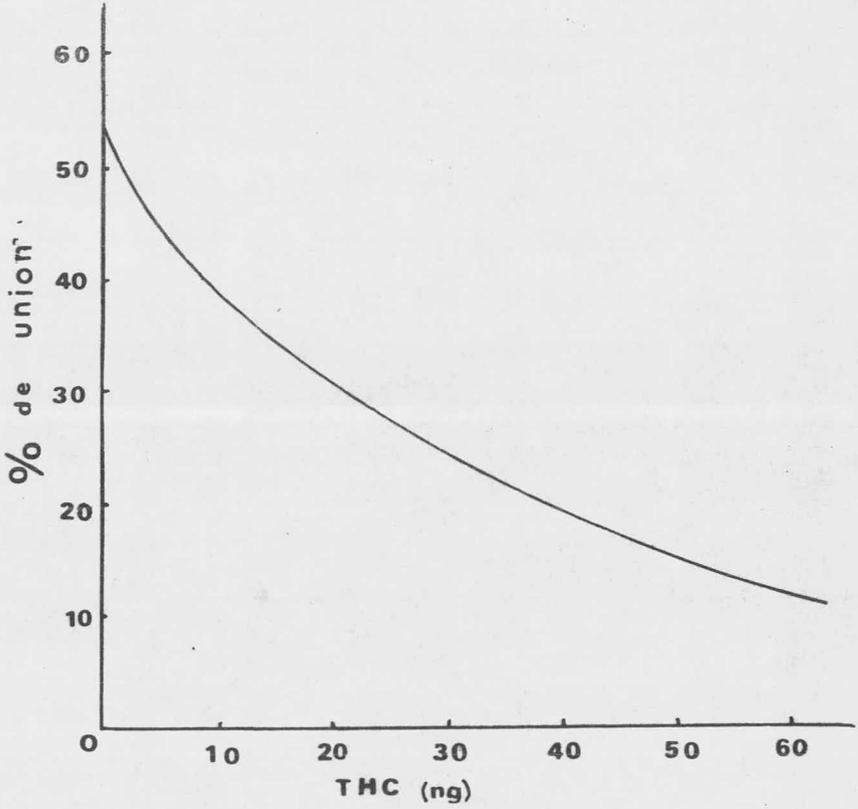
Los valores indican volumen en ml. El suero es diluido con amortiguador eluyente. ³H-THC es almacenado en dioxano y una alícuota de amortiguador antes de usarse. El tiempo de incubación es de una hora a 4° C. EL UCC es 5% de carbón activado con dextranas en solución salina con amortiguador de fosfatos.

TABLA # 2

INCREMENTO DEL GRADO DE UNION DE ³H-THC MARCADO, -
DESPUES DE LOS SUCESIVOS REFUERZOS DE INMUNIZACION.

REFUERZO	% DE UNION
1er	15.2
2o.	21.0
3er	51.5

FIGURA # 9



RADIOMARCAJE DEL ANTIGENO (41, 42).

De este método se pudieron obtener solo pocos datos, ya que el reporte original de la técnica está en el "Svensk - Farm. Tidskr. 72, 662 (1968)". escrito originalmente en sueco, los recursos que se tienen no son suficientes para obtener esta información. La técnica que a continuación se escribe es del mismo autor de la cita mencionada :

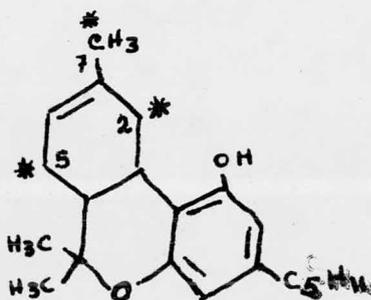
De los diferentes cannabinoles presentes en la resina solo el Δ^9 THC y Δ^8 THC son aparentemente psicoactivos. Puesto que el isómero delta 9 es el componente predominante en el Haschisch, sus propiedades psicotomimétricas pueden atribuirse en gran parte al Δ^9 THC.

Materiales marcados : Se preparó un extracto purificado que consistía de aproximadamente : 70% de cannabinoles que contenían THC (71%); cannabidiol (24%) y cannabinol (5%) , por cromatografía fraccionada con alúmina.

Los cannabinoles se marcaron calentando 150 mg de éstos, 0.5 ml de ácido fosfórico al 100%, 2.5 ml de tetrahydrofurano y 0.25 ml de agua tritiada (50 mC) a 80° C durante dos horas en atmósfera de Nitrógeno, la mezcla de reacción se disolvió en éter (25 ml), se lavó una vez con un volumen igual de una solución saturada de NaHCO₃ y 2 veces con un volumen igual de agua, después de secar con sulfato de sodio anhidro. El éter se extrajo por vacío. Los hidrógenos intercambiables se quitaron disolviendo el residuo en 2 ml de metanol y evaporándolo bajo una corriente de nitrógeno, esto se repitió por dos veces más. Se obtuvieron preparados conteniendo THC (84%), cannabidiol (11%) y cannabinol (5%) con actividad específica de 1.2 - 3.5 μ C/mg. Con

Δ^9 THC puro y agua tritiada de alta actividad específica - 5 C/ml, se obtuvo 97% de delta 9 THC tritiado con actividad específica de 41 μ C/mg.

La radioactividad fué determinada por un contador de centello líquido, marca Pachard Tri-Carb modelo 3375; de solución acuosa en solvente XDC. Los átomos marcados fueron encontrados en las posiciones 2, 5, 7 del anillo. (29)



DETECCION DE PRODUCTOS DE Cannabis sativa en orina por RIA. (33, 38, 39, 40).

En este caso se hará como en los casos anteriores, - se tratará un artículo y se completará con las demás referencias, - éste es el 38.

Introducción : El análisis de orina para drogas de - abuso es común en muchos laboratorios, el mayor énfasis en la - U.K., está dado para narcóticos como anfetaminas, barbituratos, - etc... De vez en cuando se estudiaron también otras drogas como - la metacualona. La cromatografía en placa constituye la base metodológica de la detección de la mayoría de las drogas, pero las - técnicas inmunológicas están teniendo importancia en la actualidad.

Actualmente (1975) ningún método en orina es capaz de detectar el uso de Cannabis sativa. Así pues, no hay ningún - método que nos de resultados confiables que presenten en lo futuro una base para la legislación policiaca de esta droga.

Material y métodos : THC reacción cruzada con - cannabinoides (THC-CRC) en orinas fueron medidos por la técnica - de RIA específica para núcleos cannabinoides de tres anillos. Los - casos fueron seleccionados. Todas las orinas fueron seleccionadas - y obtenidas en los laboratorios de Drogas, entre diciembre de 1974 y febrero de 1975. Fueron analizados por THC-CRC a intervalos - regulares y codificados. De las 475 orinas examinadas, 82 provenían de pacientes de hospital que no eran drogadictos. Ninguno - de ellos tenía reacciones cruzadas con los tratahidrocannabinoles. - Las otras 393 muestras provenían de pacientes que sabían o sospechaban que habían fumado varias veces y varias drogas. De éstos, 319 provenían de dos hospitales de tratamiento (A y B) y una clí--

nica de tratamiento independiente, las otras 74 muestras provenían de diferentes personas que se sospechaba que habían fumado la planta.

Resultados de este estudio fueron congruentes y por tanto se puede tratar de aplicar para la legislación de la prueba, a continuación se dan los resultados que se obtuvieron y algunos detalles de las técnicas que siguieron estos autores.

TABLA # 3

	TOTAL	POSITIVOS	PORCENTAJE.
Clínica A	162	51	31
Clínica B	50	19	38
Clínica C	107	71	66
Miscelaneos	74	13	18
Control (hospitalizados)	82	0	--

Este mismo autor en el artículo # 33, nos demuestra que la prueba por RIA es confiable para detectar metabolitos de marihuana en orina y plasma, ya que puede llegar a detectar 1 ng/ml en orina y 7.4 ng/ml en plasma. En la tabla # 4 podemos observar las reacciones cruzadas y que compuestos requiere para reducir la marca de $^3\text{H-THC}$ de 50%.

TABLA # 4

Cannabinoides naturales y sintéticos que presentan reacción cruzada con el antisuero. La constante de avidez de esta reacción y la cantidad de cada compuesto que requiere para reducir la unión de 50% de $^3\text{H-THC}$.

CANNABINOIDE	CONSTANTE DE AVIDEZ (litro mol ⁻¹)	CANTIDAD - EN ng PARA-REDUCIR LA-MARCA 50%.
Delta 9 THC	6.0×10^9	0.4
Delta 8 THC	6.0×10^9	0.4
11-OH-THC	6.0×10^9	0.4
Cannabinol	6.0×10^8	0.4
11-OH-Cannabinol	2.2×10^7	35.0
* 8 alfa-OH-HHC	6.0×10^9	0.4
Cannabinol-11-al acetato	6.0×10^9	0.4
* Δ^8 THC-11-oic ácido metil éster	6.0×10^6	100.00
* Δ^9 THC-11-oic ácido metil éter	9.8×10^6	100.00
* 8-acetoxi-9-OH-HHC	8.8×10^6	100.00
HHC = hexahidrocannabinol	* Sintético	

TABLA % 5

COMPUESTOS QUE NO PRESENTAN REACCION CRUZADA CON EL ANTISUERO.

Cannabidiol
 Cannabicromeno
 Cannabiciclol

* 4-Carbometoxi- Δ^8 THC
 * Δ^8 THC-11-oic ácido metil éster
 metil éster

Compuesto que no son cannabinoides

Morfina
 Codeina
 Heroína
 Metadona
 Aminoglutetimida
 Fenobarbiton
 Fenitoin
 Tetraciclina
 Anfetamina
 Lignocaina
 Promacina

Difenilhidramina
 Nicotina
 Trifluoroperacina
 Efedrina
 Amitriptilina
 Acido Lisérgico
 Salicilato
 2-OH-bifenil Carveno
 alfa pineno
 Piperitono Terpenos
 Piperitono
 Pulegono

* Sintéticos.

COMENTARIOS

Esta técnica que ha sido desarrollada a lo largo de esta tesis, presenta muchos inconvenientes para su manejo y obtención de reactivos, un ejemplo de esto es el marcaje del antígeno, pero en cambio nos da gran ayuda para la detección de cantidades infinitesimales de metabolitos de la Marihuana, que por otros métodos sería imposible de obtener. Tomando en cuenta esto y su gran especificidad hacia los anillos cannabinoides, podemos concluir que este es el método de elección para buscar e identificar los metabolitos de la marihuana.

Los resultados obtenidos por los diferentes investigadores son elocuentes y por demas satisfactorios para darnos una idea clara del buen resultado de la técnica. Esta técnica parece a primera vista muy sofisticada y complicada, pero una vez que se aprende a hacerla es una técnica de rutina como cualquier otra; la presencia de isótopos radioactivos es un tabú para los laboratorios, pero es solo eso, ya que su manejo solo requiere mas cuidado dentro de los pasos de la rutina, para no contaminar todo el ambiente, pero con esmero y cuidado se puede llegar a realizar la técnica sin mayores contratiempos.

El Instituto de Energía Nuclear presta toda la asesoría técnica e imparte cursos para el manejo de isótopos radioactivos, así pues, en mi particular opinión, el método es rápido, bueno y muy específico para la sustancia en estudio, yo recomendaría que los laboratorios de drogas de abuso, como son la Procuraduría General de la República y los Centros de Integración Juvenil, tuvieran este método como el de elección.

Otra de las ventajas que presenta este método es la versatilidad, ya que se puede usar para Marihuana, pero también -

es posible usarlo para otras drogas como son : Morfina, Heroína, - Codeína, Ac. Lisérgico, etc... Solo es cuestión de buscar al - donador del anticuerpo específico, es decir, encontrar al animal - ideal para cada caso y tratar de obtener el anticuerpo, así como - el radiomarcaje de cada antígeno que se trate de estudiar o identi- ficar.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Castillo C., Denys G.
Contribución a la identificación de Marihuana en -
dedos y boca de Fumadores. Tesis PP: 1-6 1971-
Mex.
- 2) Segura, J.
La Marihuana, estudio médico y social.
Ed, Cultura Mex. PP: 9-29 1939 Mex.
- 3) Grinspoon, Lester
Reconsideración de la Marihuana
Ed. Extemporaneas Mex. PP: 15-93 1973.
- 4) Obra Citada, Pág. 55, se cita Narcotic Addiction.
Ed. J.A. O' Donell and J.C. Ball (N.Y. 1966)
- 5) Youngken, H.W.
Tratado de Farmacognosia
Ed. Atlanta Mex. PP: 352-357 1951.
- 6) Trease-Evans
Farmacognosia
CEESA Mex. PP: 422-426.
- 7) Diccionario Abreviado Espasa Calpe
PP: 67 vol 1 España

- 8) Norman J. Doorenbos, et al
Cultivation, extraction and Analysis of Cannabis -
sativa L.
Ann. of N.Y. Ac. of Sci. V; 191, PP: 3-14, -
1971.

- 9) Fármacos de Abuso
CEMEF PP: 117-125 1976 Mex.

- 10) Yalow, R.S. E Berson, S.A.
Assay of plasma insulin in human subjects by inmu--
nological methods
Nature V: 184 PP: 1948-1949 1959.

- 11) Ekims, R.P.
Basic principles Theory
Brit. Med. Bull. V: 30 PP: 3 1974.

- 12) Brumbley, R.V.
La ley de Acción de masas. En Análisis Cualitativo.
R.V. Brumbley (edit) PP: 45-47 CECSA 1969.

- 13) Feldman, H. E Rodbard D.
Mathematical Theory of Radioimmunoassay. En -
Principles of competitive protein- Binding assays.
W.D. Adell E W.H. Daughaday (edits). PP: -
158-203
J.B. Lippincott Co., 1971.

- 14) Parker, C.W.
Nature of immunological responses and antigen-antibody interactions.
En principles of competitive protein-binding assays.
W.D. Odell E W.H. Daughaday (edits). PP: -
25-56
J.B. Lippincott Co., 1971
- 15) Gordon, B.L.
Antigen-Antibody reactions involving complements. -
En Essentials of immunology. B.L. Gordon (edits) -
PP: 73-82
F.A. Davis Co. 1974.
- 16) White, A., Handler, P. E E.L. Smith
Immunoglobulins. En Principles of Biochemistry
A. White, P. Handler E E.L. Smith (edits) PP: 808-
-814.
?c Graw Hill Rogakusha, LTD. 1973.
- 17) Reyes, P.A.
El sistema del complemento
Rev. Ivest. Clin. (Mex) V: 24 PP: 273-287, -
1972.
- 18) Hum, B.A. E Lamdon J.
Antisera for radioimmunoassay. En Radioimmunoassay
methods
European Workshop. K.E. Kirkham E W.M. Hunter
(edits) PP: 121-142
Churchill Livingstone, 1971

- 19) Odell, W.D., et al
 Production of antisera for RIA. En Principles of competitive proteinbinding assays. -
 W.D. Odell E W.H. Daughaday (edits) PP: -
 57-88
 J.B. Lippincott, Co. 1971
- 20) Playfair, J.H.L., Hum, B.A.L. E D. Shulster
 Production of antibodies and binding reagentes.. -
 Brit. Med. Bull. V: 30 PP: 24-31, 1974.
- 21) Abraham, G.E. E P.K. Grover
 Covalent linkage of hormonal haptens to protein -
 carriers for use in radioimmunoassay. En Principles -
 of competitive protein-binding assays. -
 W.D. Odell E W.H. Daughaday (edits) PP: 134-
 -157.
 J.B. Lippincott, Co. 1971.
- 22) Court, G. E Hum, B.A.L.
 An effect of plasma and other macromolecular solutions
 in double antibody radioimmunoassays systems. En -
 Radioimmunoassays methods
 European Workshop K.E. Kirkham E W.M. Hunter
 (edits) PP: 283-289
 Churchill Livingstone, 1971.
- 23) Rodbard, D.
 Statistical quality control and routine data prece- -
 ssing for Radioimmunoassay and immunoradiometric -
 assays.

Clin. Chem V; 20 PP: 1255-1270 1974.

- 24) Shelley, D.S. et al
Radioimmunoassay
Clin. Chem. V: 19 PP: 146-186 1973.
- 25) Kabat,
Structural concepts in Immunology and Immunochemistry
Holt. Rinehart Winston 2° Ed. PP: 66-69 1976.
- 26) Lemberger, L., Julius Axelrod and Irwin J. Kopin -
Metabolism and disposition of THC_s in Naive Subjects and chronic marijuana users.
- 27) Wall, M.E. et al
Isolation, structure and biological activity of several metabolites of delta 9 THC.
J. An. Chem. Soc. V: 92 PP: 3466-3467 - 1970.
- 28) Lemberg, L. et al
Marijuana : Studies on the disposition and metabolism of delta 9 THC in man.
Science V: 170 PP: 1320-1322 1970.
- 29) Burnstein, S.
Metabolism of delta 1 (6) THC, an active marijuana constituents.
Nature V: 225 PP: 87-88 1970.

- 30) Wall, M.E.
The in vitro and in vivo metabolism of THC
Ann. of N.Y. Ac of Sci. V: 191 PP: 23-39 -
1971.
- 31) Teale, J.D. et al
Production of antibodies to THC as the basis for its-
RIA.
Nature V: 294 PP: 154-155 1974.
- 32) Teale, J.D., et al
RIA of cannabinoids in blood and urine
Lancet V: 2 PP: 553-555 1974.
- 33) Teale, J.D., et al
The development of a RIA for cannabinoids in -
blood and urine
J. Pharm. Pharmac. V: 27 PP: 467-472 1975.
- 34) Morrison E Boyd
Organic Chemistry
3er Ed. Allym and Bacon Cap: 20 PP: 667 -
1974.
- 35) Davis, B., et al
Microbiology
Ed. Harper and Row Cap: 14-21 PP: 349-597-
1973.
- 36) Gittler P., Yona Talma

Estudio de los efectos citotoxicológicos producidos -
por los derivados de la Marihuana.
Tesis PP: 26-32, 50-52 1977 Mex.

- 37) Berson, Salomon A. E Rosalyn S. Yelow
Radioinmunoassay: A status report. En Inmunobio--
logy Scientific American PP: 287-293.
- 38) Marks, Vincent; Derric Teale E Denys Fry
Detection of Cannabis products in Urine by Radioin--
munoassay.
Brit. Med. J. V: 3 PP: 348-349 1975.
- 39) Gross, S.J., et al (cont:)
Marihuana metabolits measured by a radioimmune -
tecnique
Nature V: 252 PP: 581-582 1974.
- 40) Maraks, V.; Derric Teale E B.A. Morris
Pharmacology
Brit. Med. Bull. V: 30 PP: 80-86 1974.
- 41) Agurell, S., et al
Elimination of tritium-labeled cannabinols in the -
rat with special reference to the development of -
test for the identification of cannabis users.
- 42) Agurell, S. et al
Quantitation of delta 1 THC in plasma from cannabis
smokers.
J. Pharm. Pharmac. V: 25 PP; 554-558 1973.

- 43) Grant, J.D., et al
Antibody detection of marihuana
Nature New Biology V: 236 PP: 216-217 1972.
- 44) Hollister, L.E., et al
Marihuana metabolites in urine of man.
Clin Pharmac E Terap. V: 13 PP: 849-855 1972.
- 45) Vinson, S.A., et al
Simple thin-layer chromatographic system for the -
separation of cannabinoids.
J. Chromatog. V: 106 PP: 196-199 1975.
- 46) Adams, R., Madison Hunt and J.H. Clark
Struture of Cannabidiol, a product isolated from -
the Marihuana Extracts of Minnesota Wild Hemp.
J. Am. Ch. Soc. V: 62 PP: 196-200 1940.
- 47) Vega-Franco, L. et al
Efecto de la marihuana sobre el crecimiento del -
sistema servioso central durante la etapa embriofetal.
Rev. Inv. Salud Pública V; 36 PP: 19.27 1976.
- 48) Radioinmunoassay
British J. of Hospital 1969.
- 49) Sprangue, R.A., Harrus Rosenkrantz and M. C. -
Braude Cannabinoids effects on liver glucogen stores.
Life Science V: 12 PP: 409-416 1973.

- 50) Lehninger, Albert .
Bioquímica.
Ed. Omega España 1972.



Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25

FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.
TEL. 548-49-79